



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“EFECTO DE LAS LEVADURAS *DEBARYOMYCES HANSENI* 97 Y
YARROWIA LIPOLYTICA 242 EN LA MOTILIDAD DEL PATOGENO
VIBRIO ANGUILLARUM”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Ingeniera en Biotecnología Molecular

VICTORIA ISABEL PALMA GORZIGLIA

Directora de Seminario de Título
Dra. Paola Navarrete Wallace

Septiembre de 2021
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

VICTORIA ISABEL PALMA GORZIGLIA

“EFECTO DE LAS LEVADURAS *DEBARYOMYCES HANSENI* 97 Y *YARROWIA LIPOLYTICA* 242 EN LA MOTILIDAD DEL PATÓGENO *VIBRIO ANGUILLARUM*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Paola Navarrete Wallace
Directora Seminario de Título

Dr. Andrés Marcoleta Caldera
Profesor Patrocinante

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente

Dr. Francisco Chávez Espinosa
Corrector

Santiago de Chile, septiembre de 2021

BIOGRAFIA



Nací en Viña del Mar el 30 de octubre de 1995. Desde los 4 hasta los 18 años estudié en el colegio Saint Paul's School. En los últimos años de colegio decidí ahondar mis estudios en el área de la biología, comenzando el año 2014 la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile.

En esta etapa, realicé una pasantía en el Laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Universidad de Chile con el Dr. Andrés Marcoleta, lo que confirmó y aumentó mi interés por el área microbiológica. Por ello, realicé una segunda pasantía en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos a cargo de la Dra. Paola Navarrete.

Allí realicé mi unidad de investigación y posteriormente desarrollé mi seminario de título. Paralelamente, obtuve el grado de licenciada el año 2020. Actualmente, me encuentro en el paso final para obtener mi título profesional, esperando con ello comenzar una nueva etapa en mi carrera científica.

AGRADECIMIENTOS

Comenzaré agradeciendo a quienes han estado en mi vida desde sus inicios: mi familia. A mis padres, que nunca dudaron de mis capacidades y fueron mis auspiciadores incondicionales, que me enseñaron a dar siempre lo mejor de mí y que siempre estuvieron cuando los necesité. No es fácil criar a una hija, pero de primera mano les puedo asegurar que han hecho un excelente trabajo. A mi hermana Choly, que siempre estuvo pendiente de mí, y me enseñó a perseverar tanto en lo académico como en lo personal. A mi hermano Esteban, con quien caminé tantas veces al colegio, cuya curiosidad y creatividad me mostraron que el conocimiento no sirve si no se acompaña de pensamiento crítico, y que lo importante no es saber las respuestas, sino hacerse las preguntas. A mi hermana Any a quien, pese a estar lejos, siento muy cercana. A mi hermano Manolo y mis sobrinos talquinos. A mis sobrinitas de Viña, a quienes extrañé un montón cada vez que estuve en Santiago. A mi tía Rucia, que me alojó en su casa y me trató cual invitada de honor. A Oscarito, mis primos y mi familia en general.

También agradeceré a quienes estuvieron desde mi infancia, a mis amigas Hing-Jue, Tatala, Mapa y a Vane, de quien aprendí a ser responsable. A los buenos profesores que tuve en el colegio, como Joselo y Kira. Y a mis amigos de universidad, “los niños”, los iniciales y los que se sumaron. Aprendimos juntos sobre esta carrera, hicimos juntos muchos trabajos y sufrimos juntos también. Son parte de los mejores recuerdos de estos años, no hubiese sido lo mismo sin ustedes. Por último, gracias a quienes me aceptaron en su laboratorio, Andrés Marcoleta y Paola Navarrete. El primero me abrió las puertas al mundo del laboratorio con gran paciencia y dedicación. La segunda me enseñó a pensar por mí misma, confiando en mis capacidades. En su laboratorio tuve mucha ayuda, sobre todo de Sole y Orlando, a quienes admiro como personas y profesionales.

INDICE DE CONTENIDOS

CUERPO PRELIMINAR	ii
Biografía.....	ii
Agradecimientos	iv
Índice de contenidos	v
Índice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
Enfermedades infecciosas: uno de los desafíos de la acuicultura.....	1
Estrategias convencionales contra las enfermedades: uso de antibióticos y vacunas.....	2
Las levaduras probióticas son una alternativa ventajosa.....	4
Levaduras probióticas aisladas de peces sanos.....	6
<i>Vibrio anguillarum</i> : un patógeno de peces.....	8
La motilidad del patógeno puede ser blanco para la acción de probióticos.....	9
Motilidad en <i>V. anguillarum</i>	11
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
Revisión de técnicas para evaluar la motilidad bacteriana.....	14
Cepas empleadas y condiciones de cultivo.....	14

Curvas de crecimiento de <i>V. anguillarum</i> PF4.....	15
Marcaje de <i>V. anguillarum</i> con el fluoróforo DTAF.....	16
Visualización de <i>V. anguillarum</i> en larvas de pez cebra (<i>D. rerio</i>)	17
Estandarización de una técnica para el estudio del efecto de las levaduras probióticas en la motilidad de <i>V. anguillarum</i> PF4 <i>in vitro</i>	17
Análisis estadístico.....	19
Declaración ética.....	20
3. RESULTADOS	21
Revisión de las técnicas disponibles para el estudio de la motilidad bacteriana	21
Tinción de <i>V. anguillarum</i> PF4 con el fluoróforo DTAF y su visualización dentro del tracto digestivo de pez cebra	22
Evaluación del efecto de <i>D. hansenii</i> 97 y <i>Y. lipolytica</i> 242 en la motilidad de <i>V. anguillarum</i> PF4 <i>in vitro</i>	27
4. DISCUSIÓN	31
Mini-revisión sobre las técnicas disponibles para el estudio de la motilidad bacteriana	31
El marcaje de <i>V. anguillarum</i> PF4 con DTAF permite visualizar <i>in vivo</i> la presencia del patógeno dentro del tracto digestivo de pez cebra	32
Estandarización de una técnica para evaluar el efecto de <i>D. hansenii</i> 97 y <i>Y. lipolytica</i> 242 en la motilidad de <i>V. anguillarum</i>	34
El sobrenadante libre de células de <i>D. hansenii</i> 97 y <i>Y. lipolytica</i> 242 no afectó la motilidad <i>in vitro</i> de <i>V. anguillarum</i>	35
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA	40
7. ANEXOS	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento de <i>V. anguillarum</i> PF4 (VaPF4) y comparación de los métodos para la determinación de concentración bacteriana	23
Figura 2. Efecto de la tinción con DTAF en la viabilidad de <i>V. anguillarum</i> PF4 (VaPF4) y porcentaje de bacterias marcadas en el tiempo	25
Figura 3. Visualización de <i>V. anguillarum</i> PF4 (VaPF4) en larvas de pez cebra	27
Figura 4. Los sobrenadantes de <i>D. hansenii</i> 97 (Dh97) y <i>Y. lipolytica</i> 242 (YI242) no modifican el diámetro de motilidad de <i>V. anguillarum</i> PF4 (VaPF4)	29
Figura S1. Estandarización del protocolo para evaluar el efecto de <i>D. hansenii</i> 97 (Dh97) y <i>Y. lipolytica</i> 242 (YI242) en la motilidad de <i>V. anguillarum</i> PF4 (VaPF4) <i>in vitro</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius

Dh97: *Debaryomyces hansenii* 97

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nanómetros

dpf: Días post-fertilización

DTAF: 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) aminofluoresceína

g: Aceleración de la gravedad (9,8 m/s²)

GFP: Proteína de fluorescencia verde

k: Constante de crecimiento

mpo: Mieloperoxidasa

nm: Nanómetros

rpm: Revoluciones por minuto

SLC: Sobrenadante libre de células

T_{dup}: Tiempo de duplicación

TSB: Caldo tripticasa de soya

UFC: Unidades formadoras de colonia

v/v: Volumen/volumen

VaPF4: *Vibrio anguillarum* PF4

YI242: *Yarrowia lipolytica* 242

YPD: Extracto de levadura peptona dextrosa

λ_{em} : Longitud de onda de emisión

λ_{ex} : Longitud de onda de excitación

RESUMEN

El interés por el uso de probióticos en la acuicultura ha aumentado en los últimos años. Dentro de los beneficios que otorgan se encuentra la protección del hospedero de infecciones bacterianas. Las cepas *Debaryomyces hansenii* 97 y *Yarrowia lipolytica* 242 son levaduras probióticas capaces de proteger a larvas de pez cebra (*Danio rerio*) contra la infección causada por *Vibrio anguillarum*. Uno de los mecanismos patogénicos de esta bacteria es su motilidad, que es necesaria en las etapas iniciales de la infección. En esta tesis se investigó si estas levaduras eran capaces de disminuir la motilidad del patógeno.

Se realizó una mini revisión de las técnicas disponibles para evaluar la motilidad bacteriana, enfatizando en técnicas óptimas para estudios relacionados a la interacción de la bacteria con un hospedero. En el laboratorio, se tiñó *V. anguillarum* PF4 con el fluoróforo 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) aminofluoresceína (DTAF) para observar su distribución y motilidad *in vivo* en larvas de pez cebra. A pesar de que un bajo porcentaje de bacterias fue marcado con DTAF, se logró observar al patógeno dentro del tracto digestivo del pez. Sin embargo, no se logró visualizar la motilidad bacteriana debido, en parte, a la baja resolución del microscopio utilizado. Por ello, se optó por un ensayo de motilidad *in vitro*. El protocolo optimizado consistió en inocular una gota de un cultivo del patógeno sobre placas con agar blando (0,36 %) suplementado con un 13 % de sobrenadante libre de células de un cultivo de 18 h de cada levadura. Se midió el diámetro del halo luego de 18 y 22 h de incubación. Los resultados mostraron que ninguna de las levaduras afectó el diámetro del halo patógeno. Así, la capacidad de estas levaduras de mitigar la infección de *V. anguillarum* en pez cebra no parece

relacionarse con una disminución en la motilidad de la bacteria. Considerando las limitaciones de la metodología empleada, se sugiere realizar estudios adicionales para descartar que haya un efecto en la motilidad *in vivo*.

ABSTRACT

Interest in using probiotics in aquaculture has increased in the last years. Among the benefits they confer, one is protection of the host against bacterial infections. *Debaryomyces hansenii* 97 and *Yarrowia lipolytica* 242 are probiotic yeast strains capable of protecting zebrafish (*Danio rerio*) larvae against *Vibrio anguillarum* infections. One of the pathogenic traits of this bacteria is its motility, which is required in the early stages of the infective process. Here, we investigated whether these strains could diminish this pathogen's motility.

We elaborated a mini review about the available techniques for the study of bacterial motility, highlighting the optimal techniques for host-related studies. In the laboratory, *V. anguillarum* PF4 was stained with the fluorophore 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein (DTAF) to observe *in vivo* motility and distribution inside zebrafish larvae. Although a low percentage of bacteria was stained with DTAF, it was still possible to observe the pathogen inside the zebrafish digestive tract. Nevertheless, it was not possible to visualize bacterial motility, partially due to the low resolution of the microscope used. Because of this, an *in vitro* motility assay was performed. The optimized protocol consisted in inoculating a drop of the pathogen's culture on top of soft agar plates (0,36 %) supplemented with 13 % of cell-free supernatant of a 18 h culture of each yeast. The halo diameter was measured after 18 and 22 h of incubation. Our results showed that neither of the yeast strains modified the pathogen's halo diameter. Therefore, the capacity of these strains to mitigate a *V. anguillarum* infection in zebrafish does not seem to be related to a reduction in the motility of this bacteria. Considering

methodological limitations, performing additional experiments to rule out an *in vivo* effect in bacterial motility is suggested.

INTRODUCCION

Enfermedades infecciosas: uno de los desafíos de la acuicultura

La acuicultura es una industria que, en los últimos años, ha ido creciendo a gran escala a nivel mundial, alcanzando el año 2018 una producción de 82 millones de toneladas de peces, valuadas en 250 billones de dólares y correspondiendo al 46 % de la producción total de peces (FAO, 2020). Para satisfacer la creciente demanda de productos acuícolas, las condiciones de cultivo se han vuelto cada vez más intensivas (Rico y col., 2012), exponiendo a los animales a condiciones de estrés tales como una alta densidad poblacional y una baja calidad de agua, creando un ambiente favorable para infecciones oportunistas (Sundberg y col., 2016) tales como las causadas por cepas patogénicas del género *Vibrio* (Sindermann, 1984).

Teniendo en cuenta que los agentes infecciosos pueden ingresar a los cultivos acuícolas por variadas vías tales como la ingesta de agua, alimento o infección de los individuos de reproducción, la prevención de enfermedades se complejiza pues, al no estar en un ambiente cerrado, los hospederos silvestres de aguas cercanas pueden fácilmente contagiar a los peces de cultivo (Saksida y col., 2014). Además, algunas cepas resultan más virulentas para los peces de cultivo pues, a diferencia de los peces silvestres, no han co-evolucionado con los agentes infecciosos presentes en el ambiente natural (Lafferty y col., 2015). Esto, sumado al hecho de que las enfermedades en los cultivos de peces son un potencial factor limitante en la producción de la industria (Jansen y col., 2012), hace que el manejo de enfermedades sea un desafío que se ha intentado abordar desde varias aristas, sin llegar aún a una solución definitiva. En el caso de patógenos

bacterianos, varias estrategias se han implementado para mitigar su efecto en la producción acuícola.

Estrategias convencionales contra las enfermedades: uso de antibióticos y vacunas

Las enfermedades causadas por bacterias suelen ser tratadas con antibióticos (Cabello y col., 2013), los que se definen como sustancias capaces de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos. En Chile, ejemplos de antibióticos autorizados para su empleo en la acuicultura son la oxitetraciclina y el florfenicol (Romero y col., 2012). Si bien el uso de antibióticos puede ser efectivo y generar una solución rápida, su aplicación selecciona cepas resistentes, lo que promueve el uso de nuevos compuestos que vuelven a generar una presión selectiva, promoviendo así la selección de cepas multirresistentes (Medina & Pieper, 2016). El escenario se hace aún más complejo al considerar que los antibióticos no actúan específicamente sobre los patógenos, sino que sobre toda la microbiota susceptible del hospedero (Thiemann y col., 2016). Las bacterias resistentes no patogénicas pueden transferir sus genes de resistencia a patógenos, aumentando así la dificultad de tratar las enfermedades asociadas (Cabello y col., 2013).

Ciertos estudios sugieren que los sistemas acuáticos facilitan la transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias (Taylor y col., 2011; Pérez-Etayo y col., 2020). Cerca del 80 % de los antimicrobianos administrados en peces termina en el ambiente, persistiendo como compuesto activo por varios meses en varios casos (Cabello y col., 2013). Además, para prescindir del gasto económico y de tiempo que implica identificar

la especie causante de la enfermedad, se suelen emplear antibióticos de amplio espectro (Samanidou & Evaggelopoulou, 2007), con lo que también se perjudica a microorganismos inofensivos e incluso beneficiosos presentes en la microbiota en las especies de cultivo. Por ejemplo, el uso de oxitetraciclina en salmones juveniles sanos disminuyó la diversidad bacteriana intestinal cultivable (Navarrete y col., 2008).

Se ha descrito que, para mantener un ambiente de cultivo óptimo, la comunidad microbiana debe ser diversa, incluyendo en su composición bacterias inocuas y beneficiosas para el hospedero (Hansen & Olafsen, 1999); la disbiosis, entendida como un desbalance en la comunidad microbiana (de Bruijn y col., 2018), aumenta la susceptibilidad del hospedero a infecciones por patógenos oportunistas (Langdon y col. 2016). Así, la microbiota tiene un rol protector, estimula la respuesta inmune y mejora la adquisición de nutrientes en el hospedero (de Bruijn y col., 2018). Por ende, mantener una comunidad microbiana benéfica en el tracto intestinal resulta de vital importancia para el control de enfermedades en peces.

Otra estrategia comúnmente empleada en el combate contra las enfermedades infecciosas son las vacunas, las cuales cumplen un rol importante en el cultivo de pez a gran escala, siendo la clave para el éxito del cultivo del salmón (Muktar & Tesfaye, 2016). La vacunación convencional suele administrarse por inyección; sin embargo, esta no es una buena opción para ser aplicada en larvas debido a su pequeño tamaño y a la gran cantidad de individuos que habría que vacunar. Si bien la vacunación por inmersión no presenta estos problemas, suele presentar una baja eficacia (Bøgwald & Dalmo, 2019). Además, las larvas de peces no cuentan con un sistema inmune adaptativo completamente desarrollado (Vadstein, 1997) y su desarrollo es muy variable,

dependiendo de la especie. Para el caso de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y carpa, las células positivas para inmunoglobulinas demoran un mes en ser detectadas en el bazo (Zapata y col., 2006). Tomando esto en consideración, la aplicación de vacunas en este estadio no es una opción. Pese a ello, teniendo en cuenta la alta susceptibilidad de las larvas a infecciones en las etapas más tempranas de desarrollo (Romero y col., 2012), es necesario buscar nuevos métodos eficaces aplicables en esta etapa de desarrollo.

Las levaduras probióticas son una alternativa ventajosa

En este contexto, se han utilizado microorganismos probióticos como una alternativa contra las enfermedades. Los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren al huésped un beneficio para su salud (Hill y col., 2014). Se han descrito diversos efectos asociados a la acción probiótica, entre ellos: la modulación de la composición de la microbiota del hospedero, el aumento del largo de las microvellosidades del enterocito y mejoramiento de la función digestiva, la modulación del sistema inmune, la producción de enzimas digestivas, la producción de compuestos que inhiben tanto el crecimiento como la virulencia de los potenciales patógenos y el mejoramiento de la calidad del agua (Merrifield y col., 2010, Soliman y col., 2019), además de observar actividad antiviral en algunos casos (Zorriehzahra y col., 2016).

Además de proveer un beneficio para el huésped, los potenciales probióticos deben cumplir ciertos requisitos (Merrifield y col., 2010). Para su uso en la acuicultura, no deben ser patogénicos no sólo con el hospedero sino también con los animales acuáticos en

general y los consumidores humanos. Junto con ello, no deben tener plásmidos que contengan genes de resistencia a antibióticos. Por último, también deben mantenerse vivos en el tracto digestivo del hospedero, por lo que los procesos de selección de cepas probióticas incluyen pruebas de resistencia a sales biliares y pH bajo. En este sentido, se recomienda el uso de cepas aisladas desde el tracto digestivo de los propios hospederos sanos, ya que estarían mejor adaptadas a estas condiciones y serían inocuas (Lazado y col., 2015; Zorriehzahra y col., 2016).

Se ha descrito un amplio número de especies microbianas capaces de controlar enfermedades en peces (Austin & Austin, 2016), lo que ha llevado a la investigación de su uso en la industria acuícola. Los microorganismos más comúnmente empleados en la acuicultura como probióticos son las bacterias ácido lácticas y las del género *Bacillus*, además de otras bacterias Gram positivas y negativas, siendo las levaduras mucho menos estudiadas (Hoseinifar y col., 2018).

Inicialmente se estudió la especie *Saccharomyces cerevisiae*, también conocida como levadura de panadería, como levadura probiótica para peces, reportándose que la dieta suplementada con esta levadura en dosis de 0,25 a 5,0 g/kg de alimento reduce la mortalidad en tilapia luego de una infección con *Aeromonas hydrophila* (Abdel-Tawwab y col., 2008). Junto con ello, la administración separada o en conjunto de *Pediococcus acidilactici* y *S. cerevisiae* var. *boulardii* aumentó la resistencia de la trucha arcoiris contra la infección con el patógeno *Yersinia ruckeri* (Quentel y col., 2005). Ayiku y col. (2020) mostraron que una suplementación con cultivo de levadura de panadería en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) aumenta el crecimiento, modula la microbiota intestinal y promueve la maduración intestinal y la respuesta inmune contra una infección de *Vibrio harveyi*.

El uso de levaduras como probióticos presenta varios beneficios al hospedero. En su pared poseen manano oligosacáridos, a los que se les atribuyen beneficios tales como la promoción de bacterias benéficas para el hospedero en el intestino y un aumento en la actividad fagocítica ante patógenos (Gainza & Romero, 2017; Gonçalves & Gallardo-Escárate, 2017; Merrifield y col., 2010). Adicionalmente, los β -glucanos de la pared celular estimulan la respuesta inmune innata (Pérez-Ramos y col., 2018; Carballo y col., 2019). Las levaduras son también capaces de estimular las enzimas antioxidantes en peces, previniendo el estrés oxidativo en el hospedero (Tovar- Ramírez y col., 2010). Además, producen poliaminas, las cuales promueven la maduración intestinal y la función digestiva de los peces (Peulen y col., 2000).

Además, una de las principales ventajas de emplear levaduras como probióticos es su resistencia natural a los antibacterianos, por lo que ambos tratamientos pueden usarse en conjunto con efectividad. Más aún, debido a que las levaduras probióticas y las bacterias probióticas tienen distintos mecanismos de acción, puede producirse un efecto sinérgico al mezclar ambos tipos de probióticos (Bisson y col., 2010, Suharja y col., 2014). Una considerable cantidad de estudios muestra que las levaduras podrían interactuar positivamente con las bacterias probióticas, aumentando su supervivencia y estimulando su crecimiento (Hatoum, 2012). Debido a lo anterior, se ha estudiado la posibilidad de que levaduras aisladas de la microbiota de peces sanos puedan emplearse como probióticos.

Levaduras probióticas aisladas de peces sanos

En los últimos años, la búsqueda de microorganismos con propiedades probióticas se ha centrado en la microbiota del tracto digestivo de peces sanos ya que, al encontrarse

en el pez, serían inocuas y tendrían una mayor probabilidad de adaptarse a las condiciones ambientales y del hospedero (Lazado y col., 2015; Zorriehzahra y col., 2016).

Así, la administración de *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 viva (cepa aislada desde trucha arcoiris) en la dieta de dorada (*Sparus aurata* L.) estimula el sistema inmune del pez (Reyes-Becerril, 2008). La administración de esta cepa también mejoró el crecimiento de larvas de róbalo (*Dicentrarchus labrax*), junto con aumentar su tasa de supervivencia y disminuir su porcentaje de malformaciones (Tovar-Ramírez y col., 2004). Junto con ello, se ha reportado que *D. hansenii* CBS004 regula positivamente la expresión génica de enzimas antioxidantes y estimula la respuesta inmune y supervivencia de leucocitos en huachinango (*Lutjanus peru*), luego de una infección con *Vibrio parahaemolyticus* (Angulo y col., 2017).

Otra especie de levadura marina, identificada en la microbiota de peces sanos, *Yarrowia lipolytica*, también ha sido estudiada como potencial probiótico. Se determinó que *Y. lipolytica* VIT-ASN04, posee propiedades deseables para un probiótico debido a su capacidad de coagregar con cepas de bacterias patogénicas (Suvarna y col., 2018). La cepa *Y. lipolytica* 020 mejoró tanto la supervivencia como el crecimiento de ostras perladas (*Pinctada mazatlanica*) al suplementar las microalgas con las que eran alimentadas (Aguilar-Macías y col. 2010), mientras que *Y. lipolytica* N6 fue capaz de potenciar la respuesta inmune inespecífica en huachinango (*Lutjanus peru*) (Alamillo y col., 2017). Tanto la administración de esta cepa como de la cepa D1 aumentó la actividad bactericida contra *V. parahaemolyticus* y estimuló el sistema inmune innato en *L. vannamei* (Liconá-Jain y col., 2020).

Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha descrito que las cepas *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 son capaces de proteger larvas de pez cebra frente a la infección con *Vibrio anguillarum*, aumentando su supervivencia (Caruffo y col., 2015). El efecto protector de estas levaduras se asoció a la modulación de la respuesta del sistema inmune innato del pez y reducción de la concentración del patógeno en las larvas (Caruffo y col., 2016).

***Vibrio anguillarum*: un patógeno de peces**

La infección por *V. anguillarum* es una de las principales causas de hemorragia septicémica en peces, también denominada vibriosis, enfermedad que afecta a una amplia variedad de especies marinas (Austin & Austin, 2016), provocando una alta tasa de mortalidad, además de ser responsable de enormes pérdidas económicas a nivel mundial, siendo capaz de infectar un gran número de especies de peces marinos y de agua dulce, incluyendo pez cebra (Frans y col., 2011). Una de las principales rutas de infección de *V. anguillarum* en el pez es la vía oral, siendo detectado luego de 3 horas en la primera porción del tracto digestivo en larvas de pez cebra a los 5 días post fertilización (Oyarbide y col., 2015).

En la actualidad, se distinguen 23 serotipos O (O1–O23) distintos de *V. anguillarum*, donde sólo O1, O2 y O3 han sido asociados con vibriosis en peces, mientras que los demás serotipos son, en su mayoría, aislados ambientales no patogénicos (Boesen y col., 1999). Debido a su ubicuidad en ambientes y organismos acuáticos, se ha evaluado el potencial probiótico de esta especie, desde hace más de dos décadas (Austin y col., 1995; Gildberg & Mikkelsen, 1998; Pérez-Ramos y col., 2018).

El pez cebra ha sido utilizado por muchos años como especie modelo y presenta una serie de ventajas para estudiar las interacciones hospedero-microbio. Las larvas son ópticamente transparentes, lo que permite visualizar poblaciones celulares marcadas fluorescentemente *in vivo* dentro del pez. La apertura de la boca de larvas de pez cebra ocurre a los 3 dpf (días post-fertilización) y la apertura completa del tubo gastrointestinal ocurre a los 4 dpf (Wallace & Pack, 2003), permitiendo inocular diferentes microorganismos por inmersión en esta etapa de su desarrollo. Todo esto, junto con la disponibilidad de protocolos de obtención de individuos axénicos, permite monitorear *in vivo* tanto los procesos de colonización e infección del microorganismo como la respuesta del hospedero (López Nadal y col., 2020), incluyendo el estudio de mecanismos asociados a efectos probióticos (Rendueles y col., 2012; Qin y col., 2018).

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio utilizó como modelo de infección a pez cebra desafiado con el patógeno *V. anguillarum* PF4. Esta cepa es altamente virulenta y se clasifica como serotipo O3 (Castillo y col., 2017). Considerando que la microscopía de fluorescencia facilita la visualización de las dinámicas bacterianas *in vivo* (Rawls y col., 2007; Taormina y col., 2012; Parthasarathy, 2018), se trabajó con el fluoróforo 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) aminofluoresceína (DTAF) para marcar el patógeno (Sherr y col., 1987), ya que se une covalentemente con los polisacáridos y péptidos presentes en la pared celular (Schumann & Rentsch, 1998). Además, se ha comprobado que la tinción de *V. anguillarum* PF4 con DTAF no afecta su viabilidad (Caruffo y col., 2015).

La motilidad del patógeno puede ser un blanco para la acción de probióticos

La motilidad se define como el movimiento de células por algún tipo de propulsión propia (Madigan y col., 2010) o bien, como la “habilidad de un organismo individual o célula de

convertir energía química en la locomoción del individuo completo o célula empleando para ello un sistema motor” (Miyata y col., 2020). Muchos patógenos son mótils, lo que les permite escapar de situaciones adversas y encontrar a su hospedero, por lo que esta característica ha sido implicada en procesos patogénicos como la colonización y manifestación de la enfermedad (Josenhans y Suerbaum, 2002). La reducción de la motilidad de un patógeno puede disminuir su virulencia y, por ende, producir un efecto benéfico al hospedero. Debido a lo anterior, resulta oportuno identificar este mecanismo de acción en una cepa probiótica.

Hay distintos tipos de motilidad, siendo el *swimming* (Henrichsen, 1972) uno de los más estudiados. Este consiste en el movimiento en un ambiente líquido mediante el empleo de uno o más flagelos. La motilidad asociada a flagelo se ha visto implicada en procesos patogénicos tales como facilitar el encuentro con el sitio de infección específico, la diseminación hacia otros sitios anatómicos dentro del hospedero e incluso escapar de las células del hospedero (Chaban y col., 2015). Junto con ello, se ha demostrado en pez cebra que el *swimming* en una bacteria intestinal simbiote, del género *Vibrio*, promueve su resistencia a la expulsión intestinal, aumentando su tiempo de permanencia dentro del hospedero (Wiles y col., 2020).

La distribución y dinámica de la población bacteriana dentro del hospedero también puede verse alterada por la presencia de otro microorganismo y/o compuesto al promover su agregación, disminuyendo el porcentaje de bacterias plantónicas mótils (Wiles y col., 2016; Schlomann y col., 2019). El estado más agregado de las poblaciones bacterianas favorece su expulsión del tracto digestivo debido a las contracciones peristálticas del intestino. Estos fenómenos se logran visualizar *in vivo* dentro de larvas pez cebra mediante microscopía de fluorescencia.

También es posible evaluar la motilidad *in vitro*, para lo cual se utiliza tradicionalmente agar semisólido (Tittsler & Sandholzer, 1936), también conocido como agar blando. Con este método, se puede cuantificar la motilidad microbiana en una escala macroscópica, ya que se determina visualmente el diámetro del halo de dispersión del inóculo. El porcentaje de agar a emplear dependerá de la cepa y tipo de motilidad a evaluar.

Motilidad en *V. anguillarum*

Para las bacterias intestinales patogénicas, como algunas cepas de *V. anguillarum*, la combinación de motilidad y quimiotaxis permite que ésta pueda detectar y conseguir nutrientes requeridos para su supervivencia, así como llegar con efectividad a sus nichos de colonización (Millet y col., 2014). En este caso en particular, la bacteria posee un flagelo polar con cubierta que le otorga motilidad quimiotáctica tanto hacia el mucus de la piel como al mucus intestinal del hospedero (O'Toole y col., 1999).

En *V. anguillarum*, la motilidad es un factor de virulencia fundamental para la infección del huésped, siendo cepas mutantes para distintas flagelinas menos virulentas que la cepa silvestre al infectar por inmersión trucha arcoiris (O'Toole y col., 1996; McGee y col., 1996). Experimentos con líneas celulares de embriones de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) muestran que el *swimming* de *V. anguillarum* aumenta su probabilidad de encontrar un sitio de invasión en el pez, siendo la motilidad necesaria para la entrada de la bacteria en el hospedero (Ormonde y col., 2000), pero no para la progresión de la vibriosis (Milton y col., 1996; O'Toole y col., 1996). Así, mutantes sésiles de *V. anguillarum* generadas por mutagénesis mediante transposones sufrieron una disminución de hasta 500 veces en la virulencia cuando el pez era inoculado vía inmersión, más no mediante inyección intraperitoneal (O'Toole y col., 1996). Teniendo en cuenta su rol en la virulencia, se han buscado compuestos capaces de controlar

infecciones causadas por *Vibrio*, que puedan afectar la motilidad del patógeno (Khan y col., 2020). Al respecto, varios estudios sugieren que la modulación de la motilidad de un patógeno podría ser un mecanismo de acción algunas cepas probióticas (Bernardeau y col., 2009; Pontier-Bres y col., 2012; Vahedi-shahandashti y col., 2017; Shin & Eom, 2020).

En este seminario de título, se evaluó si las cepas de levadura probióticas *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 modifican la motilidad del patógeno *V. anguillarum* PF4. Para ello, se realizó una breve revisión de las técnicas disponibles para estudiar la motilidad bacteriana, para posteriormente escoger una que permitiese evaluar el efecto de dichas levaduras en el patógeno. Se evaluó la factibilidad de observar la motilidad de *V. anguillarum* PF4 *in vivo* en larvas de pez cebra, mediante tinción del patógeno con DTAF y su posterior inoculación y observación dentro de la larva con microscopía de fluorescencia. Además, se estandarizó el empleo de la técnica de agar blando para evaluar el efecto de *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 en la motilidad de *V. anguillarum* PF4 *in vitro*.

Hipótesis

Las cepas de levadura *Debaryomyces hansenii* 97 y *Yarrowia lipolytica* 242 disminuyen la motilidad del patógeno *Vibrio anguillarum* PF4.

Objetivo General

Evaluar el efecto de las levaduras probióticas *Debaryomyces hansenii* 97 y *Yarrowia lipolytica* 242 sobre la motilidad del patógeno *Vibrio anguillarum* PF4.

Objetivos Específicos

1. Revisar en la literatura las técnicas disponibles para el estudio de la motilidad en bacterias.
2. Evaluar la tinción de *Vibrio anguillarum* PF4 con el fluoróforo 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) aminofluoresceína (DTAF) para visualización de su localización y motilidad *in vivo* en pez cebra (*Danio rerio*).
3. Estandarizar una metodología de motilidad en agar blando para el estudio del efecto de las levaduras probióticas *Debaryomyces hansenii* 97 y *Yarrowia lipolytica* 242 sobre la motilidad de *Vibrio anguillarum* PF4 *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Revisión de técnicas para evaluar la motilidad bacteriana

Se realizó una revisión bibliográfica sobre las técnicas empleadas para estudiar la motilidad bacteriana y su rol en la interacción bacteria-hospedero, destacando sus principales características. Para ello, se emplearon los buscadores Pubmed y Google Scholar, buscando con las palabras clave “*motility [Title/Abstract]*” y “*bacteria [Title/Abstract]*” junto a los términos “*method [Title/Abstract]*”, “*approach [Title/Abstract]*” y “*technique [Title/Abstract]*”. También se realizaron búsquedas con las palabras clave “*motility [Title/Abstract]*”, “*bacteria [Title]*” y “*host [Title/Abstract]*” junto con los términos “*visualization [Title/Abstract]*”, “*model [Title/Abstract]*”, “*vivo [Title/Abstract]*” y “*live [Title/Abstract]*” para centrarse en metodologías relacionadas al estudio en hospederos. Se tomaron en cuenta tanto las técnicas más comúnmente empleadas como los avances metodológicos publicados entre enero del 2011 y noviembre del 2020.

Cepas empleadas y condiciones de cultivo

Se usó la cepa *V. anguillarum* PF4 (VaPF4), previamente aislada en Chile desde salmón atlántico (*Salmo salar*) enfermo y, excepto se diga lo contrario, se cultivó en caldo tripticasa de soya suplementado con 1 % NaCl (TSB + 1 % NaCl) a 28 °C y 150 rpm o en placas de agar tripticasa de soya suplementadas con 1 % NaCl (TSA + 1 % NaCl) a 28 °C. Las cepas de *D. hansenii* 97 (Dh97) y *Y. lipolytica* 242 (Yl242) pertenecen a la colección de levaduras del laboratorio y fueron previamente aisladas de ejemplares sanos de trucha arcoiris de cultivo y palometa chilena (*Seriola lalandi*) silvestre, respectivamente. Estas cepas se cultivaron en caldo extracto de levadura peptona

dextrosa (YPD) a 28 °C y 150 rpm o en placas YPD a 28 °C por 48 h. Los pre-inóculos se realizaron con colonias aisladas de placas de cultivo de 24 h para VaPF4 y 48 h para las levaduras.

Curvas de crecimiento de *V. anguillarum* PF4

Se inocularon 400 µL de un cultivo *overnight* de VaPF4 en TSB + 1 % NaCl en 20 mL del mismo medio, desde donde se midió el crecimiento de VaPF4 hasta las 8 h mediante la densidad óptica del cultivo a 600 nanómetros (DO_{600}) y recuentos de bacterias totales (bacterias/mL) y células viables (UFC/mL). Se midió la DO_{600} en intervalos iniciales de 30 min e intervalos finales de 1 h. Los recuentos se realizaron cada 30-40 min. Cada experimento se realizó en duplicado, y la curva realizada por DO_{600} se realizó dos veces de manera independiente. La curva de crecimiento en base al recuento de bacterias totales y células viables se realizó sólo una vez.

Para el recuento de células viables, se plaquearon en triplicado las diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} del cultivo en TSA + 1 % NaCl utilizando microgotas de 5 µL. Para ello, en cada dilución en base 10 se agregaron 100 µL del cultivo en 900 µL de PBS. Luego de 24 h, se realizó un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC).

Para el recuento de células totales (bacterias/mL), se depositó por capilaridad la suspensión celular en una cámara de Petroff-Hausser (Marienfeld), contando las células presentes en cuadrados de 0,02 cm de lado y 0,02 mm de profundidad escogidos aleatoriamente, en un microscopio óptico Nikon Eclipse 50i. Para cada medición, se promedió el número de bacterias presentes en 5 cuadrados. El número de bacterias

totales/mL se calculó considerando la siguiente ecuación: bacterias/mL = n° bacterias/cuadrado * $1,25 * 10^6$ cuadrados/ mL.

Con el fin de validar el uso del método de recuento de células viables para monitorear la multiplicación celular, y teniendo en cuenta la relación de DO_{600} con UFC/mL determinada anteriormente, se comparó en una curva de crecimiento las concentraciones calculadas mediante DO_{600} con las calculadas por recuento celular. Las curvas de crecimiento y correlación se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc). Para los tres métodos, el tiempo de duplicación (T_{dup}) bacteriano se calculó en base a la relación $T_{dup} = \ln(2)/k$ (Murrell, 1991), donde k es la constante de crecimiento.

Marcaje de *V. anguillarum* PF4 con el fluoróforo DTAF

Para el marcaje de la bacteria con 5-(4,6-diclorotriazin-2-il) aminofluoresceína (DTAF), se realizó un mix de tinción disolviendo 2 mg de DTAF (Sigma-Aldrich) en 10 μ L de DMSO y 950 μ L de una solución Na_2HPO_4 0,05 M / 0,85 % NaCl. Se centrifugaron 2 mL de un cultivo *overnight* de VaPF4 a 3.000 x g por 10 min, se removió el sobrenadante y se añadió 1 mL del mix de tinción, agitando luego en vórtex por 10 s. Se incubó por 2 h a 28°C o 37 °C en un bloque térmico y luego se centrifugó a 5.000 x g por 10 min. El sobrenadante se removió y el pellet se lavó con Na_2HPO_4 0,05 M / 0,85 % NaCl hasta que el sobrenadante quedase transparente, resuspendiendo luego en 1 mL de TSB + 1 % NaCl. Para evaluar la permanencia de la marca en las siguientes generaciones, se inoculó VaPF4 marcado en TSB + 1 % NaCl (1:50) y se incubó a 28 °C y 150 rpm. Se evaluó si el protocolo de marcaje y/o la marca afectaba la multiplicación celular y si la

marca se mantenía en las nuevas generaciones. Se realizaron en paralelo curvas de crecimientos de un cultivo sin marcar con DTAF (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 516 nm) y uno marcado incubados durante 3,5 h mediante recuento celular en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i. Se tomaron fotografías digitales de los resultados con una cámara Nikon Ds-fi2, las que se procesaron posteriormente con el software Nis elements f (V. 4.00).

Visualización de *V. anguillarum* en larvas de pez cebra (*Danio rerio*)

Larvas de pez cebra *wildtype* (Tab5) o con neutrófilos que expresan GFP (Tg(MPO:GFP)) de 5 días post fertilización (dpf) se inocularon por inmersión durante 20 min en medio E3 + 0,5 % NaCl + VaPF4 marcado con DTAF a 10^7 o 10^8 UFC/mL a 28 °C o con VaPF4 sin marcar a 10^7 UFC/mL. Luego, cada larva fue lavada dos veces con 100 μ L de E3 + 0,5 % NaCl y resuspendida en 100 μ L de este medio.

Las larvas se anestesiaron con 4 % v/v de triclaína y se depositaron en gotas de E3 + 0,5 % NaCl en una placa, las que se observaron en un microscopio estereoscópico Leica MZ10F con luz visible y fluorescencia (λ_{em} 470 nm) con un aumento de 32X, obteniendo imágenes mediante una cámara digital (Q imaging) en el software Ocular (V. 2.0) o bien en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i con un aumento de 100X y 400X.

Estandarización de una técnica para el estudio del efecto de las levaduras probióticas en la motilidad de *V. anguillarum* PF4 *in vitro*

Se evaluó el uso de placas de agar blando para estudiar el efecto de las levaduras en la motilidad de VaPF4 mediante la inclusión de las cepas probióticas en agar blando de

TSB + 1 % NaCl. Los ensayos en monocapa se basaron en los trabajos de McGee y col. (1996) y Gao y col. (2018). Placas de TSB + 1 % NaCl + 0,25 % agar fueron suplementadas con un 50 % v/v de un cultivo de levadura crecido por 24 h en caldo YPD y ajustado a 10^7 y 10^6 UFC/mL. Luego de la gelificación del agar en las placas, en el centro, se depositó una gota de 2 μ L de un cultivo *overnight* de VaPF4. Luego de 24 h de incubación a 28 °C, el diámetro del halo de motilidad de VaPF4 fue medido en dos direcciones perpendiculares en milímetros con una regla y las placas fueron fotografiadas con una cámara digital.

Se evaluó una segunda estrategia con ensayos en bicapa. La capa inferior de 3 mL de agar YPD, se inoculó en su superficie (césped) con un cultivo de levadura ajustado a 10^7 UFC/mL. Las placas se incubaron por 18 h a 28 °C. Luego, se cubrió con una capa superior de 2 mL de TSB + 1 % NaCl + 0,4 % agar, que luego fue inoculado sobre el centro de la placa con VaPF4, como se describió previamente. Luego de 24 h de incubación a 28 °C, el diámetro de motilidad de VaPF4 fue medido y fotografiado como se describió anteriormente.

Una tercera estrategia consistió en el uso de agar blando (TSB + 0,87 % NaCl + 0,35 % agar) suplementado con un 13 % v/v de sobrenadante de un cultivo de levadura libre de células (SLC). El SLC se obtuvo a partir de la inoculación de una colonia fresca aislada en agar YPD en caldo YPD que se incubó a 28 °C por 18 h a 150 rpm, ajustando su concentración a $1,7 \times 10^7$ UFC/mL. Se centrifugó el cultivo a 9.500 rpm por 10 min y se esterilizó el sobrenadante filtrándolo por un filtro de 0,22 μ m. Se sembraron 100 μ L del SLC filtrado en una placa de YPD para verificar que no hubiese crecimiento de

microorganismos. Como grupo control se reemplazó el SLC por YPD estéril y agua destilada estéril.

Para la elaboración de las placas con SLC, se colocaron 3 mL de SLC calentado a 50 °C por 15 min en una placa Petri, donde luego se vertieron 20 mL de agar blando previamente derretido y se homogeneizó mediante agitación circular de la placa, dejando solidificar por 5 h. Luego, se agregó una gota de 2 μ L de un cultivo en fase exponencial de VaPF4 ajustado a 10^7 UFC/mL, se dejó secar por 30 min bajo campana y se incubó a 28 °C. Luego de 16 y 22 h de incubación, el diámetro de motilidad de VaPF4 se midió y fotografió como se describió anteriormente. El experimento se realizó con 4 réplicas técnicas por grupo experimental.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad Software, Inc.). Se compararon los métodos de determinación de concentración celular mediante la correlación de Spearman, considerando una correlación fuerte un coeficiente $r > 0,7$ (Hazra y Gogtay, 2016). Se compararon los puntos de las curvas de VaPF4 con y sin DTAF mediante una prueba t pareada. El experimento final en agar blando se realizó en forma independiente tres veces. Se corroboró que no hubiese diferencias entre réplicas mediante una prueba de Kruskal-Wallis con Dunn post hoc. Luego, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En caso de normalidad, se evaluó la diferencia entre grupos mediante una prueba ANOVA de una vía con Tukey post hoc, graficando promedio y desviación estándar. En caso contrario, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con Dunn post hoc, graficando

mediana y rango intercuartílico. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

Declaración ética

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética Animal del INTA y el comité central de Bioética Animal de la Universidad de Chile (CICUA y Proyecto FONDECYT 1181499).

RESULTADOS

Revisión de las técnicas disponibles para el estudio de la motilidad bacteriana

La motilidad bacteriana es una característica ampliamente distribuida que puede otorgar variadas ventajas para la célula, permitiendo su movimiento hacia condiciones más favorables y participando en procesos presentes en la relación bacteria-hospedero como la colonización e infección. Existen diferentes tipos de motilidad bacteriana y su expresión está altamente regulada por condiciones ambientales. Por ello, es necesario contar con métodos en los que se puedan controlar las condiciones y que éstas sean lo más similares a las condiciones naturales en las que prolifera la bacteria, ya sea en un ambiente biótico o abiótico. Con este fin, una gran cantidad de estrategias experimentales se ha desarrollado.

En esta revisión, se describieron las técnicas más usadas y los avances más recientes, discutiendo tanto sus ventajas como sus limitaciones. Las metodologías se clasificaron en macroscópicas y microscópicas, destacando las ventajas de la observación de trayectorias tridimensionales en las microscópicas. Finalmente, considerando la complejidad del estudio de la motilidad *in vivo*, se discutieron métodos descritos para el estudio de la motilidad en interacciones bacteria-hospedero, tanto en estrategias *in vitro* como *in vivo*, en los que se destacó el empleo del modelo de pez cebra. Esta mini-revisión se envió a la revista *Frontiers in Microbiology*. Se incluye el manuscrito enviado en la sección ANEXOS.

Tinción de *V. anguillarum* PF4 con el fluoróforo DTAF y su visualización dentro del tracto digestivo de pez cebra

Se evaluó si levaduras probióticas, que protegen al pez contra una infección por *V. anguillarum*, pueden inhibir la motilidad de este patógeno *in vivo* dentro del tracto digestivo de larvas de pez cebra. Para observar la bacteria *in vivo* en pez cebra, se marcó el patógeno VaPF4 con el fluoróforo DTAF (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 516 nm). El modelo de infección de *V. anguillarum* en pez cebra estandarizado en el laboratorio dura 4 días e incluye una inoculación del patógeno a los 5 dpf, hasta el día 8 dpf (en el que se observa aproximadamente un 50 % de mortalidad de las larvas). En este periodo, resultados previos en el laboratorio han mostrado que este patógeno se mantiene vivo dentro de la larva hasta el día 8 dpf.

En primer lugar, se evaluó si DTAF afectaba la viabilidad y proliferación *in vitro* de VaPF4. Para ello, se comparó el tiempo de duplicación (T_{dup}) de la bacteria marcada y no marcada calculado a partir de sus respectivas curvas de crecimiento. Además, se evaluó si la marca fluorescente se mantenía en las nuevas generaciones de VaPF4, por lo que se determinó el porcentaje de células fluorescentes versus totales, por microscopía fluorescente, en distintos puntos de la curva de crecimiento de la bacteria marcada.

La proliferación del patógeno se evaluó por diferentes metodologías: medición de la DO_{600} , recuento de UFC en placas y recuento celular en cámara de Petroff-Hausser. Se observó una fuerte correlación entre la curva de crecimiento de VaPF4 obtenida por medición de DO_{600} y las obtenidas mediante recuento de UFC en placas y recuento en

cámara de Petroff-Hausser (Fig. 1), siendo el T_{dup} de VaPF4 calculado mediante cada método de $41,6 \pm 2,5$, $43,1$ y $38,7$ minutos, respectivamente.

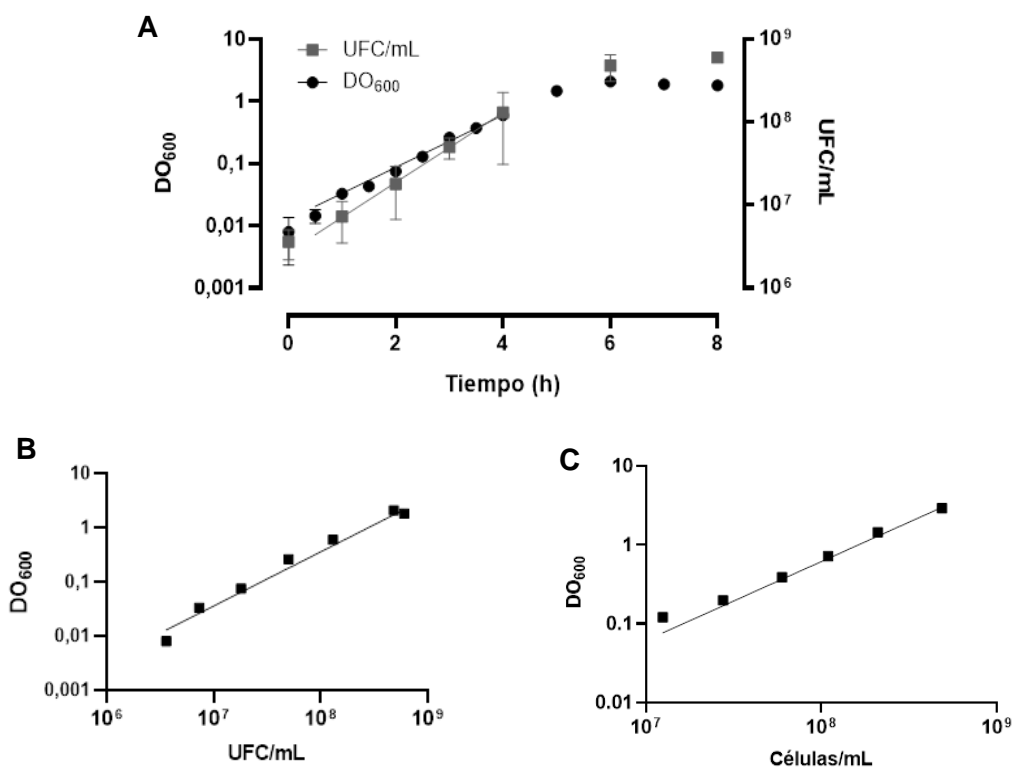


Figura 1. Curva de crecimiento de *V. anguillarum* PF4 (VaPF4) y comparación de los métodos para la determinación de concentración bacteriana. VaPF4 se creció en TSB + 1 % NaCl a 28 °C y 150 rpm. (a) Curvas de crecimiento obtenidas mediante medición de la DO₆₀₀ y recuento en placas (UFC/mL) (n = 3) y (b) correlación entre ambas curvas. (c) Correlación entre el crecimiento de VaPF4 determinado por DO₆₀₀ y por recuento en cámara de Petroff-Hausser mediante visualización en microscopio (Nikon Eclipse 50i). El coeficiente de correlación de Spearman indica que hay una fuerte correlación positiva y significativa entre la DO₆₀₀ y recuento

de VaPF4 viables (UFC/mL) ($r = 0,964$, $p < 0,05$) y entre la DO_{600} y el recuento celular de VaPF4 por microscopía ($r = 1$, $p < 0,05$).

Luego observamos el efecto de la tinción con DTAF en el crecimiento del patógeno. La curva de crecimiento de VaPF4 con DTAF obtenida por recuento celular no muestra diferencias respecto a la de VaPF4 sin marcar (Fig. 2A): no hay diferencias significativas entre los puntos de ambas curvas. Además, no se observó fluorescencia en el control sin teñir. En cuanto a la efectividad de la marca fluorescente, se observó que sólo una pequeña proporción de las células logra teñirse con DTAF inmediatamente después del protocolo de marcaje. La eficiencia de la tinción no mejoró al disminuir la temperatura: la mayoría de las bacterias queda sin marcar tanto a 28 °C ($80 \pm 3,76$ %) (Fig. 2B) como a 37 °C ($83 \pm 6,36$ %) (Fig. 2C). Se aprecia también que el porcentaje de bacterias fluorescentes decrece con el tiempo, llegando a valores cercanos a cero luego de 2 h, lo que sugiere que la marca no se transfiere a las nuevas generaciones de VaPF4. Debido a lo anterior, la observación de *V. anguillarum* marcado con DTAF en larvas de pez cebra, se realizó no más allá de 2 h después de marcar el patógeno.

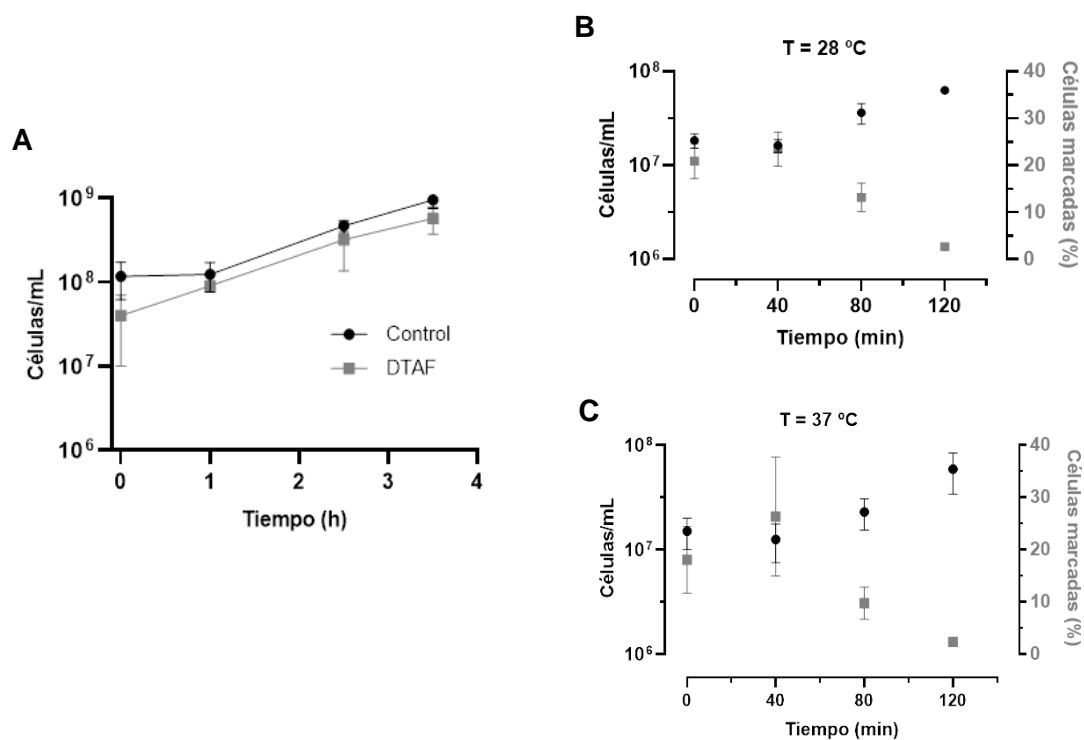


Figura 2. Efecto de la tinción con DTAF en la viabilidad de *V. anguillarum* PF4 (VaPF4) y porcentaje de bacterias marcadas en el tiempo. Se tiñeron 2 mL de un cultivo *overnight* de VaPF4 con DTAF ($\lambda_{ex} = 495$ nm, $\lambda_{em} = 516$ nm) según Tovar y col. (2002) a 28 °C. Se inocularon 20 μ L en 1 mL de TSB + 1 % NaCl y se incubó a 28 °C y 150 rpm. Se contó el número de células en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 50i) empleando una cámara de Petroff-Hauser a distintos tiempos. (a) Crecimiento a 28 °C de un cultivo de la bacteria marcada (■) con uno sin marcar (●). (b) Recuento de células totales en campo claro (●) y de células fluorescentes (■) (λ_{ex} 470 nm) cuando el marcaje fue realizado a 28 °C y (c) 37 °C. Las mediciones se realizaron cada 40 min, que corresponde al T_{dup} del patógeno a 28 °C. La prueba t pareada muestra que no hay diferencias significativas entre los puntos de ambas curvas en un mismo tiempo ($p > 0,05$).

Las larvas se inocularon por inmersión con dos concentraciones distintas de VaPF4 marcado con DTAF (10^7 y 10^8 UFC/mL) o DTAF sin marcar (10^8 UFC/mL). Luego de 20 min, se anestesiaron y observaron mediante microscopía de fluorescencia.

La idea original contemplaba la visualización de las bacterias dentro de pez cebra con microscopía confocal, lo que permitiría obtener imágenes con un mayor aumento y resolución. Sin embargo, esto no fue posible debido a la poca disponibilidad de larvas de pez cebra y al difícil acceso a éstas y al microscopio confocal ubicado en un laboratorio de la Universidad Andrés Bello, en el centro de Santiago, cuyo acceso fue restringido debido a la situación a nivel país. Debido a lo anterior, se decidió evaluar la motilidad de *V. anguillarum* en un ensayo *in vitro* en el laboratorio del INTA, en Macul.

Con ambas concentraciones de bacteria marcada se observó fluorescencia a lo largo de la zona intestinal de las larvas, indicando la presencia de VaPF4 en esta zona, siendo la intensidad de la fluorescencia mayor en las larvas inoculadas con la concentración más alta de VaPF4 (Fig. 3A). Sin embargo, no se lograron identificar células bacterianas individuales incluso con un mayor aumento (400X) en el microscopio de fluorescencia debido a la elevada autofluorescencia (Fig. 3B). A este aumento y en zonas con menor autofluorescencia, se logró ver puntos fluorescentes; sin embargo, la línea de larvas empleada (Tg(MPO:GFP)) tiene neutrófilos marcados con GFP, por lo que no fue posible asociar los puntos fluorescentes a VaPF4.

Figura 3. Visualización de *V.*

anguillarum PF4 (VaPF4) en

larvas de pez cebra. Se inocularon

mediante inmersión larvas de pez

cebra (5 dpf) con VaPF4 marcado

con DTAF (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 516 nm)

por 20 min, se anestesiaron con

triclaína (4 % v/v) y se visualizaron

en campo claro y de fluorescencia

(λ_{ex} 470 nm). (a) Larvas Tab5

inoculadas con VaPF4 con DTAF a

10^7 y 10^8 UFC/mL, sin inocular

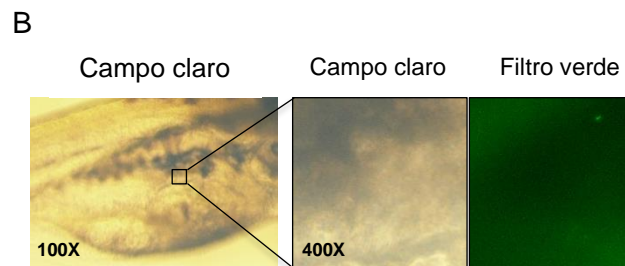
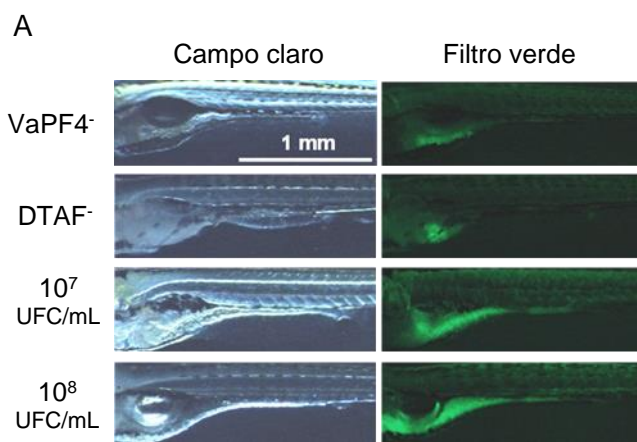
(VaPF4⁻) e inoculadas con VaPF4

sin DTAF a 10^8 UFC/mL (DTAF⁻) y visualizadas en un estereoscopio de fluorescencia (Leica

MZ10F) (32X). La barra de escala corresponde a 1 mm. (b) Larva Tg(MPO:GFP) inoculada con

10^8 UFC/mL de VaPF4 marcado con DTAF y visualizada en un microscopio de fluorescencia

(Nikon Eclipse 50i) (100X y 400X).



Evaluación del efecto de *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 en la motilidad de *V. anguillarum* PF4 *in vitro*

Debido a que el método *in vivo* no permitió evaluar los cambios en la motilidad y distribución del patógeno en la larva, se optó por un ensayo *in vitro* para evaluar la capacidad de las levaduras de inhibir la motilidad de VaPF4. Así, se trabajó en estandarizar un método basado en el uso de agar blando.

La primera estrategia consistió en incluir las levaduras (10^6 y 10^7 UFC/mL) en el agar blando y sembrar el patógeno sobre la superficie (Fig. S1A). En todas las condiciones experimentales hubo crecimiento de las levaduras sobre el agar, difundiéndose a través de éste hasta los bordes de la placa, por lo que no se pudo observar ni medir la motilidad del patógeno. Por lo anterior, se cambió el ensayo a uno con bicapa en los que en la capa inferior se incluyeron las levaduras (Fig. S1B) para que los metabolitos difundieran hacia la capa superior, la cual fue inoculada con VaPF4. Ya que el agar a este porcentaje (0,25 %) no gelificaba completamente, se decidió aumentar la concentración de agar a 0,4 %, considerando que ya se había empleado anteriormente este porcentaje para evaluar motilidad de la cepa VaPF4 (León y col., 2019). En este ensayo, las levaduras crecieron en la capa superior, siendo 10^3 UFC/mL la concentración máxima evaluada de YI242 en la que los bordes del halo de la bacteria logran visualizarse, por lo que se optó por estudiar el efecto del sobrenadante de levaduras sobre la motilidad del patógeno.

En la tercera estrategia (Fig. 4A), se incorporó en el agar blando el sobrenadante libre de células (SLC) de las levaduras. Se estandarizaron las condiciones con el fin de evitar irregularidades en el halo de la bacteria, incorporando el mayor volumen de SLC que no afectara la gelificación del agar. Por consiguiente, se midió el diámetro de motilidad de VaPF4 incubado por 22 h en placas de TSB suplementadas con un 13 % v/v de SLC de un cultivo de 18 h de Dh97 o YI242. Como control, se reemplazó el SLC por agua destilada estéril o medio YPD estéril. Los resultados muestran que la mediana del diámetro de motilidad del patógeno en el grupo control con YPD fue de 26,0 mm y 32,5 mm a las 18 y 22 h, respectivamente (Fig. 4B). El diámetro del halo de VaPF4 en placas

suplementadas con agua destilada estéril, SLC de Dh97 o YI242 no presentó diferencias estadísticamente significativas, por lo que dicha suplementación no afectó la motilidad de VaPF4 en las condiciones estudiadas (Fig. 4A y B).

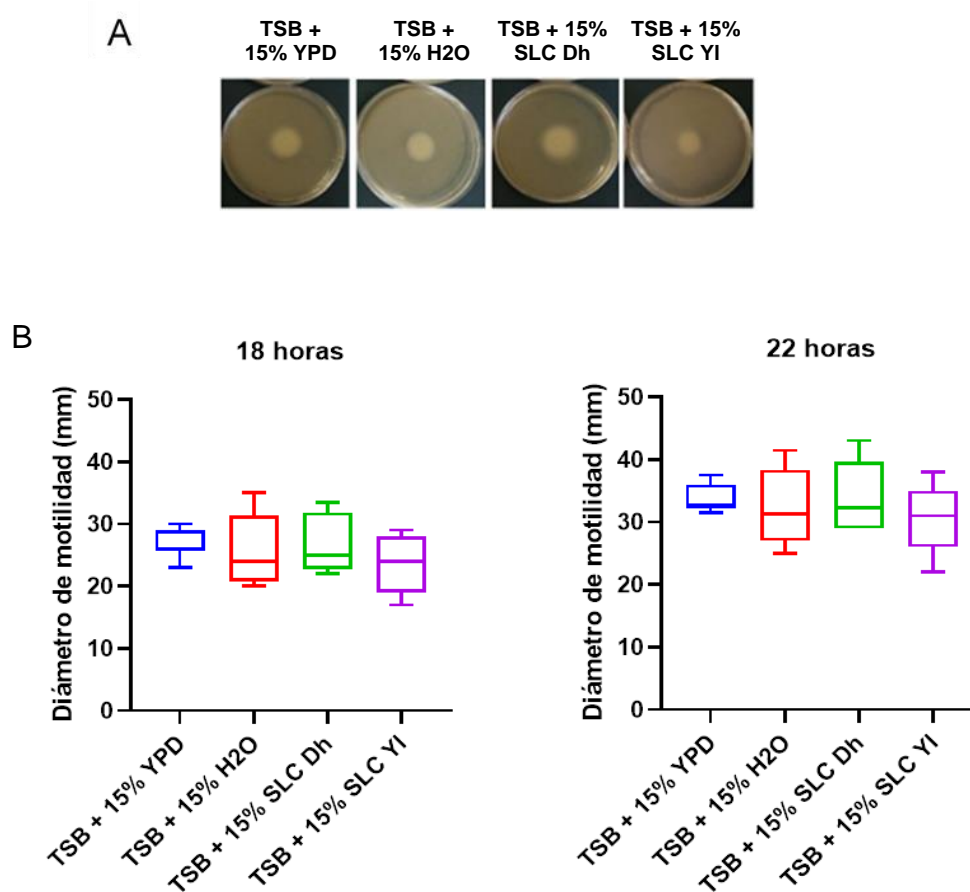


Figura 4. Los sobrenadantes de *D. hansenii* 97 (Dh97) y *Y. lipolytica* 242 (YI242) no modifican el diámetro de motilidad de *V. anguillarum* PF4 (VaPF4). (a) Placas de TSB + 0,87 % NaCl + 0,35 % agar suplementadas con un 13 % v/v de agua destilada estéril (H2O), medio YPD estéril (YPD) y sobrenadante libre de células de cultivos de 18 h de Dh97 (SLC Dh) y YI242 (SLC YI), todos previamente incubados a 50 °C por 15 min. Una vez secas, se inocularon 2 μ L

de VaPF4 ($1,4 \times 10^7$ UFC/mL) al centro de la placa y se incubó a 28 °C. **(b)** Las cajas indican el rango intercuartílico y la línea central corresponde a la mediana del diámetro del halo producido por VaPF4 en cada grupo (n = 8-11). Los bigotes se extienden hasta los valores mínimos y máximos. La prueba Kruskal-Wallis indica que no hubo diferencias significativas entre tratamientos a ambos tiempos ($p > 0,05$).

DISCUSION

Debido al creciente interés del uso de probióticos en la acuicultura, se hace necesario investigar los mecanismos por los que estos microorganismos ejercen su efecto benéfico en el pez. Uno de estos beneficios es la protección contra patógenos, la cual puede ser causada por una disminución de la virulencia, siendo la motilidad un factor posiblemente afectado. Estudios previos han descrito que la cepa probiótica *S. boulardii* BIOCODEX disminuye la motilidad del patógeno *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL1344 *in vitro* (Pontier-Bres y col., 2012), y *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 redujo la motilidad de especies de *Vibrio* en cocultivo (Torres y col., 2016). Se ha demostrado que las cepas de levadura probióticas *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 protegen a larvas de pez cebrá contra la infección causada por VaPF4. Para esta bacteria, la motilidad es necesaria en las etapas iniciales de la infección. En el presente estudio, se investigó el efecto de Dh97 y Y1242 en la motilidad de este patógeno.

Mini-revisión sobre las técnicas disponibles para el estudio de la motilidad bacteriana

La revisión más reciente sobre técnicas de estudio de motilidad bacteriana data de más de una década (Aygan & Arikan, 2007). Considerando esto, se realizó una mini-revisión que incluyera los avances metodológicos descritos en los últimos años. Al respecto, los mayores avances se relacionan con la adopción de técnicas microscópicas que permiten evaluar trayectorias bacterianas tridimensionales con mayor resolución y, en ciertos casos, observar la motilidad dentro del tracto digestivo de un hospedero transparente,

como larvas de pez cebra. Se concluyó que la elección óptima de la metodología a emplear dependerá de la pregunta específica a responder y los requerimientos del experimento a realizar, pudiendo complementarse los resultados obtenidos mediante diferentes estrategias experimentales.

El marcaje de *V. anguillarum* PF4 con DTAF permite visualizar *in vivo* la presencia del patógeno dentro del tracto digestivo de pez cebra

Se marcó VaPF4 con el fluoróforo DTAF para evaluar si era posible observar directamente el movimiento de la bacteria marcada dentro del tracto digestivo en larvas de pez cebra. El marcaje con DTAF no causó una variación en el T_{dup} de VaPF4, por lo que el compuesto no afecta la división celular. El compuesto marca a las células; sin embargo, sólo marca una minoría de la población, lo que podría estar relacionado con la baja disolución del fluoróforo observada en el procedimiento. Además, la fluorescencia no se observó en las siguientes generaciones, detectándose un porcentaje de VaPF4 fluorescente cercano a 0 en la tercera generación (correspondiente a 120 min, según el T_{dup} del patógeno). Una posible explicación sería que la división de la membrana, en donde DTAF se une covalentemente con los N-terminales de las proteínas dispersa las moléculas de DTAF, llegando a una concentración menor a la necesaria para ser detectable en el microscopio de fluorescencia empleado.

Tomando todo esto en consideración, se procedió a realizar los experimentos *in vivo* en los tiempos iniciales de la infección (es decir, hasta 2 h luego de la inoculación de larvas con VaPF4 marcado con DTAF). En estos experimentos, el principal problema fue la

autofluorescencia en el tracto gastrointestinal de las larvas, la cual dificultó la observación de la fluorescencia proveniente de bacteria. La autofluorescencia en pez cebra ya se ha observado anteriormente, asociándose a las zonas más opacas del pez tales como los ojos y el saco vitelino a los 3 dpf (Shi y col., 2009) y al tracto gastrointestinal en larvas a los 6 dpf (Abdelmoneim y col., 2020). En este último caso, se empleó un filtro mCherry (λ_{ex} 560 nm) para distinguir la fluorescencia debida a la expresión de GFP asociada a la expresión del gen *vtg1* de la fluorescencia inespecífica. Esto podría ser una alternativa para diferenciar la autofluorescencia de las bacterias marcadas con DTAF.

Pese a ello, las larvas infectadas con bacteria sin marcar no presentaron fluorescencia acentuada a lo largo del intestino, que es donde coloniza *V. anguillarum* (O'toole y col., 2004; Caruffo y col., 2015; Wiles y col., 2016), mientras que en las larvas inoculadas con VaPF4 marcado con DTAF sí se observó fluorescencia intensa en todo el intestino, siendo esta intensidad dependiente de la dosis (Fig. 3A).

En los experimentos realizados no se logró identificar bacterias individuales dentro del pez cebra. Se ha descrito que cepas de *V. anguillarum* que expresan GFP logran visualizarse como células independientes dentro del intestino de larvas 6-8 dpf de pez cebra mediante microscopía confocal (O'toole y col., 2004). Más recientemente, se ha empleado microscopía *light-sheet* en larvas de 5-7 dpf inoculadas con una cepa de *Vibrio* (ZWU0020) que expresa GFP o dTomato (λ_{ex} 554 nm, λ_{em} 581 nm), permitiendo estudiar la motilidad tipo *swimming in vivo* (Wiles y col., 2016; Wiles y col., 2020). En cambio, en el marcaje de VaPF4 con el fluoróforo DTAF (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 516 nm) realizado anteriormente (Caruffo y col., 2015) no se observaron células individuales,

aunque si se observó fluorescencia verde en el intestino de larvas de pez cebra Tg(Lyz:DsRed)^{nz50} 5 dpf inoculadas con 10^7 UFC/mL del patógeno marcado con DTAF. En comparación, aquí se observó un nivel de fluorescencia similar con 10^8 UFC/mL, lo cual podría atribuirse al bajo porcentaje de células que se tiñó. Si bien el marcaje con DTAF permite visualizar la fluorescencia de VaPF4 marcado dentro de las larvas, no permitió evaluar la motilidad bacteriana con el microscopio empleado. Por ello, se procedió a buscar una estrategia distinta para evaluar efectos de las levaduras en la motilidad de VaPF4.

Estandarización de una técnica para evaluar el efecto de *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 en la motilidad de *V. anguillarum*

Debido a la complejidad de estudiar el comportamiento de un microorganismo dentro de un hospedero, muchos estudios optan por utilizar métodos *in vitro*. Una alternativa es la evaluación de la motilidad en agar semisólido. Esta técnica ha sido empleada anteriormente para estudiar la motilidad bacteriana, simulando condiciones intra-hospedero (Yeung y col., 2012; Robinson y col., 2018; Courson y col., 2019), por lo que se utilizó esta estrategia para evaluar el efecto de las levaduras en la motilidad de VaPF4.

En la estandarización del método, se comenzó utilizando placas con un 0,25 % de agar, porcentaje que se emplea para evaluar motilidad de tipo *swimming* (Partridge & Harshey, 2020). Sin embargo, el crecimiento levaduriforme en toda la superficie de placa no permitió evaluar el diámetro de motilidad de VaPF4. Para evitar el crecimiento de levaduras en la superficie del agar, se separó la inoculación de las levaduras de la del

patógeno mediante el uso de doble capa. Esta estrategia apunta a que sean los compuestos secretados por las levaduras que difundan a través del agar los que ejerzan un efecto en la motilidad de la bacteria. En el control sin levadura, VaPF4 se expandió hasta los bordes, por lo que se aumentó el porcentaje de agar del medio.

El método de agar de doble capa usualmente incluye el sobrenadante de un lisado de la cepa productora de metabolitos (Cesa-Luna y col., 2020). Considerando su tasa de crecimiento, se esperaba que la proliferación de algunas colonias de levadura en la superficie no perjudicase la visualización del halo de motilidad. Si bien este fue el caso con Dh97 (10^7 UFC/mL), YI242 cubrió parcialmente a VaPF4 incluso a 10^3 UFC/mL, por lo cual se descartó la inclusión de células de levadura en las placas. Por otra parte, ya que el aumento del porcentaje de agar a 0,4 % evitó que el halo de motilidad de VaPF4 llegase al borde de la placa, se mantuvo este porcentaje en los siguientes experimentos. Este porcentaje sigue dentro del rango empleado para evaluar *swimming*.

Debido a lo anterior, se incorporó el sobrenadante libre de células (SLC) del cultivo de cada levadura en el agar (Vahedi-shahandashti y col., 2017; Limoli y col., 2019; Shin & Eom, 2020). En este ensayo, se controlaron factores ambientales que pudieran afectar la motilidad del patógeno tales como temperatura y tiempo de secado de las placas (Tremblay & Déziel, 2008). Esto ayudó a que el tamaño de los halos de motilidad de VaPF4 no presentaran diferencias estadísticamente significativas entre réplicas experimentales.

El sobrenadante libre de células de *D. hansenii* 97 y *Y. lipolytica* 242 no afectó la motilidad *in vitro* de *V. anguillarum*

Se ha demostrado que el SLC de algunas cepas probióticas contiene compuestos que pueden afectar la motilidad de un microorganismo patógeno. Por ejemplo, los SLC de cultivos *overnight* de dos cepas de lactobacilos (ATCC 4356 y ATCC 8014) en una concentración de 4 % v/v inhibieron por completo el *swarming* de *Serratia marcescens* (Vahedi-shahandashti y col., 2017). De manera similar, un 12,5 % v/v de SLC de *Clostridium butyricum* (ATCC 19398) cultivado por 24 h inhibió parcialmente la motilidad tipo *twitching* de *Acinetobacter baumannii* (aislado clínico P2713) (Shin & Eom, 2020). En ambos casos, el efecto se atribuyó a ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante. En levadura, la modificación en la motilidad de *S. typhimurium* por parte de *S. boulardii* se debe conjuntamente a un efecto estérico y a componentes presentes en el sobrenadante que no fueron identificados (Pointer-Bres y col., 2012).

En este estudio, se realizó un ensayo de motilidad en placas de agar blando suplementadas con SLC de Dh97 y YI242 para evaluar su efecto en la motilidad de VaPF4. Los resultados mostraron que un 13 % v/v de SLC levaduras no afectó el diámetro del halo de VaPF4 medido luego de 18 o 22 h de incubación del patógeno a 28 °C. La adición de agua destilada estéril tampoco causó un efecto, lo que era esperable al tratarse de una leve dilución de un medio alto en nutrientes. Estos resultados apuntan a que el efecto protector de Dh97 y YI242 contra *V. anguillarum* no pareciera relacionarse con un cambio en la motilidad del patógeno.

Aun así, un efecto en la motilidad de *V. anguillarum* por parte de las levaduras no puede descartarse. Para empezar, esta bacteria no sólo tiene motilidad tipo *swimming*, sino también es capaz de realizar *swarming* y presenta pili tipo IV, por lo que podría tener motilidad tipo *twitching* (Frans y col., 2013; Kiran y col., 2016). Tal y como se señaló en

la mini-revisión, estos tipos de motilidad se manifiestan con un porcentaje más alto de agar. Así, es posible que las levaduras probióticas tengan un efecto en otro tipo de motilidad de *V. anguillarum* sin afectar su *swimming* (Caiazza y col., 2005; Limoli y col., 2019), lo cual no podría haberse detectado con el porcentaje de agar empleado.

Se ha observado que el grado de inhibición de la motilidad suele ser directamente proporcional a la concentración de SLC empleada (Vahedi-shahandashti y col., 2017; Shin & Eom, 2020; Limoli y col., 2019). Por consiguiente, podría ser necesaria una concentración mayor de SLC para lograr observar un efecto en el diámetro de motilidad de VaPF4; sin embargo, considerando las concentraciones empleadas por estos estudios, este no parece ser el caso. Otra posibilidad es que el componente capaz de modular la motilidad no se encuentre en el sobrenadante. Por ejemplo, el contacto directo con *Campylobacter jejuni* 11168 no viable induce motilidad de fenotipo filamentoso en *Bacillus mobilis* ML-A2C4, siendo este efecto atribuible a los fosfolípidos de membrana de *C. jejuni* (Liu y col., 2020).

Al ser un ensayo *in vitro*, las condiciones experimentales pueden haber sido insuficientes para reproducir el ambiente intra-hospedero (Wiles y col. 2016; Robinson y col., 2018; Schlomann y col., 2019; Wiles y col., 2020). En el estudio de Robinson y col. (2018), aislados de *Aeromonas veronii* que fueron sucesivamente inoculados en larvas de pez cebra, es decir, que colonizaron varias veces el intestino de las larvas, presentaron un aumento de motilidad respecto al aislado inicial. Esta diferencia de motilidad entre los aislados se logró detectar en ensayos de motilidad *in vitro* usando placas de agar blando suplementadas con medio de cultivo de las larvas, pero no al emplear medio TSB. Esto

indica que es posible que el efecto en la motilidad de VaPF4 no se haya observado debido a que el medio empleado no reflejó con precisión la condición *in vivo*.

Modificaciones en el protocolo permitirían detectar efectos de las levaduras sobre la motilidad del patógeno. Por ejemplo, se podría suplementar el agar blando con un lisado de las células de levadura para incluir el efecto de los componentes intracelulares y de la pared celular. Por otro lado, la suplementación del agar blando con el medio de cultivo de las larvas permitiría acercarse a las condiciones intra-hospedero (Robinson 2018; Schlomann y col., 2019). La complementación con alguna de las técnicas microscópicas señaladas en la mini-revisión, como la microscopía confocal o *light-sheet* presentaría la ventaja del estudio a nivel celular en la motilidad del patógeno, siendo posible también retomar la metodología *in vivo* reemplazando el marcaje con DTAF por la cepa de *V. anguillarum* PF4 con expresión de GFP u otro fluoróforo.

Aún quedan por evaluar otros mecanismos por los que las levaduras Dh97 y YI242 podrían mitigar la infección de *V. anguillarum* en las larvas de pez cebra, tales como el reforzamiento de la barrera epitelial, la cual evitaría la translocación del patógeno (Smith y col., 2015), o la competencia por sitios de adhesión en la mucosa epitelial, lo que dificultaría la colonización del tracto gastrointestinal por parte de ciertos patógenos, incluyendo *V. anguillarum* (Sorroza y col., 2012; Zorriehzahra y col., 2016). Otra opción es la evaluación de cambios a nivel transcripcional no sólo de genes que codifican para proteínas implicadas en la motilidad del patógeno durante la infección, sino que también de otros factores de virulencia y procesos relacionados tales como el *quorum sensing* (Zhao y col., 2019), permitiendo obtener un panorama global del efecto de las levaduras en la virulencia del patógeno dentro del hospedero.

CONCLUSIONES

La motilidad bacteriana es una característica de gran interés de estudio, pues otorga ventajas para la supervivencia de la bacteria y, en algunos casos, su patogenicidad. Por ello, se espera que la mini-revisión realizada permita facilitar una elección metodológica óptima para futuros estudios de motilidad bacteriana, sobre todo en casos que involucren un hospedero.

En cuanto a la visualización de VaPF4 dentro de larvas de pez cebra, el marcaje con DTAF produjo un bajo porcentaje de bacterias fluorescentes. Pese a ello, se pudo observar al patógeno dentro del tracto digestivo de larvas de pez cebra desafiadas con VaPF4 durante la primera hora de infección. En este sentido, se recomienda utilizar la cepa que exprese un fluoróforo como GFP, pues la marca se mantiene en las siguientes generaciones y ya se empleó para seguir movimiento bacteriano dentro de pez cebra.

Los resultados mostraron que el SLC de Dh97 y YL242 no causan un efecto en la motilidad del patógeno. Así, la capacidad de Dh97 y YL242 de mitigar la infección de VaPF4 en larvas de pez cebra no pareciera relacionarse con una disminución en la motilidad del patógeno. Sin embargo, no se pueden descartar otras posibilidades como, por ejemplo, que estas levaduras afecten otro tipo de motilidad, que la concentración de SLC empleada sea demasiado baja para ver un efecto o que el componente que module la motilidad bacteriana no se encuentre en el sobrenadante. Por lo tanto, se refuta parcialmente la hipótesis de este trabajo, siendo necesarios más estudios que incluyan la evaluación de estas posibilidades.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Tawwab, M. 2008. The preference of the Omnivorous–Macrophagous, *Tilapia zillii* (Gervais), to consume a natural free-floating fern, *Azolla pinnata*. J. World Aquac. Soc. **39(1)**, 104-112.
2. Abdelmoneim, A., Clark, C. L., & Mukai, M. 2020. Fluorescent reporter zebrafish line for estrogenic compound screening generated using a CRISPR/Cas9-Mediated knock-in system. Toxicol. Sci. **173(2)**, 336–346.
3. Aguilar-Macías, O. L., Ojeda-Ramírez, J. J., Campa-Córdova, A. I., & Saucedo, P. E. 2010. Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during Late hatchery and early field culturing. J. World Aquac. Soc. **41(3)**, 447–454.
4. Alamillo, E., Reyes-Becerril, M., Cuesta, A., & Angulo, C. 2017. Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. Fish Shellfish Immunol., 70, 48–56.
5. Angulo, C., Maldonado, M., Delgado, K., & Reyes-Becerril, M. 2017. *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. Develop. Comp. Immunol. **71**, 18–27.
6. Austin, B., & Austin, D. A. 2016. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish (6th ed.). Springer International Publishing.
7. Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I., & Griffith, D. R. W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis., **18(1)**, 93-96.
8. Aygan, A., & Arıkan, B. 2007. Mini Review An Overview on Bacterial Motility Detection. Int. J. Agri. Biol. **9(1)**, 193–196.
9. Ayiku, S., Shen, J. fei, Tan, B. ping, Dong, X. hui, & Liu, H. yu. 2020. Effects of dietary yeast culture on shrimp growth, immune response, intestinal health and disease resistance against *Vibrio harveyi*. Fish Shellfish Immunol. **102**, 286–295.
10. Bernardeau, M., Gueguen, M., Smith, D. G. E., Corona-Barrera, E., & Vernoux, J. P. 2009. *In vitro* antagonistic activities of *Lactobacillus spp.* against *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. Vet. Microbiol., **138(1–2)**, 184–190.
11. Bisson, J. F., Hidalgo, S., Rozan, P., & Messaoudi, M. 2010. Preventive effects of different probiotic formulations on travelers' diarrhea model in wistar rats: Preventive effects of probiotics on TD. Dig. Dis. Sci. **55(4)**, 911–919.
12. Boesen, H. T., Pedersen, K., Larsen, J. L., Koch, C., & Ellis, A. E. 1999. *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: Role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. Infect. Immun. **67(1)**, 294–301.
13. Børgwald, J., & Dalmo, R. A. 2019. Review on immersion vaccines for fish: An update. Microorganisms, **7(12)**, 1–28.
14. Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., y col. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Environ. Microbiol., 15(7), 1917–1942.

15. Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., & O'Toole, G. A. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187(21)**: 7351–7361.
16. Carballo, C., Pinto, P. I. S., Mateus, A. P., Berbel, C., Guerreiro, C. C., Martinez-Blanch, J. F., Codoñer, F. M., y col. 2019. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.* **92(May)**: 31–39.
17. Caruffo, M., Navarrete, N. C., Salgado, O. A., Faúndez, N. B., Gajardo, M. C., y col. 2016. Protective yeasts control *V. anguillarum* pathogenicity and modulate the innate immune response of challenged zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **6(Oct)**: 1–14.
18. Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, y col. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Front. Microbiol.*, **6(Oct)**: 1–9.
19. Castillo, D., Alvisé, P. D., Xu, R., Zhang, F., Middelboe, M., & Gram, L. 2017. Comparative genome analyses of *Vibrio anguillarum* strains reveal a link with pathogenicity traits. *Msystems*, **2(1)**: e00001-17.
20. Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. 2015. The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **46**: 91–103.
21. Courson, D. S., Pokhrel, A., Scott, C., Madril, M., Rinehold, A. J., Tamayo, R., Cheney, R. E., y col. 2019. Single cell analysis of nutrient regulation of *Clostridioides (Clostridium) difficile* motility. *Anaerobe*, **59**: 205–211.
22. de Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G. F., & Raaijmakers, J. M. 2018. Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94(1)**: 1–12.
23. FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in action. Rome.
24. Frans, I., Busschaert, P., Dierckens, K., Michiels, C. W., Willems, K. A., Lievens, y col. 2013. Are type IV pili involved in *Vibrio anguillarum* virulence towards sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Agric. Sci.* **04(06)**: 30–38.
25. Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* **34(9)**: 643–661.
26. Gainza, O., & Romero, J. 2017. Manano oligosacáridos como prebióticos en acuicultura de crustáceos. *Latin American J. Aquatic Res.* **45(2)**: 246–260.
27. Gao, X., Pi, D., Chen, N., Li, X., Liu, X., Yang, y col. 2018. Survival, Virulent Characteristics, and Transcriptomic Analyses of the Pathogenic *Vibrio anguillarum* Under Starvation Stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **8(Nov)**: 389.
28. Gildberg, A., & Mikkelsen, H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, **167(1–2)**: 103–113.
29. Gonçalves, A. T., & Gallardo-Escárate, C. 2017. Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre- and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Microbiol.*, **122(5)**: 1333–1347.
30. Hansen, G. H., & Olafsen, J. A. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* **38(1)**: 1–26.
31. Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Front. Microbiol.* **3(Dic)**: 1–12.
32. Hazra, A., & Gogtay, N. 2016. Biostatistics Series Module 6: Correlation and Linear Regression. *Indian J. Dermatol.* **61(6)**: 593–601.

33. Henriksen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* **36(4)**: 478–503.
34. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., y col. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11(8)**: 506–514.
35. Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., & Zhou, Z. 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Front. Microbiol.*, **9(Oct)**: 1–18.
36. Jansen, P. A., Kristoffersen, A. B., Viljugrein, H., Jimenez, D., Aldrin, M., & Stien, A. 2012. Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* **279(1737)**: 2330–2338.
37. Josenhans, C. & Suerbaum, S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291(8)**: 605–614.
38. Khan, F., Tabassum, N., Anand, R., & Kim, Y. M. 2020. Motility of *Vibrio spp.*: regulation and controlling strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **104(19)**: 8187–8208.
39. Kiran, G. S., Priyadarshini, S., Dobson, A. D. W., Gnanamani, E., & Selvin, J. 2016. Degradation intermediates of polyhydroxy butyrate inhibits phenotypic expression of virulence factors and biofilm formation in luminescent *Vibrio sp.* PUGSK8. *Npj Biofilms Microbiomes*, **2(Mar)**: 16002.
40. Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., y col. 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **7**: 471–496.
41. Langdon, A., Crook, N., & Dantas, G. 2016. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.*, **8(1)**: 39.
42. Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol.* **45(1)**: 2–12.
43. León, M., Kokkari, C., García, K., Castillo, D., Katharios, P., & Bastías, R. 2019. Diversification of *Vibrio anguillarum* driven by the bacteriophage CHOED. *Front. Microbiol.*, **10(Jun)**: 1–15.
44. Licon-Jain, A., Campa-Córdova, Á., Luna-González, A., Racotta, I. S., Tello, M., & Angulo, C. 2020. Dietary supplementation of marine yeast *Yarrowia lipolytica* modulates immune response in *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **105(Abr)**: 469–476.
45. Limoli, D. H., Warren, E. A., Yarrington, K. D., Donegan, N. P., Cheung, A. L., & O'Toole, G. A. 2019. Interspecies interactions induce exploratory motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *ELife*, **8**: 1–24.
46. Liu, M. M., Coleman, S., Wilkinson, L., Smith, M. L., Hoang, T., Niyah, N., y col. 2020. Unique inducible filamentous motility identified in pathogenic *Bacillus cereus* group species. *ISME J.* **14(12)**: 2997–3010.
47. López Nadal, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Sipkema, D., Peggs, D., McGurk, C., Forlenza, M., y col. 2020. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Front. Immunol.* **11(Feb)**: 114.
48. Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D., & Martinko, J. M. 2010. Brock biology of microorganisms (13th ed.). Benjamin Cummings, San Francisco.
49. McGee, K., Hörstedt, P., & Milton, D. L. 1996. Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178(17)**: 5188–5198.

50. Medina, E., & Pieper, D. H. 2016. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **398**: 3-33.
51. Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Børgwald, J., y col. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, **302(1–2)**: 1–18.
52. Millet, Y. A., Alvarez, D., Ringgaard, S., von Andrian, U. H., Davis, B. M., & Waldor, M. K. 2014. Insights into *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization from Monitoring Fluorescently Labeled Bacteria. *PLoS Pathog.* **10(10)**: e1004405
53. Milton, D. L., O'Toole, R., Hörstedt, P., & Wolf-Watz, H. 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*, **178(5)**: 1310–1319.
54. Miyata, M., Robinson, R. C., Uyeda, T. Q. P., Fukumori, Y., Fukushima, S. ichi, Haruta, y col. 2020. Tree of motility – A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes Cells*, **25(1)**: 6–21.
55. Muktar, Y., & Tesfaye, S. 2016. Present Status and Future Prospects of Fish Vaccination: A Review. *J. Vet. Sci. Tech.* **07(02)**.
56. Navarrete, P., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., & Romero, J. 2008. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. *J. Aquat. Anim. Health*, **20(3)**: 177-183.
57. O'Toole, R., Lundberg, S., Fredriksson, S. Å., Jansson, A., Nilsson, B., & Wolf-Watz, H. 1999. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *J. Bacteriol.*, **181(14)**: 4308–4317.
58. O'Toole, R., Milton, D. L., & Wolf-Watz, H. 1996. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Mol. Microbiol.*, **19(3)**: 625–637.
59. O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. E., & Wolf-Watz, H. 2004. Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* **37(1)**, 41–46.
60. Ormonde, P., Hörstedt, P., O'Toole, R., & Milton, D. L. 2000. Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **182(8)**: 2326–2328.
61. Oyarbide, U., Iturria, I., Rainieri, S., & Pardo, M. A. (015. Use of gnotobiotic zebrafish to study *Vibrio anguillarum* pathogenicity. *Zebrafish*, **12(1)**: 71–80.
62. Parthasarathy, R. 2018. Monitoring Microbial Communities using Light Sheet Fluorescence Microscopy. *Curr. Opin. Microbiol.*, **43**: 31–37.
63. Partridge, J. D., & Harshey, R. M. 2020. Investigating flagella-driven motility in *Escherichia coli* by applying three established techniques in a series. *J. Vis. Exp.* **159**: 1–8.
64. Pérez-Etayo, L., González, D., & Vitas, A. I. 2020. The aquatic ecosystem, a good environment for the horizontal transfer of antimicrobial resistance and virulence-associated factors among extended spectrum β -lactamases producing *E. coli*. *Microorganisms*, **8(4)**: 568.
65. Pérez-Ramos, A., Mohedano, M. L., Pardo, M., & López, P. 2018. β -glucan-producing *Pediococcus parvulus* 2.6: Test of probiotic and immunomodulatory properties in zebrafish models. *Front. Microbiol.* **9(JUL)**: 1–18.
66. Peulen, O., Deloyer, P., Grandfils, C., Loret, S., & Dandrifosse, G. 2000. Intestinal maturation induced by spermine in young animals. *Livestock Production Science*, **66(2)**: 109–120.
67. Pontier-Bres, R., Prodon, F., Munro, P., Rampal, P., Lemichez, E., Peyron, J. F., y col. 2012. Modification of *Salmonella typhimurium* motility by the probiotic yeast strain *Saccharomyces boulardii*. *PLoS ONE*, **7(3)**: e33796.
68. Qin, C., Xie, Y., Wang, Y., Li, S., Ran, C., He, S., y col. 2018. Impact of *Lactobacillus casei* BL23 on the host transcriptome, growth and disease resistance in larval zebrafish. *Front. Physiol.* **9**: 1245.

69. Quentel C., Gatesoupe F. J., Aubin J., Lamour F., Abiven A., Baud M., y col. 2005. Ofimer probiotic study on rainbow trout. I. Resistance against *Yersinia ruckeri* and humoral immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) submitted to probiotic treatment with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, En Howell B. y Flos R. (eds.), Lessons from the Past to Optimise the Future. Aquaculture Europe 2005, Trondheim, EAS Special Publication, vol. 35 (European Aquaculture Soc.), pp. 380–381. Oostende.
70. Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Goodman, A. L., Trent, C. M., & Gordon, J. I. 2007. *In vivo* imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104(18)**: 7622–7627.
71. Rendueles, O., Ferrières, L., Frétaud, M., Bégaud, E., Herbomel, P., Levraud, J. P., y col. 2012. A new zebrafish model of oro-intestinal pathogen colonization reveals a key role for adhesion in protection by probiotic bacteria. PLoS Pathog. **8(7)**: 12.
72. Reyes-Becerril, M., Salinas, I., Cuesta, A., Meseguer, J., Tovar-Ramirez, D., Ascencio-Valle, F., y col. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. **25(6)**: 731–739.
73. Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M. M., Min, J., Nguyen, P. T., Telfer, T. C., y col. 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: A critical review. Rev. Aquac. **4(2)**: 75–93.
74. Robinson, C. D., Klein, H. S., Murphy, K. D., Parthasarathy, R., Guillemain, K., & Bohannan, B. J. M. 2018. Experimental bacterial adaptation to the zebrafish gut reveals a primary role for immigration. PLoS Biol. **16(12)**: 1–26.
75. Romero, J., Gloria, C., y Navarrete, P. 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. Health Environ. Aquac. Santiago. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/124163>
76. Saksida, S. M., Gardner, I., y Kent, M. L. 2014. Transmission of infectious agents between wild and farmed fish (2nd ed). En Woo, P. y Bruno, D (eds.) Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture. CABI International, Wallingford. pp. 313-326.
77. Samanidou, V. F. & Evaggelopoulou, E. N. 2007. Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. J. Sep. Sci. **30(16)**: 2549–2569.
78. Schlomann, B. H., Wiles, T. J., Wall, E. S., Guillemain, K. y Parthasarathy, R. 2019. Sublethal antibiotics collapse gut bacterial populations by enhancing aggregation and expulsion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **116(43)**: 21392-21400.
79. Schumann, R., & Rentsch, D. 1998. Staining particulate organic matter with DTAF--a fluorescence dye for carbohydrates and protein: a new approach and application of a 2D image analysis system. Mar. Ecol. Prog. Ser. **163**: 77-88.
80. Sherr, B. F., Sherr, E. B., & Fallon, R. D. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. Appl. Environ. Microbiol., **53(5)**: 958-965.
81. Shi, X., Teo, L. S., Pan, X., Chong, S. W., Kraut, R., Korzh, V., & Wohland, T. (2009). Probing events with single molecule sensitivity in zebrafish and Drosophila embryos by fluorescence correlation spectroscopy. Dev. Dyn. **238(12)**: 3156–3167.
82. Shin, D. S., & Eom, Y. Bin. 2020. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Clostridium butyricum* supernatant against *Acinetobacter baumannii*. Arch. Microbiol., **202(5)**: 1059–1068.
83. Sindermann, C. J. 1984. Disease in marine aquaculture Helgol. Mar. Res. **37(1–4)**: 505–530.

84. Smith, I. M., Baker, A., Arneborg, N., & Jespersen, L. 2015. Non-*Saccharomyces* yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **61(5)**: 491–497.
85. Soliman, W. S., Shaapan, R. M., Mohamed, L. A., & Gayed, S. S. R. 2019. Recent biocontrol measures for fish bacterial diseases, in particular to probiotics, bio-encapsulated vaccines, and phage therapy. *Open Vet. J.* **9(3)**: 190–195.
86. Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Román, L., Grasso, V., Vega, J., y col. 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Vet. Microbiol.*, **155(2–4)**: 369–373.
87. Suharja, A. A. S., Henriksson, A., & Liu, S. Q. 2014. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in fermented milk under ambient conditions. *J. Food Process. Preserv.* **38(1)**: 326–337.
88. Sundberg, L. R., Ketola, T., Laanto, E., Kinnula, H., Bamford, J. K. H., Penttinen, R., y col. 2016. Intensive aquaculture selects for increased virulence and interference competition in bacteria. *Proc. Biol. Sci.* **283(1826)**: 20153069.
89. Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L., & Das, N. 2018. Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Sci. Biotechnol.*, **27(3)**: 745–753.
90. Taormina, M. J., Jemielita, M., & Stephens, W. Z. 2012. Investigating Bacterial-Animal Symbioses with Light Sheet Microscopy. *Biological Bulletin*, **223(Ago)**, 7–20.
91. Taylor, N. G. H., Verner-Jeffreys, D. W., & Baker-Austin, C. 2011. Aquatic systems: Maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends in Ecology and Evol.* **26(6)**: 278–284.
92. Thiemann S, Smit N, Strowig T. 2016. Antibiotics and the intestinal microbiome: individual responses, resilience of the ecosystem, and the susceptibility to infections. *Curr. Topics in Microbiol. and Immunol.* **398**: 124–38.
93. Tittsler, R. P., & Sandholzer, L. A. 1936. The Use of Semi-solid Agar for the Detection of Bacterial Motility. *J. Bacteriol.* **31(6)**: 575–580.
94. Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A. A., Quesada, E., & Llamas, I. 2016. Selection of the N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture. *Front. Microbiol.*, **7(May)**: 646.
95. Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. 2010. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, **300(1–4)**: 142–147.
96. Tovar-Ramírez, D., Zambonino Infante, J., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., & Vázquez-Juárez, R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, **234(1–4)**: 415–427.
97. Tovar, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., y Lésel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Aquaculture*, **204**: 113–123.
98. Tremblay, J., & Déziel, E. 2008. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J. Basic Microbiol.*, **48(6)**: 509–515.
99. Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: Possibilities and challenges. *Aquaculture*, **155(1–4)**: 401–417.
100. Vahedi-shahandashti, R., Kasra-kermanshahi, R., & Shokouhfard, M. 2017. Antagonistic activities of some probiotic lactobacilli culture supernatant on *Serratia marcescens* swarming motility and antibiotic resistance. *Iran J Microbiol.* **9(6)**: 348–355.

101. Wallace, K. N., & Pack, M. 2003. Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Develop. Biol.* **255(1)**: 12–29.
102. Wiles, T. J., Jemielita, M., Baker, R.P., Schlomann, B. H., Logan, S. L., Ganz, J., y col. 2016. Host Gut Motility Promotes Competitive Exclusion within a Model Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* **14(7)**: e1002517. Wiles, T. J., Schlomann, B. H., Wall, E. S., Betancourt, R., Parthasarathy, R., & Guillemin, K. 2020. Swimming motility of a gut bacterial symbiont promotes resistance to intestinal expulsion and enhances inflammation. In *PLoS Biology*. **18(3)**: e3000661.
103. Yeung, A. T. Y., Parayno, A., & Hancock, R. E. W. 2012. Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, **3(3)**: 1–12.
104. Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-De Frías, C., & Cortés, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* **20(2)**: 126–136.
105. Zhao, W., Yuan, T., Piva, C., Spinard, E. J., Schuttert, C. W., Rowley, D. C., y col. 2019. The Probiotic Bacterium *Phaeobacter inhibens* Downregulates Virulence Factor Transcription in the Shellfish Pathogen *Vibrio coralliilyticus* by N-Acyl Homoserine Lactone Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **85(2)**: 1–14.
106. Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K, y col. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Vet. Q.* **36(4)**: 228–241.

ANEXOS

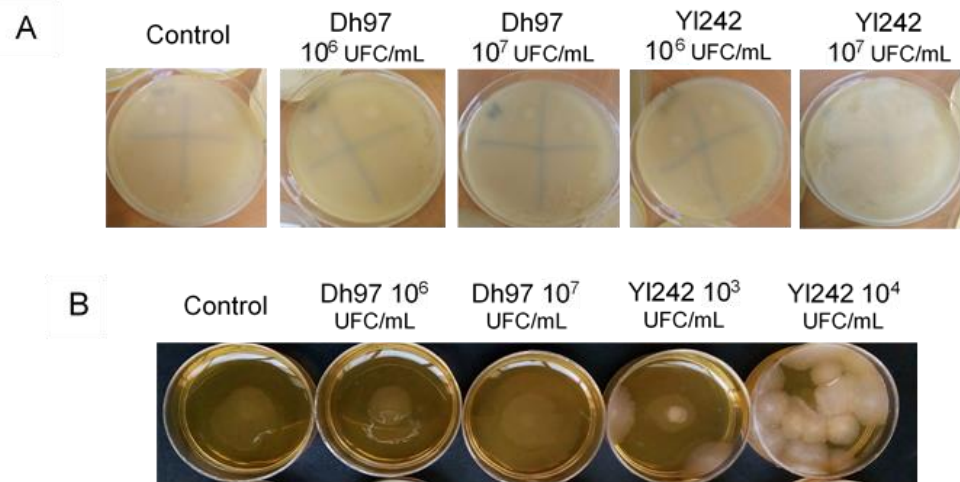


Figura S1. Estandarización del protocolo para evaluar el efecto de *D. hansenii* 97 (Dh97) y *Y. lipolytica* 242 (YI242) en la motilidad de *V. anguillarum* PF4 (VaPF4) *in vitro*. (a) Se incubaron 2 μ L de un cultivo *overnight* de VaPF4 a 28 °C por 24 h en la superficie de placas TSB + 1 % NaCl + 0,25 % agar suplementadas con 50 % v/v de TSB + 1 % NaCl (Control) y 10⁶ y 10⁷ UFC/mL de Dh97 y YI242. (b) Se sembraron placas de YPD con 10⁷ y 10⁶ UFC/mL de Dh97 y 10⁴ y 10³ UFC/mL de YI242 y se incubó por 18 h. Luego, se agregó una capa de TSB + 1 % NaCl + 0,4 % agar, donde se inoculó por punción un cultivo *overnight* de VaPF4, incubando por 24 h a 28 °C. El grupo control no contiene levadura.

Methods to evaluate bacterial motility and its role in bacterial-host interactions

Victoria Palma¹, María Soledad Gutiérrez^{1,2}, Orlando Vargas¹, Raghuveer Parthasarathy^{3,4}, Paola Navarrete^{1,2*}

¹ Laboratory of Microbiology and Probiotics, Institute of Nutrition and Food Technology (INTA), University of Chile, Santiago, Chile

² ANID – Millennium Science Initiative Program - Millennium Nucleus in the Biology of the Intestinal Microbiota

³ Institute of Molecular Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon, United States of America.

⁴ Department of Physics and Materials Science Institute, University of Oregon, Eugene, Oregon, United States of America.

Keywords: bacterial motility, motility methods, swimming, flagella, bacterial-host interaction, microscopy

Abstract

Bacterial motility is a widespread characteristic that can provide several advantages for the cell, allowing it to move towards more favorable conditions and enabling host-associated processes such as colonization. There are different bacterial motility types, and their expression is highly regulated by the environmental conditions. Because of this, methods for studying motility under realistic experimental conditions are required. A wide variety of approaches have been developed to study bacterial motility. Here, we present the most common techniques and recent advances and discuss their strengths as well as their limitations. We classify them as macroscopic or microscopic and highlight the advantages of three-dimensional imaging in microscopic approaches. Lastly, we discuss methods suited for studying motility in bacterial-host interactions, including the use of the zebrafish model.

1 Introduction

Motility is defined as the movement of cells by some form of self-propulsion (Madigan et al., 2010). Many bacterial cells are motile as it allows them, for example, to escape from unfavorable conditions and to exploit new resources or opportunities. Motility is also involved in the interaction between microorganisms and their host, specifically in colonization or infectious pathogenic processes. Indeed, non-motile mutants are either impaired or completely disabled to colonize and/or cause disease (Josenhans and Suerbaum, 2002).

There are different types of motility, often classified as: swimming, swarming, twitching, gliding, and sliding (Henrichsen, 1972). Swimming consists of movement in a liquid environment typically by using flagella. Swarming is a coordinated movement of cells that are propelled by flagella through thin liquid films on surfaces and can involve cellular differentiation into a longer and hyper-flagellated phenotype (Kearns, 2010). Other structural molecules can be involved in bacterial movement like twitching and gliding, both being active ways of moving over a surface. In twitching, type IV pili extend and attach to a solid surface, then retract to allow movement (Jarrell and McBride, 2008). While twitching is described as intermittent and uneven, gliding is a more organized and smoother cell movement that comprises evolutionarily unrelated machineries

which include type IV pili (Spormann, 1999; Mattick, 2002; Wilde and Mullineaux, 2015). Sliding is a passive movement that requires biosurfactant production (Henrichsen, 1972; Pollitt and Diggle, 2017).

Other types of motion are possible. For example, some parasitic bacteria can induce actin polymerization to form a tail and move inside the host cell. This motility type and others are included in a recent re-classification based on the structure of the force-producing motor (Miyata et al., 2020). Different motility types are not mutually exclusive and show great variability. For example, strains from different serovars of *Salmonella enterica* showed differences up to a factor of 2.7 in swimming speed (Abdullah et al., 2018).

Although motility can provide fitness advantages, it also has considerable drawbacks, such as high energetic and metabolic cost, and the presence of antigenic structures such as flagella (Ottemann and Miller, 1997). These costs are a function of the biological context, and therefore realistic assessment of motility requires setting experimental conditions to be as close as possible to the actual environment of interest. We will discuss here common and recent methodological approaches that have been used to study bacterial motility and its role in bacteria-host interactions.

2 Macroscopic techniques

We will distinguish between macroscopic and microscopic methods for studying bacterial motility. The former does not resolve the motions of individual bacteria but rather the spread of a population through some medium. Qualitatively, the link between macroscopic spreading and microscopic motility makes sense – a non-motile species, for example, will have little dispersal, and a vigorously moving species may travel far – and macroscopic methods are particularly well suited to uncover non-motile or hypermotile strains. Quantitatively, the relationship between macroscopic dispersal and the motility of individual cells is more subtle, because the spread of a population is driven by growth (cell division) as well as motility. For example, a bacterium *Escherichia coli* that travels in fairly straight “runs” of a constant speed, v_{bacteria} , that persist on average for time τ before the organism “tumbles” and randomizes its direction, executes a random walk through its three-dimensional world with an effective diffusion coefficient D proportional to the square of its speed $D = (1/3) v_{\text{bacteria}}^2 \tau$ (Lovely and Dahlquist, 1975; Berg, 1983). If the bacteria are also growing exponentially with growth rate r , the population will spread with a velocity $v = 2\sqrt{rD}$ as Fisher, Kolmogorov, and others showed nearly a century ago (Fisher, 1937; Kolmogorov et al., 1937). For typical bacterial swimming speeds and growth rates, the macroscopic dispersal speed (perhaps millimeters per hour) will be one or two orders of magnitude lower than the speed of individual bacteria (perhaps tens of microns per second). For recent work on “Fisher waves” and bacterial range expansion, see for example (Gandhi et al., 2016; Cremer et al., 2019).

The most common approach to study macroscopic motility is by examining bacterial spread through semi-solid agar (Tittsler and Sandholzer, 1936). Starting from an inoculation stab deep inside the agar, non-motile bacteria will remain near the inoculation zone, while motile bacteria will spread and visibly blur the media. According to the bacterial species and motility type, the agar concentration can be adjusted (Table 1). If the motility zone cannot be visualized, the growth density of an agar plug at a standardized distance can be measured (Robinson et al., 2018).

Labeling can increase the contrast between the spreading bacteria and the culture media. For example, 2, 3, 5- triphenyltetrazolium chloride (TTC) can be easily incorporated into the media, coloring bacterial growth (Ball and Sellers, 1966), and genetically encoded fluorescent proteins can identify specific bacterial strains (Morris et al., 2011). Staining biosurfactant rhamnolipids helped show that its production on surfaces is associated with swarming motility (Morris et al., 2011).

Environmental factors can also affect motility in agar. Tremblay and Déziel (2008) proved that incubation temperature, pH and drying time of soft agar under laminar flow affected swarming. In fact, even the location of the plates within the laminar flow causes significant differences in the swarming speed. This makes the reproducibility of these methods difficult to achieve.

3 Microscopic techniques

Direct observation of motile bacterial cells provides the clearest insights into their motility, but is challenging due to the length- and time-scales involved, as well as the potential complexity of the microbes' environments. Bacteria are typically around a micron in size, with speeds up to tens of microns per second for flagella-mediated swimming. Video capture rates of at least 10 frames per second are therefore needed if cellular positions in adjacent images are to be no more than a body-length apart, enabling accurate reconstruction of trajectories.

Bacteria must also be discerned from the background, which is possible with simple bright-field imaging but is enhanced by techniques such as dark-field microscopy, differential interference contrast microscopy (DIC), and phase contrast microscopy. In dark-field microscopy, illumination comes from the side so that only light scattered by objects such as bacteria is detected, providing a bright signal on a dark background. This enables, for example, visualization of flagella in addition to bacterial cell bodies (Macnab, 1976; Madigan et al., 2010). One-sided dark-field illumination variant is useful to simultaneously determine cell rotation and swimming speed in spirochetes (Nakamura and Islam, 2017). In DIC microscopy and phase contrast microscopy, index of refraction gradients and phase shifts, respectively, are mapped onto intensity differences, enhancing the contrast of relatively transparent objects, making these methods suitable for assessing bacterial movement and orientation (Cheong et al., 2014; Hook et al., 2019).

Fluorescence microscopy enables clear identification of labeled cells, or even specific bacterial components such as flagella (Turner et al., 2000). Genetically encoded fluorescent proteins are routinely used in model bacteria, and increasingly in unconventional microbes as well (Wiles et al., 2018). Exogenous labels can be simpler to apply, but will be diluted as bacteria divide. For all fluorescent probes, one must be aware that they can potentially alter bacterial function. Staining with DAPI, for example, halves the swimming speed of *Pseudomonas* species (Toepfer et al., 2012), and fusions of fluorescent proteins to components of the bacterial flagellar motor have been shown to alter its dynamics (Heo et al., 2017).

Microscopy in its forms mentioned so far provides views of a two-dimensional image. The truncated fragments of trajectories as bacteria move in and out of the focal plane still allow measurement of swimming speeds, durations of runs, and other characteristics. Nonetheless, three-dimensional trajectories obtained through stacks of 2D slices (z-stacking) can be worthwhile, giving a more accurate characterization of motility patterns, whereas methods based on 2D projection allow to observe a larger volume in exchange for providing less exact measurements (Taute et al., 2015). Berg's classic identifications of *E. coli*'s runs and tumbles tracked a microbe in three dimensions through a feedback loop linking image intensities and stage positions (Berg and Brown, 1972). This is a very precise approach, but can only track a single cell.

More recent techniques allow three-dimensional imaging of many bacteria within a field of view. In defocused imaging methods, depth-dependent image shape allows localization along the axis perpendicular to the focal plane ("z"). This approach has long been used for non-bacterial imaging, e.g. of nanoparticles (Speidel et al., 2003), and has been applied to bacteria using fluorescence (Wu et al., 2006) as well as phase contrast (Taute et al., 2015) microscopy, with a z-range limit of 200 μm in the latter. Gray values can also be used to determine z-distance in cells close to the focal plane (Deforet et al., 2016).

Other techniques for three-dimensional reconstruction that have been applied to bacterial systems include holographic microscopy (DHM) (Kim, 2010) and selective volume illumination microscopy (SVIM) (Truong et al., 2020). DHM reconstructs an image from the interference pattern produced by the specimen, illuminated by a coherent light source. While low scattering efficiency of bacteria is a disadvantage, DHM has high imaging speed and, with recent improvements, a resolution of 0.2 μm (Molaei and Sheng, 2014; Wang et al., 2016). SVIM especially has the potential for visualizing complex environments, in which out-of-focus localization methods or holography would have difficulty with accurate reconstruction. In SVIM, a whole volume is illuminated. A microlens array translates depth information into a two-dimensional light field image, which can be computationally transformed into a three-dimensional image. SVIM can be used to visualize bacteria in complex environments, for example, *Vibrio fischeri* colonization inside the light organ of their squid host (Truong et al., 2020).

All of these techniques and more, under the appropriate conditions, are precise enough to reveal strategies for swimming, chemotaxis, and other behaviors. Lastly, new methods for assessing image-derived trajectories can be used to produce more accurate characterizations (Nisenbaum et al., 2016; Liang et al., 2018).

4 Study of bacterial motility in bacterial-host interactions

The study of bacterial motility inside a host is a more complex affair, which is why many studies simulate host conditions *in vitro*. Soft agar can, up to some extent, mimic physical, chemical and nutritional conditions inside and outside the host (Yeung et al., 2012; Robinson et al., 2018). Furthermore, chambers can mimic environments such as xylem vessels (Meng et al. 2005), enabling the discovery that *Xylella fastidiosa* migrates against the flow via twitching motility, and anaerobiosis, allowing researchers to prove that *Clostridioides difficile* modulates its swimming speed in the presence of a metabolite related to its host colonization (Courson et al., 2019). Likewise, vertical diffusion chambers (VDC) were used to study the role of motility in *Campylobacter jejuni* invasion of epithelial cells (Mills et al., 2012). An alternative closer to *in vivo* conditions is tissue culture, which allows investigation of motility behavior in processes like cell invasion and tumor colonization (Szymanski et al., 1995; Higashi et al., 2007; Toley and Forbes, 2012). Lastly, artificial systems that reproduce the successive environmental niches of the human gastrointestinal tract can be used to simulate the host's dynamic conditions (Jubelin et al., 2018). A metagenomic analysis of a TIM-2 (TNO gastrointestinal model of the colon) model inoculated with human gut microbes showed that higher iron availability resulted in an enrichment of motility and chemotaxis functions. (Kortman et al., 2016). Meanwhile, an early *ex vivo* approach includes extracting infected tissue and labeling bacteria with fluorescent antibodies to visualize its distribution (Guentzel et al., 1977).

Real time analysis is crucial to understand the colonization dynamics of bacteria. Intravital microscopy (IVM) consists of imaging in live animals and often relies on fluorescence microscopy. The main problem is the thickness of the tissue samples, as off-focus blur and light scattering limit the depth of imaging (Masedunskas et al., 2012). Confocal microscopy can suffice; Moriarty et al. (2008) reported high resolution multidimensional visualization of bacterial dissemination inside a living mammal using spinning disk confocal IVM, revealing that dissemination of *Borrelia burgdorferi* in microvasculature of mice is a multi-stage process. Nonetheless, the scattered fluorescence limits the imaging depth of confocal microscopy to tens of microns. On the contrary, with multiphoton fluorescence, which is based on the simultaneous absorption of two or more infrared or near-infrared photons, imaging can be deeper than 100 μm in tissue. This is possible because longer wavelengths can penetrate at higher depths, besides lowering endogenous autofluorescence. Moreover, as excitation occurs only in the focal plane, there is minimal bleaching in the rest of the tissue (Schuh et al., 2016; Belperron et al., 2018). Because of its advantages, this approach has been widely applied to visualize bacteria in IVM, facilitating the

study of bacterial motility in colonized organs, such as *V. cholerae* in the intestine and *B. burgdorferi* in the skin (Millet et al., 2014; Belperron et al., 2018).

Zebrafish (*Danio rerio*) are a particularly advantageous animal model for studying host-bacterial interactions due to their optical transparency at the larval stage, allowing for non-invasive examination of bacterial movement inside a living vertebrate host. Fluorescently labelled bacteria can be inoculated via immersion and visualized both at a whole population and single cell level (Van Der Sar et al., 2003; O'Toole et al., 2004). Germ-free zebrafish larvae colonized with fluorescent bacteria proved to be useful to examine the relationship between bacterial motility and symbiosis within the intestine (Rawls et al., 2007) (Caruffo et al., 2015).

In the last few years, the use of the zebrafish model coupled with light sheet fluorescence microscopy (LSFM) has provided new insights in the field of bacterial dynamics within a living host (Jemielita et al., 2014; Wiles et al., 2016; Parthasarathy, 2018; Schlomann et al., 2018; Wiles et al., 2020). In this technique, only the focal plane is illuminated, exciting all points in the plane simultaneously, while out-of-focus points are not excited increasing imaging speed, and minimizing photodamage (Taormina et al., 2012; Parthasarathy, 2018). Combining LSFM, larval zebrafish, and bacteria engineered with inducible switches for a flagellar motor component revealed that the swimming motility of a zebrafish-native *Vibrio* species was necessary for persistence inside the host and avoidance of expulsion with intestinal flow (Wiles et al., 2020). In a separate study, live-imaging revealed that sub-lethal doses of the broad-spectrum antibiotic ciprofloxacin promoted bacterial aggregation and expulsion from the intestine (Schlomann et al., 2019).

Finally, transcriptomic approaches can be used to investigate the effect of host or environmental factors (House et al., 2009; Peano et al., 2014; Berndt et al., 2009) and phenomena like macrophage internalization and host cell infection (Tolman and Valvano, 2012; Chakroun et al., 2018) in the transcriptional regulation of genes related to bacterial motility. Employing microarrays, Snyder et al. (2004) first assessed an *E. coli* pathotype's transcriptome *in vivo* from bacteria extracted from infected mice, showing that flagellar genes were downregulated. Interestingly, this transcriptome was from samples taken across 10 days and thus did not assess transient gene expression related to ascension to the upper urinary tract (Lane et al., 2007). Recently, comparison by RNA-seq between *Pseudomonas plecoglossicida* infecting spleens of *Larimichthys crocea* and *in vitro* culture revealed an up-regulation of motility-related and flagellum-related genes during the infection (Tang et al., 2020).

5 Discussion and concluding remarks

The crucial role of motility in bacterial survival, host-colonization and virulence is a fact. This mini-review showed that multiple approaches are available to study motility, from soft-agar to a wide variety of microscopic techniques. The optimal choice will depend on the specific questions or requirements of the experiment, such as number of cells or strains to process, z range needed and growth conditions. In host-bacterial interactions, *in vitro* set-ups can provide fair approximations to the host environment, whereas animal models use intravital microscopy, favoring techniques that can reach deeper tissue. Alternatively, the zebrafish model allows direct visualization of bacteria inside the host. Assessing changes in expression of motility-related genes is also feasible. All these approaches can be combined to have a wider outlook, for example coupling semi-solid agar plates with microscopy visualization. Accordingly, Deforet et al. (2016) observed that macroscopically, a *P. aeruginosa* hyperswarmer mutant spreads faster, yet does not swim faster than the wild-type at single-cell level. Further investigation led to realize this might be due to wider turns.

All in all, a considerable number of new methods and advances have emerged during the last decade. Nevertheless, improvements such as protocol standardization, facilitating the implementation of high-throughput techniques and designing novel tactics to study bacterial motility, especially inside the host.

6 Author Contributions

VP, PN and RP conceived the present review. All authors wrote and revised the manuscript.

7 Funding

The study was supported by grant FONDECYT/ANID 1181499. MSG acknowledges FONDECYT/ANID grant 3200998.

8 Acknowledgments

The study was supported by grant FONDECYT/ANID 1181499. MSG acknowledges FONDECYT/ANID grant 3200998.

9 References

1. Abdullah, W. Z. W., Mackey, B. M., and Karatzas, K. A. G. (2018). High phenotypic variability among representative strains of common *Salmonella enterica* serovars with possible implications for food safety. *J. Food Prot.* 81(1), 93–104. doi:10.4315/0362-028x.jfp-17-190
2. Ball, R. J., and Sellers, W. (1966). Improved motility medium. *Appl. Microbiol.* 14(4), 670-673.
3. Belperron, A. A., Mao, J., and Bockenstedt, L. K. (2018). Two photon intravital microscopy of Lyme *Borrelia* in mice. *Methods in Mol. Biol. (Clifton, NJ)*, 1690, 279-290. doi: 10.1007/978-1-4939-7383-5_20
4. Berg, H. C. and Brown, D. A. (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* 239(5374), 500–504. doi:10.1038/239500a0
5. Berg, H.C. (1983). *Random walks in biology*. Princeton University Press; Princeton, NJ.
6. Berndt, A., Müller, J., Borsi, L., Kosmehl, H., Methner, U., and Berndt, A. (2009). Reorganisation of the caecal extracellular matrix upon *Salmonella* infection--relation between bacterial invasiveness and expression of virulence genes. *Vet. Microbiol.* 133(1–2), 123–137. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.025
7. Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., et al. (2015). Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Front. Microbiol.* 6, 1093. doi: 10.3389/fmicb.2015.01093
8. Chakroun, I., Mahdhi, A., Morcillo, P., Cordero, H., Cuesta, A., Bakhrouf, A., et al. (2018). Motility, biofilm formation, apoptotic effect and virulence gene expression of atypical *Salmonella typhimurium* outside and inside Caco-2 cells. *Microb. Pathog.* 114, 153-162. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.010
9. Cheong, F. C., Wong, C. C., Gao, Y., Nai, M. H., Cui, Y., Park, S., et al. (2015). Rapid, high-throughput tracking of bacterial motility in 3D via phase-contrast holographic video microscopy. *Biophys. J.* 108(5), 1248–1256. doi: 10.1016/j.bpj.2015.01.018
10. Courson, D. S., Pokhrel, A., Scott, C., Madrill, M., Rinehold, A. J., Tamayo, R., et al. (2019). Single cell analysis of nutrient regulation of *Clostridioides (Clostridium) difficile* motility. *Anaerobe* 59, 205-211. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.102080
11. Cremer, J., Honda, T., Tang, Y., Wong-Ng, J., Vergassola, M. and Hwa, T. (2019). Chemotaxis as a navigation strategy to boost range expansion. *Nature* 575, 658–663. doi: 10.1038/s41586-019-1733-y

12. Deforet, M., Van Ditmarsch, D., Carmona-Fontaine, C., and Xavier, J. B. (2014). Hyperswarming adaptations in a bacterium improve collective motility without enhancing single cell motility. *Soft Matter*. 10(14), 2405-2413. doi: 10.1039/c3sm53127a
13. Filloux, A., and Ramos, J. L. (2014). *Pseudomonas: methods and protocols*. New York; Secaucus: Humana Press; Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0
14. Fisher, R. A. (1937) The wave of advance of advantageous genes. *Ann. Eugen.* 7:355-369. doi: 10.1111/j.1469-1809.1937.tb02153.x
15. Gandhi, S. R., Yurtsev, E. A., Korolev, K. S., Gore, J. (2016). Range expansions transition from pulled to pushed waves as growth becomes more cooperative in an experimental microbial population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 6922–6927. doi: 10.1073/pnas.1521056113
16. Guentzel, M. N., Field, L. H., Eubanks, E. R., and Berry, L. J. (1977). Use of fluorescent antibody in studies of immunity to cholera in infant mice. *Infect. Immun.* 15(2), 539–548. doi: 10.1128/iai.15.2.539-548.1977
17. Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36, 478–503.
18. Heo, M., Nord, A. L., Chamousset, D., Van Rijn, E., Beaumont, H. J. E., and Pedaci, F. (2017). Impact of fluorescent protein fusions on the bacterial flagellar motor. *Sci. Rep.* 7(1), 1–10. doi: 10.1038/s41598-017-11241-w
19. Higashi, D. L., Lee, S. W., Snyder, A., Weyand, N. J., Bakke, A., and So, M. (2007). Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: Microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. *Infect. Immun.* 75(10), 4743–4753. doi: 10.1128/IAI.00687-07
20. Hook, A. L., Flewellen, J. L., Dubern, J. F., Carabelli, A. M., Zaid, I. M., Berry, R. M., et al. (2019). Simultaneous tracking of *Pseudomonas aeruginosa* motility in liquid and at the solid-liquid interface reveals differential roles for the flagellar stators. *MSystems* 4(5), e00390-19. doi: 10.1128/msystems.00390-19
21. House, B., Kus, J. V., Prayitno, N., Mair, R., Que, L., Chingcuanco, F., et al. (2009). Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 virulence. *Microbiology* 155(9), 2907-2918. doi: 10.1099/mic.0.025171-0
22. Jarrell, K. F., and McBride, M. J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6(6), 466–476. doi: 10.1038/nrmicro1900
23. Jemielita, M., Taormina, M. J., Burns, A. R., Hampton, J. S., Rolig, A. S., Guillemain, K., et al. (2014). Spatial and temporal features of the growth of a bacterial species colonizing the zebrafish gut. *MBio* 5(6), 1–8. doi: 10.1128/mBio.01751-14
24. Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291(8), 605–614. doi: 10.1078/1438-4221-00173
25. Jubelin, G., Desvaux, M., Schüller, S., Etienne-Mesmin, L., Muniesa, M., and Blanquet-Diot, S. (2018). Modulation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* survival and virulence in the human gastrointestinal tract. *Microorganisms* 6(4), 115. doi: 10.3390/microorganisms6040115
26. Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, (9), 634-644. doi: 10.1038/nrmicro2405
27. Kim, M. K. (2010). Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Reviews* 1(1), 018005. doi: 10.1117/6.0000006
28. Kolmogorov, A. N., Petrovsky, N., Piscounov, N. S. (1937). A study of the equation of diffusion with increase in the quantity of matter, and its application to a biological problem. *Mosc. Univ. Bull. Math.* 1:1-25.
29. Kortman, G. A., Dutilh, B. E., Maathuis, A. J., Engelke, U. F., Boekhorst, J., Keegan, K.P., et al. (2016). Microbial metabolism shifts towards an adverse profile with supplementary iron in the TIM-2 *in vitro* model of the human colon. *Front. Microbiol.* 6, 1481. doi: 10.3389/fmicb.2015.01481
30. Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N., and Mobley, H. L. T. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(42), 16669–16674. doi: 10.1073/pnas.0607898104
31. Liang, X., Lu, N., Chang, L. C., Nguyen, T. H., and Massoudieh, A. (2018). Evaluation of bacterial run and tumble motility parameters through trajectory analysis. *J. Contam. Hydrol.* 211, 26-38. doi: 10.1016/j.jconhyd.2018.03.002
32. Liu, Y., Kyle, S., and Straight, P. D. (2018). Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. *Msphere*. 3(1). doi: 10.1128/mSphere.00586-17

33. Lovely, P and Dahlquist, F. W. (1975). Statistical measures of bacterial motility and chemotaxis. *J. Theor. Biol.* 50: 477. doi: 10.1016/0022-5193(75)90094-6
34. Macnab, R. M. (1976). Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *J. Clin. Microbiol.* 4(3), 258-265.
35. Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D., and Martinko, J. M. (2010). *Brock Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
36. Martínez, A., Torello, S., and Kolter, R. (1999). Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 181(23), 7331-7338.
37. Masedunskas, A., Milberg, O., Porat-Shliom, N., Sramkova, M., Wigand, T., Amornphimoltham, P., et al. (2012). Intravital microscopy: a practical guide on imaging intracellular structures in live animals. *Bioarchitecture* 2(5) 143–157. doi: 10.4161/bioa.21758
38. Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 289–314. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160938
39. Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., and Hoch, H. C. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J. Bacteriol.* 187(16), 5560–5567. doi: 10.1128/JB.187.16.5560-5567.2005
40. Millet, Y. A., Alvarez, D., Ringgaard, S., von Andrian, U. H., Davis, B. M., and Waldor, M. K. (2014). Insights into *Vibrio cholerae* intestinal colonization from monitoring fluorescently labeled bacteria. *PLoS Pathog.* 10(10), e1004405. doi: 10.1371/journal.ppat.1004405
41. Mills, D. C., Gundogdu, O., Elmi, A., Bajaj-Elliott, M., Taylor, P. W., Wren, B. W., et al. (2012). Increase in *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal epithelial cells under low-oxygen coculture conditions that reflect the *in vivo* environment. *Infect. Immun.* 80(5), 1690-1698. doi: 10.1128/IAI.06176-11
42. Miyata, M., Robinson, R. C., Uyeda, T. Q. P., Fukumori, Y., Fukushima, S. I., Haruta, S., et al. (2020). Tree of motility – A proposed history of motility systems in the tree of life. *Genes Cells* 25(1), 6–21. doi: 10.1111/gtc.12737
43. Molaei, M., and Sheng, J. (2014). Imaging bacterial 3D motion using digital in-line holographic microscopy and correlation-based de-noising algorithm. *Opt. Express* 22(26), 32119. doi: 10.1364/oe.22.032119
44. Moriarty, T.J., Norman, M.U., Colarusso, P., Bankhead, T., Kubes, P., and Chaconas, G. (2008). Real-time high resolution 3D imaging of the lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog.* 4(6): e1000090. doi:10.1371/journal.ppat.100009
45. Morris, J. D., Hewitt, J. L., Wolfe, L. G., Kamatkar, N. G., Chapman, S. M., Diener, J. M., et al. (2011). Imaging and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* swarming and rhamnolipid production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(23), 8310-8317. doi: 10.1128/AEM.06644-11
46. Nakamura, S. and Islam, M. S. (2017). Motility of *Spirochetes*. *Methods Mol. Biol.* 1593, 243–51. doi: 10.1007/978-1-4939-6927-2_19
47. Nisenbaum, M., Maldonado, E., Arca, J. M., González, J. F., Passoni, L. I., and Murialdo, S. E. (2016). Video processing analysis for the determination and evaluation of the chemotactic response in bacterial populations. *J. Microbiol. Methods* 127, 146-153. doi: 10.1016/j.mimet.2016.06.006
48. O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. E., and Wolf-Watz, H. (2004). Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.*, 37(1), 41–46. doi: 10.1016/j.micpath.2004.03.001
49. Ottemann, K. M., and Miller, J. F. (1997). Roles for motility in bacterial–host interactions. *Mol. Microbiol.* 24(6), 1109-1117. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4281787.x
50. Parthasarathy, R. (2018). Monitoring microbial communities using light sheet fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Microbiol.* 43, 31–37. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.008.Monitoring
51. Partridge, J. D., and Harshey, R. M. (2013). Swarming: flexible roaming plans. *J. Bacteriol.* 195(5), 909–918. doi: 10.1128/JB.02063-12
52. Partridge, J. D., and Harshey, R. M. (2020). Investigating flagella-driven motility in *Escherichia coli* by applying three established techniques in a series. *J. Vis. Exp.* (159), e61364. doi: 10.3791/61364
53. Peano, C., Chiaramonte, F., Motta, S., Pietrelli, A., Jaillon, S., Rossi, E., et al. (2014). Gene and protein expression in response to different growth temperatures and oxygen availability in *Burkholderia thailandensis*. *PLoS One* 9(3), e93009. doi: 10.1371/journal.pone.0093009
54. Pollitt, E., and Diggle, S. P. (2017). Defining motility in the *Staphylococci*. *Cell. Mol. Life Sci.* 74(16), 2943–2958. doi: 10.1007/s00018-017-2507-z

55. Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Goodman, A. L., Trent, C. M., and Gordon, J. I. (2007). *In vivo* imaging and genetic analysis link bacterial motility and symbiosis in the zebrafish gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(18), 7622-7627. doi: 10.1073/pnas.0702386104
56. Robinson, C. D., Klein, H. S., Murphy, K. D., Parthasarathy, R., Guillemin, K., and Bohannan, B. J. (2018). Experimental bacterial adaptation to the zebrafish gut reveals a primary role for immigration. *PLoS Biol.* 16(12), e2006893. doi: 10.1371/journal.pbio.2006893
57. Schlomann, B. H., Wiles, T. J., Wall, E. S., Guillemin, K., and Parthasarathy, R. (2018). Bacterial cohesion predicts spatial distribution in the larval zebrafish intestine. *Biophys. J.* 115(11), 2271-2277. doi: 10.1016/j.bpj.2018.10.017
58. Schlomann, B. H., Wiles, T. J., Wall, E. S., Guillemin, K., and Parthasarathy, R. (2019). Sublethal antibiotics collapse gut bacterial populations by enhancing aggregation and expulsion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116(43), 21392-21400. doi: 10.1073/pnas.1907567116
59. Snyder, J. A., Haugen, B. J., Buckles, E. L., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Donnenberg, M. S., et al. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect. Immun.* 72(11), 6373-6381. doi: 10.1128/IAI.72.11.6373-6381.2004
60. Speidel, M., Jonáš, A., and Florin, E. L. (2003). Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging. *Opt. Lett.* 28(2), 69. doi: 10.1364/ol.28.000069
61. Spormann, A. M. (1999). Gliding motility in bacteria: Insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(3), 621-641.
62. Szymanski, C. M., King, M., Haardt, M., and Armstrong, G. D. (1995). *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infect. Immun.* 63(11), 4295-4300. doi: 10.1128/IAI.63.11.4295-4300.1995
63. Tang, Y., Xin, G., Zhao, L. M., Huang, L. X., Qin, Y. X., Su, Y. Q., et al. (2020). Novel insights into host-pathogen interactions of large yellow croakers (*Larimichthys crocea*) and pathogenic bacterium *Pseudomonas plecoglossicida* using time-resolved dual RNA-seq of infected spleens. *Zool. Res.* 41(3), 314. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020
64. Taormina, M. J., Jemielita, M., Stephens, W. Z., Burns, A. R., Troll, J. V., Parthasarathy, R., et al. (2012). Investigating bacterial-animal symbioses with light sheet microscopy. *Biol. Bull.* 223(1), 7-20. doi: 10.1086/BBLv223n1p7
65. Taute, K. M., Gude, S., Tans, S. J., and Shimizu, T. S. (2015). High-throughput 3D tracking of bacteria on a standard phase contrast microscope. *Nat. Commun.* 6(1), 1-9. doi: 10.1038/ncomms9776
66. Tchoufag, J., Ghosh, P., Pogue, C. B., Nan, B., and Mandadapu, K. K. (2019). Mechanisms for bacterial gliding motility on soft substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116(50), 25087-25096. doi: 10.1073/pnas.1914678116
67. Tittsler, R. P., and Sandholzer, L. A. (1936). The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. *J. Bacteriol.* 31(6), 575-580.
68. Toepfer, J. A., Ford, R. M., Metge, D., and Harvey, R. W. (2012). Impact of fluorochrome stains used to study bacterial transport in shallow aquifers on motility and chemotaxis of *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81(1), 163-171. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01355.x
69. Toley, B. J., and Forbes, N. S. (2012). Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. *Int. Biol.* 4(2), 165-176. doi: 10.1039/c2ib00091a
70. Tolman, J. S., and Valvano, M. A. (2012). Global changes in gene expression by the opportunistic pathogen *Burkholderia cenocepacia* in response to internalization by murine macrophages. *BMC Genomics* 13(1), 63. doi: 10.1186/1471-2164-13-63
71. Tremblay, J., and Déziel, E. (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J. Basic Microbiol.* 48(6), 509-515. doi: 10.1002/jobm.20080
72. Truong, T. V., Holland, D. B., Madaan, S., Andreev, A., Keomanee-Dizon, K., Troll, J. V., et al. (2020). High-contrast, synchronous volumetric imaging with selective volume illumination microscopy. *Commun. Biol.* 3(1), 1-8.
73. Turner, L., Ryu, W. S., and Berg, H. C. (2000). Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J. Bacteriol.* 182(10), 2793-2801. doi: 10.1128/JB.182.10.2793-2801.2000
74. Van Der Sar, A. M., Musters, R. J., Van Eeden, F. J., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., and Bitter, W. (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cell. Microbiol.* 5(9), 601-611. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00303.x

75. Wang, A., Garmann, R. F., and Manoharan, V. N. (2016). Tracking *E. coli* runs and tumbles with scattering solutions and digital holographic microscopy. *Opt. Express*, 24(21), 23719. doi: 10.1364/oe.24.023719
76. Wilde, A., and Mullineaux, C. W. (2015). Motility in cyanobacteria: polysaccharide tracks and Type IV pilus motors. *Mol. Microbiol.* 98(6), 998-1001. doi: 10.1111/mmi.13242
77. Wiles, T. J., Jemielita, M., Baker, R. P., Schlomann, B. H., Logan, S. L., Ganz, J., et al. (2016). Host gut motility promotes competitive exclusion within a model intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 14(7), e1002517. doi: 10.1371/journal.pbio.1002517
78. Wiles, T. J., Schlomann, B. H., Wall, E. S., Betancourt, R., Parthasarathy, R., and Guillemin, K. (2020). Swimming motility of a gut bacterial symbiont promotes resistance to intestinal expulsion and enhances inflammation. *PLoS Biol.* 18(3), e3000661. doi: 10.1371/journal.pbio.3000661
79. Wiles, T. J., Wall, E. S., Schlomann, B. H., Hay, E. A., Parthasarathy, R., and Guillemin, K. (2018). Modernized tools for streamlined genetic manipulation and comparative study of wild and diverse proteobacterial lineages. *MBio* 9(5), 1–19. doi: 10.1128/mBio.01877-18
80. Wu, M., Roberts, J. W., Kim, S., Koch, D. L., and Delisa, M. P. (2006). Collective bacterial dynamics revealed using a three-dimensional population-scale defocused particle tracking technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(7), 4987–4994. doi: 10.1128/AEM.00158-06
81. Yeung, A. T., Parayno, A., and Hancock, R. E. (2012). Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 3(3). doi: 10.1128/mBio.00073-12

Table 1. Agar concentration in media according to the type of motility type to assess.

Motility type	Agar concentration	References
Swimming	Around 0.3 %	Partridge and Harshey, 2020
Swarming (temperate)	0.5 - 0.8 %	Partridge and Harshey, 2013
Swarming (robust)	> 1.5 %	Partridge and Harshey, 2013
Twitching*	1 %	Filloux and Ramos, 2014
Sliding	0.3 – 0.4 % 1 – 2 % has also been used	Martínez et al., 1999; Liu et al., 2018
Gliding	Up to 7 % in <i>Myxococcus xanthus</i>	Tchoufag et al., 2019

* The plate is inoculated at the bottom of the media instead of the top.