



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE ADHESIÓN DE
Piscirickettsia salmonis PARA LA ELABORACIÓN DE UNA
PROPUESTA EXPERIMENTAL *IN VITRO* SOBRE POLÍMEROS
SINTÉTICOS**

NATALIA CATALINA MONJE MORGAN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: JULIO LARENAS HERRERA

SANTIAGO, CHILE

2023



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS DE ADHESIÓN DE
Piscirickettsia salmonis PARA LA ELABORACIÓN DE UNA
PROPUESTA EXPERIMENTAL *IN VITRO* SOBRE POLÍMEROS
SINTÉTICOS**

NATALIA CATALINA MONJE MORGAN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

Nota Final

Prof. Guía: Julio Larenas Herrera	Firma
Profesor Corrector: Eduardo Kessi Campos	Firma
Profesor Corrector: Mariana Acuña Retamal	Firma

SANTIAGO, CHILE

2023

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a mi familia, en especial a mi madre Ivy Morgan y a mi abuelita Aída Sabat, por siempre brindarme el sustento emocional, moral y material para desenvolverme en la vida, tanto personal como profesional, por siempre confiar en mí, por su amor incondicional. Agradezco tenerlas en vida como mis grandes mujeres referentes.

Agradezco a mi profesor guía, al Dr. Julio Larenas, por nunca dejar de creer en mis capacidades y apoyarme en todo momento de este proceso, que, en medio de estallido social, pandemia y distancia geográfica, mantuvimos muy buena comunicación y desempeño; a los integrantes del Departamento de Patología por la buena acogida y disposición. Agradezco a todas las profesoras y profesores de la carrera, quienes dispusieron sus conocimientos y herramientas para formarnos como profesionales de la salud, veterinarios.

Agradezco a mis amigas y amigos de carrera, con quienes compartimos nuestras vidas desde la intimidad, la confianza, el goce y el amor; con quienes aprendí y conocí a una nueva y mejor versión de mí, enfrentando los altos y bajos de la trayectoria universitaria y el inicio de la famosa adultez. Amigos y amigas de la vida, la segunda familia.

Dedico este título profesional a mi familia, especialmente a mi hija Amanda, quien es mi mayor maestra de vida, con quien quiero compartir todo lo aprendido, el amor por los animales y la naturaleza, prometo contribuir en el cuidado de la madre tierra para que puedas disfrutar las aguas, el aire y la tierra libremente; a mi compañero Gonzalo, por creer y querer ser parte de un proyecto de vida en conjunto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Antecedentes generales de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	3
Manifestación clínica de piscirickettsiosis	4
Epidemiología	4
Transmisión horizontal	5
Transmisión vertical	6
Métodos de detección bacteriana	6
Generalidades de adhesión y formación de biopelícula de <i>P. salmonis</i>	8
3. OBJETIVOS	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
Búsqueda de información técnica y científica para investigación de adhesión de <i>Piscirickettsia salmonis</i> sobre distintas superficies, específicamente polímeros sintéticos.	11
Palabras claves	11
Criterios de Exclusión.....	11
Motores de búsqueda científica.....	11
Operadores de búsqueda	12
Fuentes científicas	12
Organización de la información	13

5. RESULTADOS	14
Antecedentes sobre la formación del Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP).....	14
Antecedentes sobre la formación de biopelícula bacteriana de <i>Piscirickettsia salmonis</i> .	18
Antecedentes de superficies de adhesión potenciales para <i>P. salmonis</i> disponibles en el ecosistema marino	24
Polímeros sintéticos en el mar.....	25
Análisis de antecedentes para elaboración de propuesta experimental de adhesión <i>in vitro</i>	33
Propuesta experimental: “Adhesión <i>in vitro</i> de EM-90 de <i>Piscirickettsia salmonis</i> sobre polímeros sintéticos”	35
Materiales y métodos de la propuesta experimental.....	36
6. DISCUSIÓN	42
7. CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Piscirickettsia salmonis</i> infectando a <i>Oncorhynchus mykiss</i>	15
Figura 2. Concha incubada con <i>P. salmonis</i> durante 24 h.....	16
Figura 3. Concha incubada con <i>P. salmonis</i> durante 48 h.....	17
Figura 4. PTFE incubado con <i>P. salmonis</i> durante 48 h.....	17
Figura 5. Biopelícula de <i>P. salmonis</i> analizada por MEB.....	19
Figura 6. Efecto de la mucosidad de la piel del salmón en las biopelículas de <i>P. salmonis</i> .	22
Figura 7. Efecto de microcavidades en polímeros	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis comparativo de estudios científicos que evidencian adhesión y/o formación de biopelícula de <i>Piscirickettsia salmonis</i> publicados entre los años 2003 y 2020.....	34
Tabla 2. Grupos experimentales de polímeros sintéticos sometidos al desafío de <i>P. salmonis</i>	39

RESUMEN

La piscirickettsiosis, enfermedad bacteriana que afecta a salmónidos, es causada por *Piscirickettsia salmonis*. En Chile, como consecuencia de las altas mortalidades, la baja respuesta efectiva a los tratamientos y las restricciones en el ámbito productivo, se producen pérdidas económicas significativas. Aunque la supervivencia del microorganismo fuera del hospedero se desconoce, posibles reservorios se han propuesto (copépodos, bivalvos y peces silvestres), pero no está claro el mecanismo de transmisión. Recientemente se evidenció la adhesión de *P. salmonis* a superficies de ovas, branquias, piel de trucha arcoíris, conchas de *Mytilus chilensis* y PTFE. Además, ha sido posible demostrar la formación de biopelícula *in vitro* sobre vidrio y plástico (placa de Petri y fondo de microplaca, respectivamente). Los materiales utilizados para la acuicultura en el mar son principalmente polímeros sintéticos (PS), y a su vez, también lo es la basura marina, lo cual representa una potencial superficie de adhesión. Este trabajo expone una revisión bibliográfica y una propuesta de estudio experimental de adhesión *in vitro* de la cepa EM-90 de *P. salmonis* sobre cinco tipos de polímeros sintéticos representativos: HDPE, PA, PVC, PTFE y PP. La propuesta incluye verificar la adhesión, mediante microscopía electrónica de barrido, a diferentes tiempos de interacción, y evaluar la viabilidad bacteriana post adhesión, mediante la observación del efecto citopático (ECP) sobre células CHSE-214. La propuesta pretende aportar antecedentes sobre la supervivencia del agente fuera del hospedero.

Palabras claves: *Piscirickettsia salmonis*, salmonicultura, adhesión bacteriana, biopelícula, polímeros sintéticos.

ABSTRACT

*Piscirickettsiosis, a bacterial disease that affects salmonids, is caused by *Piscirickettsia salmonis*. As a consequence of the high mortality, low effective response to treatment and restrictions in the production area, significant economic losses are produced in Chile. Although the survival of the microorganism outside the host is unknown, possible reservoirs have been proposed (copepods, bivalves and wild fish) but the transmission mechanism is not clear. The adhesion of *P. salmonis* to the surfaces of eggs, gills and skin of rainbow trout, PTFE, as well as shells of *Mytilus chilensis*, was recently evidenced. In addition, it has been possible to demonstrate *in vitro* biofilm formation on glass and plastic (Petri dish and microplate bottom, respectively). The materials used for aquaculture in the sea are mainly synthetic polymers (PS), and in turn, marine litter is made up mostly of PS, which represents a potential adhesion surface. This paper presents a literature review and a proposal for an experimental study of the *in vitro* adhesion of the EM-90 strain of *P. salmonis* on five types of representative synthetic polymers: HDPE, PA, PVC, PTFE and PP. The proposal includes verifying adhesion, by scanning electron microscopy, at different interaction times, and evaluating post-adhesion bacterial viability, by observing the cytopathic effect (CPE) on CHSE-214 cells. The proposal aims to provide information on the survival of the agent outside the host.*

Keywords: *Piscirickettsia salmonis, salmon farming, bacterial adhesion, biofilm, synthetic polymers.*

1. INTRODUCCIÓN

Según el Informe Sanitario de Salmonicultura de Chile, para el año 2021, la piscirickettsiosis era la principal causa infecciosa que ocasiona mortalidad en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), especie que abarca el 69% de los centros operativos en el país; a su vez, era la primera causa para el uso de antimicrobianos como tratamiento, la cual sobrepasa el 93% respecto a otras enfermedades. La mayor prevalencia de la enfermedad mantiene un comportamiento estacional, concentrándose principalmente en las épocas de verano y otoño en las Regiones de Los Lagos y de Aysén (SERNAPESCA, 2021).

La piscirickettsiosis tiene un gran impacto productivo y ecológico, ya que la manifestación de la enfermedad implica un gran costo económico, y además conlleva a un deterioro ambiental inherente. Mediante el desempeño de programas específicos de SERNAPESCA, entre otros, se busca reducir dicho impacto, apuntando hacia la sustentabilidad del rubro productivo (Rozas Serri *et al.*, 2017; SERNAPESCA 2021).

El agente etiológico es la bacteria gramnegativa *Piscirickettsia salmonis*, la cual genera sintomatología inespecífica tipo hemorrágica multisistémica, se transmite de manera horizontal y vertical (Rozas Serri y Enríquez, 2014). Se han realizado diversos estudios que evidencian la adhesión bacteriana y formación de biopelícula por *P. salmonis* a distintas superficies, sugiriendo que esta característica pudiese ser significativa para la transmisión y diseminación de la infección. En el año 2003, Larenas *et al.* comprobaron que la cepa LF-89 se adhiere a la pared de las ovas de salmónidos mediante unas estructuras que denominaron “Complejo de Adhesión Piscirickettsial” o CAP. Respecto de lo anterior, Bravo (2007), describió la formación del CAP sobre branquias y piel de trucha arcoíris. Larenas *et al.* (2019), por su parte, demostraron *in vitro* la adhesión de la bacteria sobre conchas de chorito (*Mytilus chilensis*) y comprobaron que esta podía ser liberada al medio e infectar una línea celular de salmón (CHSE-214). Otros estudios han detectado la formación de biopelículas sobre vidrio y plástico, y a su vez la viabilidad post liberación al medio; sin embargo, falta mucho por investigar en este ámbito (Marshall *et al.*, 2012; Albornoz *et al.*, 2017; Levipan *et al.*, 2020).

La formación de biopelículas sobre superficies abióticas representa un riesgo sanitario para la salmonicultura ya que da origen a posibles fómites, término que se utiliza para referirse a todo objeto inanimado que, por el hecho de estar contaminado con microorganismos, puede transmitir infecciones como un vector pasivo (Gobierno de España, 2020). Los plásticos, debido al amplio uso en la industria acuícola y a la gran presencia dentro de la basura marina, se consideran como un potencial fómite, pudiendo promover el desarrollo, persistencia y propagación de *P. salmonis*, afectando su vez la salud de los salmones (Rovira, 2006; Olivares, 2009; Erni-Cassola *et al.*, 2019; Levipan *et al.*, 2020).

Aparentemente los brotes de piscirickettsiosis ocasionados en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), son principalmente producidos por la cepa EM-90, variante descrita como la más patogénica y de la cual existen escasos estudios (Rozas Serri *et al.*, 2017).

El objetivo de esta memoria de título es realizar una investigación sistemática actualizada respecto de la adhesión y formación de biopelícula de *P. salmonis* y proponer un modelo experimental *in vitro* de adhesión de la bacteria sobre distintos polímeros sintéticos presentes en el entorno marino. Con ello se busca aportar información relevante respecto del comportamiento de la bacteria fuera del hospedero, con lo cual se podrá comprender de mejor manera el ciclo de vida libre y dilucidar si los plásticos utilizados en la salmonicultura pudiesen o no favorecer el riesgo de permanencia y propagación del agente.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes generales de *Piscirickettsia salmonis*.

Piscirickettsia salmonis es una bacteria gramnegativa que se aisló por primera vez en el año 1989, a partir de un brote de la enfermedad en un centro de cultivo de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) durante la fase de agua dulce en el canal de Huito, Comuna de Calbuco, Región de Los Lagos. El agente fue aislado y caracterizado a partir de tejido renal de salmón coho afectado por la enfermedad, el cual fue inoculado directamente en frascos de cultivo que contenían una monocapa de una línea celular procedente de salmón chinook CHSE-214 (ATCC CRL 1681), mantenida en un Medio Esencial Mínimo de Eagle con sales de Earle suplementado con 10% de suero fetal bovino (MEM-10), libre de antibióticos e incubado a 15 °C (Fryer *et al.* 1990; Fryer *et al.* 1992).

La bacteria es pleomórfica, aunque principalmente cocoide, sin cápsula, aeróbica, con un diámetro que varía entre 0,5 y 1,5 µm, intracelular facultativa, replica por fisión binaria dentro de vacuolas citoplasmáticas unidas a la membrana celular. Es capaz de sobrevivir hasta 120 h dentro de macrófagos, replicar y propagarse a través de ellos mediante la evasión de la respuesta inmune del hospedero, posiblemente porque *P. salmonis* induce una respuesta lisosomal limitada reduciendo la degradación bacteriana (Gómez *et al.*, 2009; Pérez *et al.* 2019). Puede crecer en medios enriquecidos libres de células, lo que facilita el proceso de multiplicación bacteriana *in vitro*. Al respecto, se utiliza caldo marino compuesto por agua de mar estéril, suplementado con L-cisteína entre otros aditivos (Yáñez *et al.*, 2012). La temperatura óptima de mantención y crecimiento es 15 °C, disminuyendo su replicación bajo los 10 °C y sobre los 21 °C; cultivos incubados a 4 °C por 60 días no presentan efecto citopático (ECP), por ende, no evidencia replicación bacteriana. El ECP *in vitro* en CHSE-214, incubado a 15 - 18 °C, alcanza el 100% aproximadamente a los 14 días (Fryer *et al.*, 1990).

En un comienzo la enfermedad se denominó “síndrome de Huító” o “síndrome del salmón coho”, luego se describió como “septicemia rickettsial salmonídea”, ya que inicialmente la bacteria se consideraba dentro del orden *Rickettsiales*, familia *Rickettsiaceae*; sin embargo, posteriormente se clasificó dentro del orden *Thiotrichales*, dando origen a una nueva familia nombrada *Piscirickettsiaceae*, género *Piscirickettsia*, denominándose oficialmente la

enfermedad como piscirickettsiosis. El agente está relacionado filogenéticamente con los géneros *Francisella*, *Coxiella* y *Legionella* (Mauel y Miller, 2002; Rozas Serri y Enríquez, 2014).

Con relación a la variabilidad genética, según análisis genómico de la subunidad 16S del ARN ribosomal, se han caracterizado cuatro grupos genético; el primero corresponde a la cepa de referencia LF-89, ATCC[R] VR 1361, el segundo a la EM-90. El tercero y cuarto incluye las cepas “LF-89 like” y las “EM-90 like”, las cuales se caracterizan por incluir cepas con baja variabilidad genética en relación con los primeros dos grupos respectivamente (Fryer *et al.* 1992; Isla *et al.*, 2019). Aparentemente las cepas de los grupos EM-90 y EM-90 like generan mayoritariamente la enfermedad en cultivos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), siendo ésta, además, más patogénica que las cepas de los grupos LF-89 y LF-89 like, en relación a la mortalidad acumulada, al tiempo transcurrido hasta la muerte, y también a la gravedad y agudeza de la manifestación de lesiones hemorrágicas (Rozas Serri *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2017).

Manifestación clínica de piscirickettsiosis

Los síntomas descritos son bastante inespecíficos, dentro de ellos se observa letargia, anorexia, alteraciones en el nado; oscurecimiento y alteraciones en la piel, tales como petequias, equimosis y úlceras hemorrágicas de hasta 2 cm de diámetro. También se evidencian alteraciones sanguíneas como anemia, lo que se manifiesta muy notoriamente la palidez en las branquias; en la necropsia se observa necrosis y aumento de tamaño en riñón, bazo e hígado. Otros hallazgos son ascitis, lesiones hemorrágicas en intestino, ciegos pilóricos y vejiga natatoria (Fryer *et al.*, 1992; Mauel y Miller, 2002; Rozas Serri y Enríquez, 2014)

Epidemiología

La bacteria se excreta por heces, orina, fluido celómico y seminal (Rozas Serri y Enríquez, 2014). Afecta a todas las especies salmónidas cultivadas hasta ahora en Chile, incluyendo al salmón del Atlántico, salmón coho, trucha arcoíris (*O. mykiss*) y salmón chinook (*O. tshawytscha*) (Lannan y Fryer, 1994; Rozas Serri y Enríquez, 2014). La mayor prevalencia de la enfermedad ocurre en la etapa “T3”, la cual considera el momento de mayor desarrollo del salmón o engorda (etapa final), en la cual se alcanza la mayor biomasa cultivada por

metro cúbico. Además, se evidenció experimentalmente que existe un efecto sinérgico de la densidad poblacional (20 kg/m³) y temperatura (14 °C) en jaulas de cultivo, generando mayor mortalidad versus temperaturas de 8 o 18 °C con biomasa de 5 kg/m³ (SERNAPESCA, 2021; Larenas *et al.*, 1997)

Se presenta principalmente entre los meses de noviembre y abril mostrando un carácter estacional (verano y otoño). Se concentra geográficamente en la Región de Los Lagos y Aysén (SERNAPESCA, 2021). Luego de ser descrita en Chile, *P. salmonis* fue identificada en cultivos de salmones al oeste de Canadá, Noruega e Irlanda, pero con mortalidades asociadas considerablemente menores (0,6 – 15%) (Mauel y Miller, 2002).

Transmisión horizontal

Se ha evidenciado experimentalmente que la bacteria ingresa principalmente a través de piel y branquias intactas (Smith *et al.* 1999). Animales sanos que han sido sometidos al contacto directo y/o indirecto con individuos experimentalmente inoculados, en un estanque de agua, resultan enfermos y con alta mortalidad (Salinas, 1998). Respecto a la inoculación experimental, la vía intraperitoneal y el contacto directo con las branquias, ocasionan significativamente un mayor riesgo de muerte en comparación con la vía oral (Smith *et al.*, 1999; Rozas y Enríquez, 2014). Es probable que la bacteria pueda sobrevivir fuera del huésped durante mucho tiempo, previo a infectar un nuevo salmón, como célula de vida libre, ya que se detectó *P. salmonis* mediante qPCR después de 30 y 40 días luego de haber vaciado las jaulas de cultivo de salmones (Olivares y Marshall, 2010; Marshall *et al.*, 2012).

Vectores y reservorios

No se conoce con claridad si existen reservorios naturales o vectores que faciliten la transmisión horizontal del patógeno. Sin embargo, dos estudios detectaron la presencia y permanencia de la bacteria sin generar lesiones histopatológicas, en órganos de choritos (*Mytilus chilensis*), molusco que por un lado es ampliamente cultivado en Chile y por otra parte está muy presente en el *fouling* de infraestructuras del rubro acuícola. Consiguiente a lo anterior, se concluyó que la bacteria puede estar presente específicamente en la glándula digestiva de *M. chilensis* por periodos de hasta 66 días, sugiriendo al chorito como posible reservorio natural para *P. salmonis* (Correal, 1995; Venegas, 1996; Campalans, 2011).

En Chile, la bacteria ha sido detectada en peces silvestres y en *Caligus rogercresseyi*, copépodo parásito muy prevalente en los cultivos salmónidos nacionales. Este último, causa estrés crónico, reducción del consumo de alimento, inmunosupresión y lesiones en la piel. Aparentemente, *C. rogercresseyi*, pudiese ser vector y/o reservorio de *P. salmonis* para salmónidos facilitando su ingreso mediante alteraciones de la dermis, contribuyendo de esta forma en la transmisión de la enfermedad (Smith *et al.*, 1999; Campalans, 2011; Vargas, 2014; Maquera, 2017).

Diversos autores han descrito la formación de biopelículas bacterianas por *P. salmonis*, lo que favorecería la permanencia del agente en el medio, y a su vez, la posterior liberación e infección de nuevos ejemplares de salmónes (Marshall *et al.*, 2012; Levipan *et al.*, 2020; Santibañez *et al.*, 2021). Lo anterior da origen a que distintas estructuras funcionen como fómites, pudiendo mantener y dispersar el agente en el ambiente acuático marino.

Transmisión vertical

Larenas *et al.* (2003) demostraron experimentalmente mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFAT) la transmisión vertical de *P. salmonis* desde ambos reproductores de trucha arcoíris a su progenie, en dicho estudio además se describió que la bacteria forma un Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP), el cual le facilita el ingreso de la bacteria a la ova. Describieron también la presencia de la bacteria en fluido seminal y celómico en la mayoría de los peces inoculados, y por otra parte se observó que las ovas provenientes de hembras no inoculadas que fueron incubadas en medios contaminados con la bacteria daban como resultado a una progenie positiva a *P. salmonis*, demostrando la transmisión durante la fertilización *in vitro* (Larenas *et al.* 2003). También se describió la transmisión vertical en alevines de salmón coho, los que a su vez algunos fueron portadores asintomáticos, favoreciendo la diseminación. (Larenas *et al.*, 2005).

Métodos de detección bacteriana

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad en los centros de cultivos se hace en base a la signología clínica y hallazgos macroscópicos patológicos sugerentes de piscirickettsiosis en ejemplares salmónidos. Como método complementario microscópico se utilizan las

tinciones de Gram, Giemsa y azul de toluidina para observar morfología bacteriana (Fryer *et al.*, 1990).

El método diagnóstico más concluyente es el aislamiento, el cual se realiza mediante la inoculación de cultivos celulares o en medios de cultivos libre de células (sólido o líquido), utilizando como inóculo tejido renal, hepático y/o encefálico; sin embargo, no se recomienda como un método diagnóstico rutinario, ya que es de fácil contaminación debido a que el cultivo debe estar libre de antibióticos (Lannan y Fryer, 1994; Mauel *et al.*, 2008).

Para confirmar la presencia de *P. salmonis* se utilizan técnicas inmunológicas como IFAT e inmunohistoquímica, ya sea en corte histológicos, líneas celulares, entre otros; y técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y técnica PCR múltiple, la cual permite diferenciar el genotipo, ya sea LF-89 o EM-90, en muestras de campo, siendo una alternativa rápida y asequible. La muestra idealmente debe ser de riñón, hígado, cerebro y/o sangre de peces enfermos (Lannan *et al.*, 1991; Mauel *et al.* 1996; Campalans, 2011; Rozas Serri y Enríquez, 2014; Isla *et al.*, 2021).

Desde diciembre del 2012, Chile cuenta con un Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Piscirickettsiosis (PSEVCSRS), orientado a la detección temprana, el seguimiento de los casos y la aplicación de medidas de control oportunas y graduales. Todos los centros activos con mortalidades bajas se categorizan como centros en vigilancia, sometidos a muestreos aleatorios cada dos meses utilizando como técnica diagnóstica la PCR. Los centros con una o más jaulas con mortalidades asociadas a *P. salmonis* mayor o igual a 0,35% semanal, pasan a ser Centros de Alerta (CA), sometidos a muestreos con diagnóstico mediante IFAT. Cuando un centro sobrepasa el 50% de sus jaulas con mayor o igual a 0,35% de mortalidad asociada al agente, o mortalidades mayor o igual a 0,35% semanal a nivel de centro por cuatro semanas consecutivas, pasa a ser un centro de alta diseminación (CAD), al cual se le hace un seguimiento por 6 semanas buscando bajar los índices de mortalidad, si esto no ocurre, se realiza un plan de cosecha anticipada o la eliminación de las jaulas afectadas. La muestra para realizar diagnóstico y control de la enfermedad, corresponde a riñón, hígado y cerebro de 15 peces (Chile. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, 2012).

Para realizar estudios de investigación científica se utilizan técnicas diagnósticas complementarias de imágenes, como lo es la microscopía electrónica de barrido (MEB), que permite visualizar estructuras, como también composición atómica mediante análisis elemental, distribución y cuantificación de elementos (Renau y Faura, 1994). Los estudios recopilados que evalúan adhesión y/o formación de biopelículas, en gran parte están realizados con la técnica MEB, la cual se detalla en la propuesta experimental.

Generalidades de adhesión y formación de biopelícula de *P. salmonis*

Se han descrito principalmente dos corrientes que describen el comportamiento de adherencia de *P. salmonis*. Primeramente, está la formación de un “Complejo de Adhesión Piscirickettsial” (CAP), descrito en el año 2003 por Larenas *et al.* el cual corresponde a una extensión de la membrana externa formando prolongaciones similares a pseudópodos a partir del primer minuto de exposición a la superficie de la ova, branquias y piel de trucha arcoíris (Larenas *et al.*, 2003; Bravo, 2007), como también sobre concha *M. chilensis* (Larenas *et al.*, 2019).

Por otra parte, se ha publicado por diversos autores, que la bacteria es capaz de formar una biopelícula, lo cual fue inicialmente descrito por Marshall *et al.*, en el año 2012, luego reafirmado por Levipan *et al.* (2020), Zúñiga *et al.* (2020) y Santibáñez *et al.* (2020).

El estudio de adhesión que corresponde a la antesala del planteamiento principal de la presente memoria, expuso la cepa LF-89 de *P. salmonis* a distintos polímeros sintético, de los cuales, el teflón, polímero descrito como antiadherente, evidenció mediante MEB la formación de CAP en los tres tiempos de estudio (1, 24 y 48 h) (Steven *et al.*, 2018).

Como ya fue mencionado anteriormente, los polímeros sintéticos están presentes en el ecosistema marino que habitan los salmones cultivados debido a dos grandes razones: su amplio uso en la infraestructura de los centros de cultivo y a la gran cantidad de desechos plásticos humanos que llegan de manera errante al lugar (Olivares, 2009; Erni-Cassola *et al.*, 2019). Dichas superficies plásticas, al ser apolares, irregulares, hidrofóbicas, de material perecedero versus materiales orgánicos biodegradables, representan superficies aptas para la colonización de bacterias formadoras de biopelículas, o incluso, adherencia de macroorganismos como moluscos, algas, y otros (Bendinger *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2020).

Respecto de lo anterior, surge la interrogante sobre el rol que pudiesen tener los plásticos sumergidos en el mar para la transmisión de la piscirickettsiosis, ya que la formación de biopelículas de *P. salmonis* sobre la superficie de éstos, podría favorecer la permanencia y propagación del agente. En respuesta a la problemática planteada, se realiza una recopilación sistemática de información de adhesión de *P. salmonis*, para la formulación de la metodología de un estudio experimental *in vitro* de adhesión de la bacteria sobre distintos polímeros sintéticos, y de este modo poder aportar información relevante del ciclo de transmisión de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Recopilar sistemáticamente información científica de la capacidad de adhesión o formación de biopelícula de *Piscirickettsia salmonis*, para elaborar una propuesta experimental de adhesión *in vitro* sobre polímeros sintéticos.

Objetivos específicos

- Realizar una revisión actualizada de los antecedentes bibliográficos de adhesión de *P. salmonis*.
- Realizar una revisión actualizada de los antecedentes bibliográficos de los polímeros sintéticos más utilizados en los centros de cultivo.
- Formular una propuesta experimental *in vitro* de adhesión de *P. salmonis* sobre polímeros sintéticos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de información técnica y científica para investigación de adhesión de *Piscirickettsia salmonis* sobre distintas superficies, específicamente polímeros sintéticos.

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática que consideró la recopilación de investigaciones de *P. salmonis* y su capacidad de adhesión y/o formación de biopelículas sobre distintas superficies, principalmente polímeros sintéticos.

Palabras claves

En la búsqueda de información se utilizaron las palabras: *Piscirickettsia salmonis*; adhesión bacteriana; complejo de adhesión bacteriana; biopelícula; salmonicultura; polímeros sintéticos; plásticos; microplásticos; ecosistema marino. Además, se utilizaron sus respectivas traducciones al inglés según correspondía.

Criterios de Exclusión

No se consideraron las siguientes publicaciones:

- Publicaciones de adhesión y/o formación de biopelículas de bacterias que no sean del ambiente marino.
- Publicaciones de adhesión y/o formación de biopelículas de *P. salmonis* con más de 19 años de antigüedad, ya que la primera publicación respecto de este tema fue el año 2003.
- Publicaciones que incluyen “*Rickettsia like*” no asociadas verdaderamente a *P. salmonis*.

Motores de búsqueda científica

Los motores de búsqueda y buscadores especializados fueron principalmente Google-Scholar, PubMed, Science Direct. También se consideró Catálogo Bello, buscador interno de Memorias de Título czy libros académicos de la Universidad de Chile. Además, se utilizaron documentos del tipo normativo y legislativo publicados en la página web del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERAPESCA) de Chile.

Operadores de búsqueda

Basado en la publicación de Ponce *et al.* (2014), se utilizaron “operadores o parámetros de búsqueda”, para especificar la búsqueda de la o las palabras claves, y así encontrar con mayor facilidad y precisión la información necesaria. Se destacan los siguientes:

- **Operador *doble comilla “ ”***

Se utiliza cuando se desea buscar una palabra o frase exacta. reduce la cantidad de resultados y nos devuelve solamente aquellos que se ajustan a la búsqueda concreta que deseamos realizar. No siempre es conveniente utilizarlo, ya que en algunos casos el buscador puede no devolvernos resultados.

- **Operador *OR***

Busca una o más palabras claves a la vez

- **Operador *AND***

Busca todas las palabras claves a la vez

- **Operador + (*inclusor*)**

Permite incluir una o más palabras clave que por alguna razón no son consideradas por el buscador como parte de sus resultados, como ocurre por ej., en el caso de las “StopWord” (palabras de significado vacío que no son registradas por las arañas de los buscadores a la hora de hacer una búsqueda. Están compuestas por artículos, pronombres y preposiciones).

- **Operador - (*excluser*)**

Permite excluir una o más palabras clave de los resultados de una búsqueda.

- **Operador *filetype***

Busca archivos con un formato determinado: pdf, ppt, doc, etc.

- **Operador *allintext***

Busca páginas que contengan la palabra clave en su contenido.

- **Operador ()**

Permite combinar operadores.

Fuentes científicas

Las principales fuentes de información fueron revistas científicas especializadas en microbiología y/o acuicultura. Se destacan, Journal of Fish Diseases, J. of Aquatic Animals Health, J. Fish Pathology, J. of Aquaculture, J. Research in Microbiology, J. Diseases of

Aquatic Organism, entre otras. Los estudios de Memorias de Títulos provenientes de Universidades reconocidas, entre ellas, Universidad de Chile, Universidad Austral, Universidad de Concepción, Universidad de Valparaíso, entre otras, según su vinculación con la Medicina Veterinaria y/o Biología Marina. Documentos nacionales del tipo normativo, legislativo, sanitario, entre otros, de SERNAPESCA.

Organización de la información

Para el desarrollo de los objetivos se organizó la información recopilada bajo tres principales ítems: “formación de CAP”, “formación de biopelícula bacteriana” y “superficies o sustratos de adhesión”. Además, a modo de resumen, para facilitar la toma de decisiones al momento de elaborar la propuesta del modelo experimental de adhesión *in vitro*, se realizó una tabla comparativa de las principales investigaciones vinculadas utilizando los siguientes ítems:

- Cepa de estudio de *P. salmonis*
- Medio de cultivo inicial: celular o libre de célula
- Medio de Incubación (Inóculo bacteriano)
- Sustratos de adhesión.
- Condiciones de incubación
- Técnicas diagnósticas *in vitro*
- Técnicas diagnósticas en terreno
- Resultados

5. RESULTADOS

El objetivo principal de esta investigación fue recopilar información científica respecto del comportamiento de adhesión de *Piscirickettsia salmonis*, material de alta prevalencia en el ecosistema marino de salmones de producción, para con ello fundamentar la metodología de la propuesta experimental que desencadena este estudio, cuyo propósito es evidenciar si existen diferencias del comportamiento de la bacteria frente a distintos plásticos y conocer la implicancia epidemiológica que esto pudiese tener en los centros de cultivo de salmones.

Antecedentes sobre la formación del Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP)

Los trabajos de Larenas *et al.* (2003) evidenciaron experimentalmente mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) un aparente mecanismo de adhesión de la cepa LF-89 de *P. salmonis*, que fue denominado “Complejo de Adhesión Piscirickettsial (CAP)”, el cual se caracterizó por ser una extensión de la membrana externa bacteriana, formando prolongaciones parecidas a pseudópodos, facilitando su unión al corion de las ovas de truchas para luego penetrarlas, tal como se observa en la figura 1, la cual muestra mediante microscopía electrónica de barrido el agregado bacteriano atacando la superficie de la ova. Se demostró que la bacteria tarda aproximadamente un minuto en establecer el CAP e ingresar a la ova. La estructura tiene una máxima longitud de 2,5 μm , tendiendo a la forma de “Panal de abeja”, observándose hasta el último periodo de tiempo del experimento (60 min). Posteriores trabajos han postulado que esta formación corresponde a un factor de virulencia bacteriana, pudiendo participar tanto en la transmisión vertical como en la horizontal, debido a que el CAP pudiese ser un mecanismo que facilite la entrada del agente al hospedero mediante la penetración de la piel y branquias (Quinteros, 2005; Bravo, 2007, Levipan *et al.* 2020).

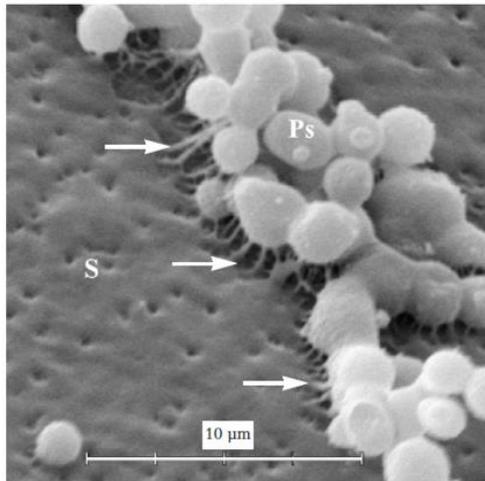


Figura 1. *Piscirickettsia salmonis* infectando a ovas de *Oncorhynchus mykiss*, a los 30 minutos de exposición experimental. Célula bacteriana (Ps) se presenta unida a la superficie (S) de la ova por medio del complejo de adhesión piscirickettsial (CAP). Microscopía electrónica de barrido 6700x (Larenas *et al.*, 2003).

Quinteros (2007), basándose en los resultados de Larenas *et al.* (2003), realizó un estudio comparativo de la cinética de formación de CAP sobre ovas de trucha arcoíris, utilizando dos cepas de *P. salmonis* de menor y mayor virulencia, LF-89 y SLGO-95 respectivamente. Mediante MEB evidenció que la cepa SLGO-95 presentó un complejo de adhesión más prominente, sugiriendo esto como un factor de virulencia. Además, la autora sugiere que el CAP podría corresponder a una biopelícula, que entregaría a la bacteria protección frente ambientes adversos, resistencia a antibióticos y persistencia en el medio acuático, pero que debe confirmarse a través de otras técnicas. Por su parte, Bravo (2007), describió mediante MEB la formación de CAP de las mismas cepas antes mencionadas, sobre branquias y piel de trucha arcoíris.

Larenas *et al.* (2019) demostraron experimentalmente mediante MEB que la bacteria se adhiere a la superficie de la concha de *Mytilus chilensis*, especie bivalvo endémica de Chile y además producida en la misma zona en donde están los salmones. La metodología se basó en el estudio de Larenas *et al.* (2003), el cual consistió en incubar trozos de conchas de 0,5 cm² durante periodos de 1, 24 y 48 horas con una suspensión bacteriana que incluía la cepa LF-89 de *P. salmonis* más MEM-4 en relación 1:9 con un título bacteriano de 10^{5.3} TCID₅₀/ml, a una temperatura de 15 °C. Además, describieron que la bacteria tiene la

potencialidad de liberarse nuevamente al medio e infectar una monocapa celular de la línea CHSE-214 produciendo el 100 % del efecto citopático (ECP) a los 14 días; este fenómeno pudiese tener implicancias epidemiológicas, ya que, como se mencionó anteriormente, estos moluscos portadores podrían servir como reservorios y/o vectores del agente (Larenas *et al.*, 2019).

Las figuras 2 y 3, muestran la adhesión de la bacteria a la concha de chorito mediante material fibrilar y granular, a las 24 y 48 h. respectivamente (Larenas *et al.*, 2019)

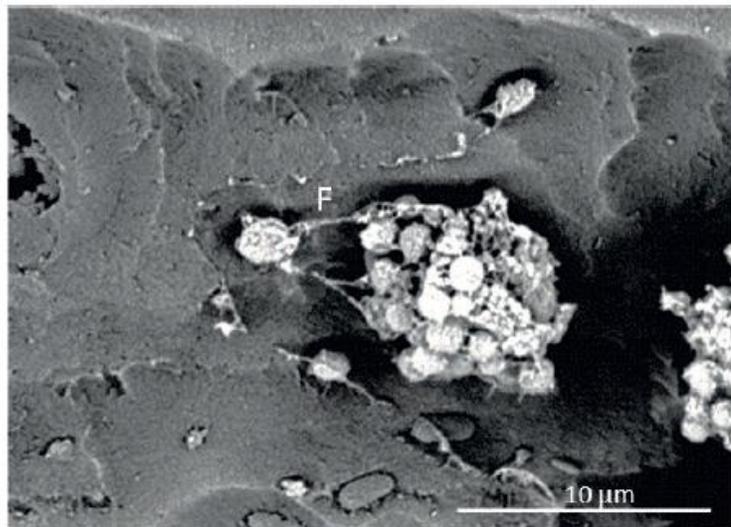


Figura 2. Concha de chorito incubada con *P. salmonis* durante 24 h. Aglomeración de bacterias de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, interconectados a través de material fibrilar (F) en la superficie de una concha de chorito. MEB. 8.000x (Larenas *et al.*, 2019).

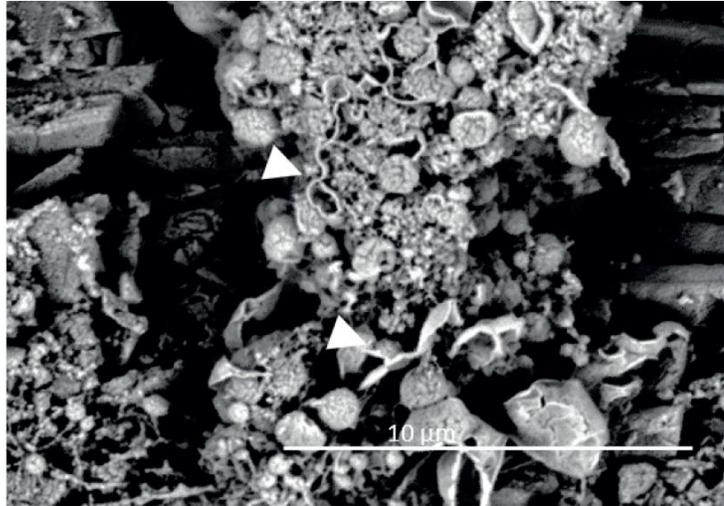


Figura 3. Concha de chorito incubada con *P. salmonis* durante 48 h. Se observa una agrupación de bacterias, rodeadas de material fibrilar, granular y estructuras que forman especies de tabiques. MEB. 10.000x (Larenas *et al.*, 2019).

En un estudio *in vitro*, en el marco del Programa para la gestión sanitaria en la Acuicultura, sobre Vectores y Reservorios de *P. salmonis*, describieron la formación de CAP sobre Teflón (Figura 4) y concha de *M. chilensis*, utilizando la técnica MEB y micro-nálisis elemental mediante energía dispersiva de rayos X, donde, además, caracterizaron la estructura de adhesión sugiriendo que se compone principalmente de elementos como Fe, Ni, K (Steven *et al.*, 2018)

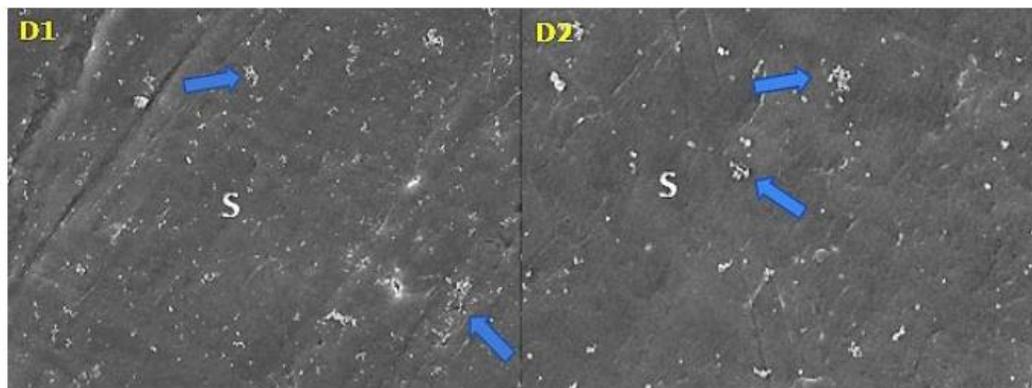


Figura 4. PTFE incubado con *P. salmonis* durante 48 h. Se observa diversos cúmulos conglomerados que se corresponden al CAP, se muestran con flechas color azul. 500x (D1) y 3000x (D2) (Steven *et al.*, 2018).

Antecedentes sobre la formación de biopelícula bacteriana de *Piscirickettsia salmonis*

Las biopelículas están presentes en distintas superficies expuestas a distintos ambientes, las cuales corresponden a agregados celulares microbianos dispuestos en una matriz de exopolisacáridos (EPS); tienen tasas de crecimiento reducido y regulación génica específica para su formación o desprendimiento (Donlan, 2002); pueden cambiar entre formas de vida plactónica (célula individual libre) y biopelícula. Las bacterias son células polarizadas con muchas proteínas localizadas asimétricamente reguladas temporoespacialmente, la cual responde a una dinámica que determina varios procesos fundamentales (Treuner y Sogaard, 2014).

La formación de biopelículas por parte de bacterias patógenas a menudo resulta en una menor susceptibilidad a los tratamientos con antimicrobianos, y en el desarrollo de infecciones crónicas; por lo tanto, la formación de biopelículas puede considerarse un factor de virulencia importante (Landini *et al.*, 2010).

Pueden formarse biopelículas en una amplia variedad de superficies, incluidos tejidos vivos, dispositivos médicos permanentes, sistemas de aguas industriales, potable o sistemas acuáticos naturales. Están compuestas por agua, microorganismos y una matriz de EPS compuesta principalmente de celulosa, proteínas, ácido nucleico y lípidos (Donlan, 2002).

La formación de una biopelícula es un proceso de varios pasos, en donde están involucrados distintos genes; implica adhesión de bacterias a la superficie, formación de microcolonias, maduración de estas colonias, crecimiento y desprendimiento de células que puedan colonizar nuevos hábitats, para ello debe haber una regulación del ciclo celular, segregación cromosómica, diferenciación y motilidad celular (Loeb y Neihof, 1975; Treuner y Sogaard, 2014).

En el ambiente submarino, lo primero que ocurre sobre una superficie expuesta, es la formación casi inmediata de una película acondicionadora compuesta de materia orgánica e inorgánica proveniente del medio marino, con lo cual se favorece la posterior colonización; las primeras evidencias fueron establecidas en 1975 por Loeb y Neihof, quienes observaron la formación de estas películas en superficies expuestas a agua de mar.

Similar escenario se observa en la superficie del esmalte de los dientes en cavidades bucales, entre otros (Donlan, 2002; Rummel *et al.*, 2017).

Recientemente se describió que la *P. salmonis* no utiliza el mecanismo *Quorum Sensing* (QS), el cual es reconocido por ser un sistema de comunicación presente en muchas proteobacterias gramnegativas que forman biopelículas (Levipan *et al.*, 2021).

Existen diversas condiciones ambientales que influyen en la formación de una biopelícula, tales como factores nutricionales del medio, temperatura, osmolaridad, pH, fluctuación de hierro, concentración de oxígeno, como también la resistencia a antibióticos, la hidrodinámica del ambiente acuoso, entre otras. Las biopelículas bacterianas son casi omnipresentes en todos los hábitats. Dentro de las biopelículas, las bacterias tienen más altas tasas de transferencia de genes y mayor tolerancia a los antimicrobianos, lo que conduce a un aumento en el número de cepas virulentas (Donlan, 2002; Marshall *et al.*, 2012; Levipan *et al.*, 2020).

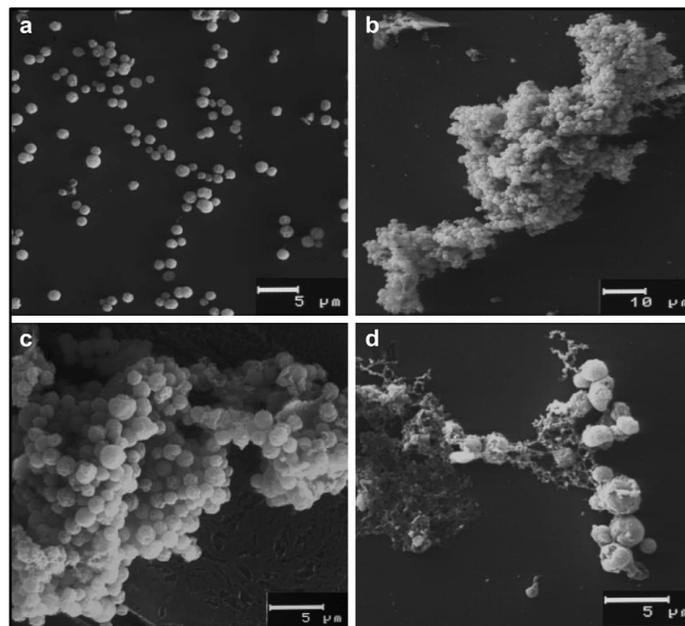


Figura 5. Biopelícula de *P. salmonis* analizada por MEB. (a) *P. salmonis* cultivada en MC1 (medio rico en nutrientes) durante 48 h., sin producir agregado celular (2000x) (b y c) *P. salmonis* cultivada en MB (medio pobre en nutrientes) durante 48 h; puede observarse agregación celular (1000x y 3000x respectivamente) (d) *P. salmonis* cultivada en MB durante 48 h, mostrando una supuesta matriz de EPS (3000x) (Marshall *et al.*, 2012).

El primer estudio que describe la formación *in vitro* de biopelícula por *P. salmonis* fue en el año 2012 por Marshall *et al.*, quienes en condiciones de laboratorio cultivaron la cepa LF-89 y la expusieron a condiciones ambientales estresantes (medio de cultivo con altos niveles de sal y bajos niveles de nutrientes, y una temperatura de 23 °C) por 96 horas. Para la visualización de los agregados celulares utilizaron microscopía de fluorescencia y MEB. Tal como se muestra en la Figura 5, una imagen obtenida mediante MEB, la bacteria expuesta al medio pobre en nutrientes durante 48 h., forma agregado celular. Además, realizaron una prueba con celulasa, exponiendo el agregado celular formado sobre un cubreobjetos durante 48 horas a la enzima, teniendo como resultado la desagregación celular, con lo cual se concluye que hay presente una matriz de polisacáridos, principalmente celulosa, elementos comunes en las biopelículas; esta reacción puede favorecer la colonización e invasión de nuevos sustratos. Se consideró la formación de biopelícula como un modo estratégico para persistir y sobrevivir en el medio marino. Además, demostraron la inducción de los genes *mazEF* del sistema toxina/antitoxina en etapas tempranas de la formación de biopelícula (Marshall *et al.*, 2012).

Albornoz *et al.* (2017) evidenciaron mediante tinción cristal violeta (CV) la formación de biopelícula por la cepa AUSTRAL-005 de *P. salmonis* a las 144 horas de incubación a 18 °C en pocillos de microtitulación; sugieren, además, que existe una correlación potencial entre la producción de biopelículas y el gen *cheA* descrito como clave en la modulación al inicio de la quimiotaxis bacteriana y la formación de biopelículas. La quimiotaxis corresponde al fenómeno por el cual se genera el movimiento celular, o bacteriano en este caso, en respuesta a un gradiente de concentración química, captado por quimiorreceptores que monitorean los cambios de las condiciones ambientales. A su vez, la quimiotaxis ayuda en la adhesión y el crecimiento bacteriano, pudiendo ser requisito previo para la supervivencia, el metabolismo y las interacciones bacterianas dentro de nichos ecológicos (Lauffenburger, 1991).

En otro estudio experimental *in vitro*, realizado por Levipan *et al.* (2020), describen la formación de biopelículas maduras por las cepas Psal-103 (LF-89 *like*) y Psal-104 (EM-90 *like*), incubadas a 18 °C, durante 288 horas (12 días). Primeramente, se evidenció la formación de agregados celulares sobre placas de Petri por ambas cepas, teñidos con CV y

visualizado mediante microscopía óptica. El agregado celular formado en la placa fue utilizado como inóculo bacteriano proveniente de biopelícula, para ser contrastado con el inóculo de origen planctónico (bacteria cultivada en medio líquido), cuya comparación se observó mediante el análisis de la respuesta citotóxica de la línea celular SHK-1, cultivada con ambos inóculos en microplacas de 24 pocillos; no se evidenció diferencia significativa del efecto citopático según sea el origen del inóculo bacteriano. También evaluaron el efecto de la calidad nutritiva del medio de incubación sobre el desarrollo de biopelícula mediante la visualización de la fluorescencia bacteriana, utilizando un “kit” de viabilidad bacteriana; cultivaron ambas cepas en placas de microtitulación de 96 pocillos utilizando un medio rico en nutrientes y otro pobre en nutrientes (agua de mar), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Observaron un alto índice específico de formación de biopelícula relacionado con el mayor contenido nutricional en suspensión del medio, es decir, a mayor contenido nutricional, mayor formación de biopelícula. Por otra parte, tal como se muestra en la Figura 6, mediante inmunofluorescencia utilizando un kit de viabilidad, se evaluó el efecto del mucus de la piel de salmón (secreción natural del hospedador que representa la respuesta inmune innata frente a patógenos) sobre biopelículas maduras, cuyos resultados mostraron diferencias en la tolerancia bacteriana a la secreción, siendo la cepa EM-90 *like* aparentemente más tolerante al mucus, junto con presentar un menor tiempo de retraso en la formación de la biopelícula. Se entiende como biopelícula madura, cuando se evidencian niveles máximos y comparables de la señal de fluorescencia emitida por bacterias vivas, con fluctuaciones estrechas en la viabilidad celular (Levipan *et al.*, 2020).

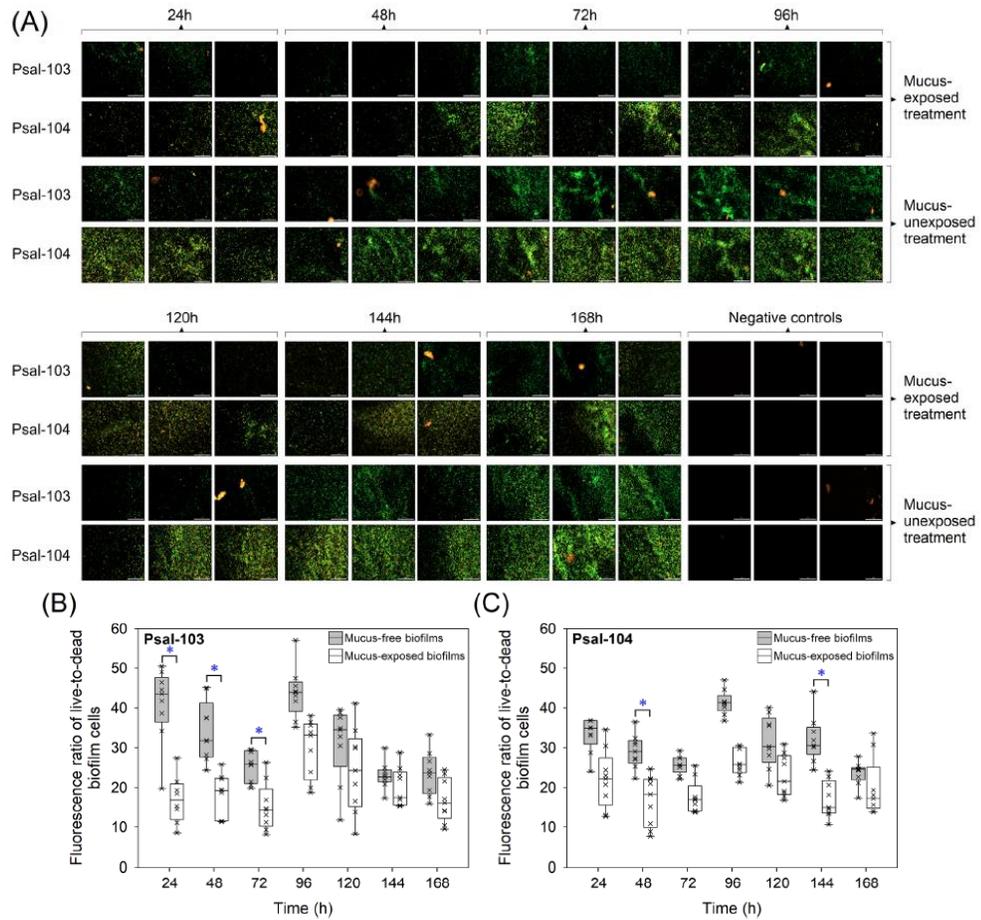


Figura 6. Efecto de la mucosidad de la piel del salmón en las biopelículas de *P. salmonis*. (A) Imágenes automatizadas de biopelículas formadas en agua de mar en microplacas de 96 pocillos. Todos los pocillos se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD. Todas las imágenes fueron capturadas de pocillos independientes y son representativas de tres experimentos independientes. (A y B) Proporciones de fluorescencia de bacterias vivas a muertas en biopelículas expuestas al moco de la piel del salmón formadas por *P. salmonis* (B) Psal-103 y (C) Psal-104. Los diagramas de caja muestran las medianas de los conjuntos de datos (x), los cuartiles superior/inferior (cajas), los rangos de valores (líneas verticales) y los valores extremos (círculos). Los datos se recogieron de tres experimentos independientes. Específicamente, las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las biopelículas libres de moco y expuestas al moco se indican mediante asteriscos y corchetes basados en la prueba de Tukey para combinaciones de tratamientos (Levipan *et al.*, 2020).

En consideración a lo descrito en el párrafo anterior, Levipan *et al.* (2020) discuten la aseveración de Marshall *et al.* (2012), respecto de la descripción del caldo marino como “medio pobre nutricionalmente”, ya que de él se han aislado varias bacterias heterótrofas, sumado a que utilizó una temperatura de 23 °C para cultivar el inóculo, siendo ésta al menos 5 °C mayor a la temperatura ideal de cultivo para *Piscirickettsia salmonis* (15-18 °C), por ende discuten que el “estrés nutricional” mencionado como un factor determinante, podría estar sesgado por el estrés ocasionado por la alta temperatura.

Zúñiga *et al.* (2020) realizaron un estudio, cuyo objetivo principal fue analizar la batería de genes asociados a la formación de biopelículas en distintas condiciones de cultivo y la adaptabilidad de éstas al medio. Utilizaron la técnica de cuantificación de biopelículas con el método de tinción CV en placas de microtitulación. Para ello estudiaron el comportamiento de las cepas LF-89, IBM-34 (EM-90 *like*) e IBM-40 (LF-89 *like*), cultivadas en medio libre de células (CASO) y en medio sólido (TSA), incubadas por 3 días (72 horas) a 18 °C en microplacas de cultivo de 96 pocillos, utilizando inóculos del primer y tercer pasaje. Este estudio reveló la formación de biopelículas por las tres cepas estudiadas, evidenciando mayor producción de ésta (descrito como mejor adaptabilidad al medio) en relación con el mayor número de pasajes o tiempo de replicación bacteriana, es decir, la biopelícula del inóculo del tercer pasaje fue más consistente, en cuanto al tamaño, versus la del segundo pasaje para las tres cepas en estudio; sin embargo, los resultados comparativos entre los dos medios, reveló que la cepa EM-90 *like* formó más biopelícula cuando era cultivada en medio libre de células. Se reveló la existencia de genes descritos que tienen funciones metabólicas, principalmente los genes *mazE-mazF*, y que a su vez desempeñan un papel relevante en la formación de biopelícula, descritos anteriormente por Marshall *et al.* (2012). Además, sugieren que existe otro gen expresado (gen *gnA*), implicado posiblemente en la inhibición del proceso de patogénesis de *P. salmonis*, lo que, a su vez, se relaciona con el uso de glutamina como elemento esencial para la formación de biopelícula.

Santibáñez *et al.* (2020) analizaron la formación de biopelículas de LF-89, LF-89 *like* y EM-90 *like* bajo distintas concentraciones de cloruro de sodio (7.1, 24.6, y 32.1 g/L) y hierro (0.01, 0.08, y 0.16 mM), cultivadas en microplacas de cultivo de 96 pocillos

incubadas a 18 °C sin agitación por 8 días. La cuantificación de la biopelícula se realizó mediante el método de tinción con CV a los 0, 2, 4 y 8 días post incubación, utilizando un microscopio invertido (aumento 100x) para la visualización, y cuantificado mediante la medición de la absorbancia de la tinción. Describieron que a mayor concentración de nutrientes aumenta significativamente la producción de biopelícula en la cepa LF-89 y EM-90 *like*. Respecto del análisis de virulencia y patrón génico en este estudio, los autores sugieren que no existe un único patrón de virulencia o perfil de expresión génica asociado a la condición planctónica (vida libre) o sésil (adherida) de *P. salmonis*, los cuales dependerían de cada cepa y condición bacteriana.

Aún no está claro el origen de la bacteria en los brotes de piscirickettsiosis, ni cuáles son los reservorios de ésta, sin embargo, se cree que la liberación de microorganismos patógenos desde biopelículas de diversas superficies podría jugar un rol importante en la aparición de brotes de piscirickettsiosis en centros de cultivo de salmones, particularmente en asociación con la presencia de lesiones en la piel. Esto contribuye a la persistencia y diseminación del agente en el medio marino, pudiendo eventualmente mantenerse como agente endémico en un centro cultivo, o incluso trasladarse a nuevas zonas geográficas, ya que la posible presencia de biopelículas sobre superficies plásticas flotantes u otras, facilitarían la dispersión (Marshall *et al.*, 2012; Levipan *et al.*, 2020).

Antecedentes de superficies abióticas de adhesión potenciales para *P. salmonis* disponibles en los centros de cultivo

Para fines de este estudio, se utiliza el concepto “superficie de adhesión” para referirse a cualquier material que evidencie adhesión y/o formación de biopelícula de microorganismos; se utiliza como sinónimo sustrato de adhesión.

Las distintas superficies tienen varias características físico-químicas que diferencian el proceso de fijación, ya sea en la velocidad y/o en la extensión del agregado celular. Se observó que la extensión de la colonización microbiana parece aumentar a medida que aumenta la rugosidad de la superficie. Se ha observado que los microorganismos generan adherencias más fuertes y estables sobre superficies hidrofóbicas, como lo son los polímeros sintéticos, entre los cuales uno de los que tienen mayor índice de hidrofobicidad es el polietileno (PE), ampliamente utilizado (Bendinger *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2020),

esto debido a lo siguiente: *“aparentemente ocurre algún tipo de interacción hidrofóbica entre la superficie celular y el sustrato que permitiría a la célula superar las fuerzas repulsivas activas dentro de una cierta distancia entre las superficies, permitiendo la adherencia irreversible”* (Donlan, 2002).

En el ecosistema marino hay distintos materiales que representan potenciales superficies de adhesión, de distinta naturaleza, ya sean organismos vivos o no. Específicamente para *P. salmonis*, como se detalló en el apartado anterior, se han descrito superficies bióticas (ova, piel y branquias de trucha arcoíris, concha de chorito) y abióticas (vidrio, y plástico). La búsqueda de información de la presente revisión respecto de este tema se ha enfocado en polímeros sintéticos.

Polímeros sintéticos en el mar

La presencia de polímeros sintéticos en el ecosistema marino está sujeta a diversas fuentes de origen, entre las que se destacan: la industria de la pesca y acuicultura, embarcaciones marinas, como también basura plástica de origen antrópico.

Los sistemas de cultivo para la salmonicultura en agua de mar que se utilizan actualmente en la industria son las balsas jaulas (circulares y cuadradas), estructuras semirrígidas con boyantes y estabilidad propia, ancladas al fondo marino en el lugar de operación mediante el denominado “sistema de fondeo”, las cuales están fabricadas principalmente de polímeros sintéticos y acero galvanizado. Cuentan con un sistema de redes peceras, loberas y pajareras, las cuales impiden el ingreso de otras especies marinas a la zona de cultivo; pasillos de tránsito para operarios, entre otros. Los plásticos más utilizados en dichas estructuras son: polietileno de alta densidad (HDPE), policloruro de vinilo (PVC) y polietileno rotomoldeado (PE); las redes se componen principalmente de poliamida o nylon (PA) y polipropileno (PP) (Olivares, 2009). Por otra parte, los sistemas de cultivo compuestos por balsas jaulas inmersos en mar abierto, presentan un potencial riesgo en la transferencia de enfermedades, debido a que no existe ninguna barrera impermeable entre el cultivo y el ambiente acuático, pudiendo diseminar patógenos fácilmente entre las especies en cultivo y las especies silvestres, y viceversa (Campalans, 2011).

Aparentemente existe mayor acumulación de basura plástica vinculada a la actividad económica desarrollada en el mar, es decir, la pesca y acuicultura. En general, el aumento de la actividad económica repercute sensiblemente en el mar chileno, ya que, al ser un país exportador de materias primas, el transporte marítimo es esencial para el mercado (Rovira, 2006). Se estima que anualmente ingresan alrededor de 8 toneladas de plásticos al océano (Erni-Cassola *et al.*, 2019).

La palabra plástico es un término genérico para referirse a los polímeros sintéticos; químicamente son macromoléculas que contienen una cadena principal hidrocarbonada, la cual se caracteriza por tener unidades (monómeros) que se repiten a lo largo de la cadena, como resultado de una reacción de polimerización. Si la cadena está compuesta por idénticos monómeros, hablamos de homopolímero, sin embargo, si hay una o más unidades distintas, nos referimos a copolímero. Existen diversos polímeros según distintos aditivos que se unen a la cadena principal, los cuales confieren diferentes propiedades (López, 2005).

Las reacciones de polimerización pueden ser por condensación (en etapas), o por adición (en cadena). La primera corresponde a una reacción entre dos grupos funcionales generalmente de distinta naturaleza, en donde se libera o elimina una molécula, por ejemplo, de agua (ej. poliamidas, poliésteres, policarbonato y poliuretano). La polimerización por adición corresponde a una reacción que sucede en presencia de “sustancias iniciadoras”, las cuales pueden ser radicales libres o iones; genera la adición continua de un monómero a una cadena en crecimiento que contiene un extremo activado. La configuración espacial de los polímeros tiene repercusión directa en sus propiedades, así, muchas propiedades físicas dependen fundamentalmente de la conformación (disposiciones relacionadas con la rotación en torno a enlaces sencillos) y la configuración (disposiciones relacionadas con el enlace químico de un átomo dado), ya que ambas afectan la proximidad que una cadena puede tener con respecto a otra (López, 2005). Se clasifican en tres grupos en función de su comportamiento mecánico y térmico: termoplásticos, termoestables y elastómeros.

Los termoplásticos se componen de largas cadenas de monómeros con enlaces covalentes principalmente, unidas entre sí mediante enlaces secundarios débiles; típicamente se comportan de una manera plástica y elástica. Al ser calentados a temperaturas elevadas, estos polímeros se ablandan y se conforman por flujo viscoso, y al enfriarse se endurecen

adaptando nuevas formas, pudiendo repetir este proceso varias veces sin generar cambios en significativos en las propiedades del material (Neri del Castillo, 2013).

Existen termoplásticos amorfos y semicristalinos, los cuales difieren según la organización y regularidad de la estructura, y tacticidad o arreglo estereoquímico (forma en la que se unen los átomos de la cadena principal polimérica), formando regiones amorfas (enlaces débiles) y cristalinas (enlaces fuertes), lo cual influye fuertemente en la expresión física del material, ya sea, en su rigidez, elasticidad y/o cristalinidad, es decir, varían las propiedades mecánicas (Neri del Castillo, 2013).

Las propiedades mecánicas (resistencia, rigidez y ductilidad), describen la forma en que el material responde a una fuerza aplicada, ya sea por un impacto único, un roce constante (fatiga o desgaste) o temperaturas elevadas; dicha respuesta ocurre según sea el movimiento de las cadenas de polímeros entre sí bajo la carga, ocurriendo las deformaciones elásticas (reversibles) y plásticas (irreversibles). Es posible que mediante la deformación provocada por fuerzas a lo largo del tiempo se creen microcavidades, las cuales pueden dar origen a grietas y fracturas en el material. Tal como se muestra en la Figura 7, al aplicarse una carga de tensión sobre la superficie del material, se alargan y desenredan las cadenas de enlace (regiones amorfas) que existen entre laminillas cristalinas (regiones cristalinas) dando origen a “huecos” o espacios entre laminillas, que conforme la fuerza aplicada se haga continua, las fibrillas se alargan y reducen su diámetro hasta que fallan, creando una verdadera grieta lo que origina el fallo o fractura del material (Neri del Castillo, 2013).

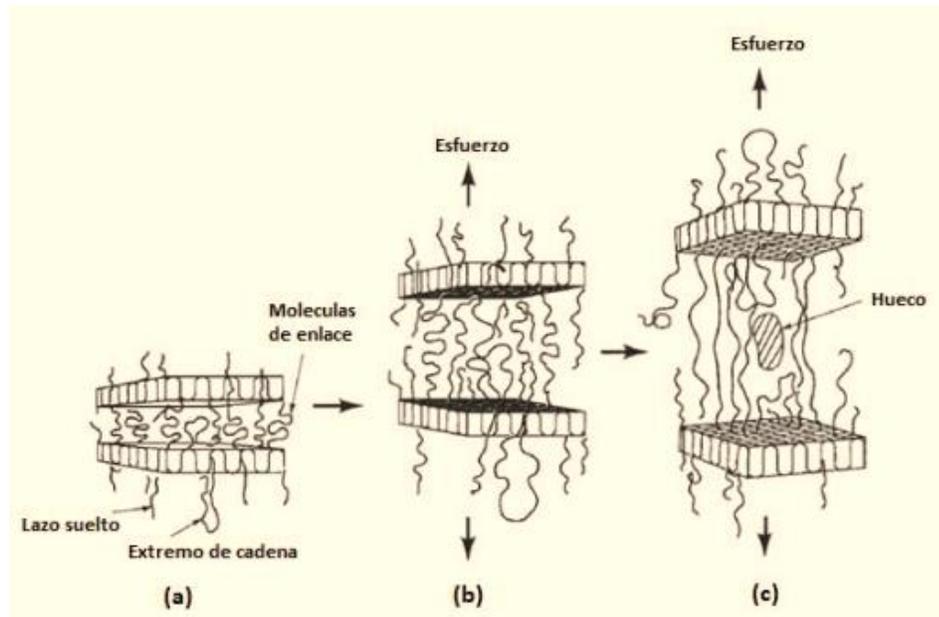


Figura 7. Efecto de microcavidades en polímeros. (a) Microcavidades en un polímero semicristalino. (b) Al aplicarse un esfuerzo externo, las cadenas de enlace entre laminillas de monómeros adyacentes se alargan y se desenredan. (c) Al perdurar la deformación puede crearse un hueco provocando una grieta y falla del polímero (Neri del Castillo, 2013).

Según las propiedades térmicas de los termoplásticos, se describen tres puntos de quiebre en los cuales cambia la estructura y comportamiento del material, ya sea, el estado sólido cristalino, vítreo y sólido amorfo o líquido, según corresponda. El cambio está determinado por la temperatura a la cual son expuestos (Neri del Castillo, 2013):

- **Temperatura de transición vítrea (T_g)** la cual corresponde temperatura a la que el polímero se ablanda debido a la aparición de movimiento molecular coordinado de largo alcance, ubicando la materia entre el estado de fundido y el estado rígido.
- **Temperatura de fusión (T_m)**, la cual corresponde a la temperatura en la cual la materia está en estado sólido.
- **Temperatura de degradación (T_d)**, en donde los enlaces covalentes entre los átomos de la cadena pueden destruirse y el polímero puede quemarse o carbonizarse.

Los termoplásticos más conocidos son el polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP), polibutileno, policloruro de vinilo (PVC), politereftalato de etileno (PET), teflón (PTFE), Nylon o poliamida (PA).

Uno de los plásticos más usados es el polietileno (PE), el cual se produce a partir del etileno, gas derivado del petróleo. Corresponde a un sólido parcialmente cristalino, un tanto flexible, posee una cadena larga de átomos de carbono con dos átomos de hidrógeno unidos a cada carbono. Las propiedades del material son: densidad 0,962 – 0,968 g/cm³; punto de fusión 128 - 135 °C; estabilidad térmica (-50 a 80 °C); tiene alta propiedad hidrofóbica (Neri del Castillo, 2013; Shiye *et al*, 2020). Si alguno de los átomos de carbono de la cadena de hidrocarburos tiene ramificaciones de cadenas de polietileno en vez de un átomo de hidrógeno, se habla de polietileno de baja densidad (LDPE), y si no se tiene ramificaciones de cadenas, se denomina polietileno lineal o de alta densidad (HDPE); la diferencia de sus propiedades y aplicaciones está dada por el grado de cristalinidad que cada uno puede alcanzar. El HDPE es un material opaco, cristalino, impermeable, con alta resistencia térmica y química, densidad entre 0,941 y 0,965 g/cm³, tiene alta resistencia al impacto y a formación de fisuras por esfuerzos ambientales, presentando una elevada rigidez (dureza 65 shore D); los principales usos son tuberías, recipientes, enseres domésticos, aislamiento para cables, juguetes y diversas estructuras rígidas. El LDPE tiene una baja cristalinidad, es más flexible; sus principales aplicaciones son en la fabricación de bolsas, tuberías y recubrimiento para cables (López, 2005; Neri del Castillo, 2013).

El polipropileno (PP) resulta de la polimerización de monómeros de propileno, muy estereorregular; tiene propiedades mecánicas similares al HDPE, se utiliza para la fabricación de tuberías, fibras para cuerdas (de arrastre, mallas, entre otras), artículos textiles, y películas para empaque de alimento (López, 2005).

El tereftalato de etileno (PET) es un poliéster aromático, derivado del petróleo. Inicialmente se patentó en la industria textil, pero hoy en día su principal uso es para el embotellado de bebidas carbonatadas. Tiene excelentes propiedades mecánicas, buena resistencia a grasas y aceites; presenta degradación por exposición a radiación UV; alta rigidez y dureza; baja tendencia a la deformación; baja resistencia al impacto; alto nivel de cristalinidad; punto de fusión 255 - 265 °C; temperatura de transición vítrea (T_g) 67 - 80 °C. El PET es uno de los

termoplásticos con mayor facilidad para ser reciclado y reinsertado en la línea productiva de plásticos para diferentes usos, en dónde es muy usual la mezcla polimérica con el fin de mejorar propiedades mecánicas (Neri del Castillo, 2013).

El poliestireno (PS), es formado mediante la reacción del estireno con radicales libres; existen distintos materiales según aditivos utilizados en la polimerización, entre los cuales están PS cristal (material rígido, transparente y quebradizo; ej.: cucharillas y vasos desechables), PS de alto impacto (alta resistencia mecánica y térmica; ej.: bandejas, cubiertas de notebook), PS expandido o EPS (en Chile conocido como plumavit; ej.: rellenos, embalaje), PS extruido (similar al EPS pero más rígido), y PS butadieno estireno o SBS (corresponde a un elastómero termoplástico; ejemplo: caucho para neumáticos, zapatos) (Lopez, 2005). Las propiedades mecánicas varían dependiendo del tipo de poliestireno. El EPS es un polímero muy difícil de reciclar, por lo que su acumulación terrestre y marítima es altísima, presentando un peligro potencial para las especies marinas, ya que lo confunden con alimento e ingieren.

El cloruro de polivinilo (PVC) es similar al PE, con la diferencia de que cada dos átomos de carbono, uno de los átomos de hidrógeno es reemplazado por un átomo de cloro. Se considera un plástico muy versátil, ya que puede sintetizarse mediante distintas reacciones de polimerización utilizando distintos aditivos con lo cual se obtienen distintas propiedades. Presenta características de impermeabilidad y de alta resistencia al fuego (es soldable). Sus principales usos son en la confección de tuberías de agua. Otras propiedades: densidad 1,30 – 1,58 g/cm³, temperatura de transición vítrea 60 - 70 °C, dureza 85 shore D (Braun, 2001; Plastigen, 2022).

La poliamida o Nylon (PA) se producen por reacciones de condensación entre una diamina y un ácido dibásico. Es un polímero cristalino, el cual tiene buenas propiedades de deslizamiento, por lo que se utiliza en estructuras como poleas, engranajes, guía de desgastes, ruedas, entre otros; tiene alta resistencia al impacto, tenacidad y resistencia a la fractura; tiene algunas desventajas tales como absorción de agua, rugosidad superficial, contaminación bacteriana, deformación, entre otros. Otras propiedades son: densidad 1,14 g/cm³, dureza 73 -78 shore D (Vojdani y Gitti, 2015; Plastigen, 2022).

El Politetrafluoretileno o Teflón (PTFE) es un fluoropolímero conocido por su alta resistencia a prácticamente todos los ambientes químicos. Se polimeriza a partir del monómero tetrafluoroetileno. Es un compuesto de alto peso molecular y presenta una estructura semicristalina. Entre sus propiedades están alta conductividad y resistencia térmica, alta resistencia mecánica, hidrofobicidad, no es inflamable; densidad $2,18 \text{ g/cm}^3$, dureza 51 shore D. La inercia y la baja energía superficial del PTFE restringen la adherencia de otras moléculas sobre su superficie, dificultando la formación de biopelículas, por lo que es el polímero más conocido que se utiliza en condiciones de altos estándares de higiene, ya sean en la industria alimentaria, como la industria de la salud, entre otras; además cuenta con la aprobación de la Organización Internacional “*Food and Drugs Administration*” que garantiza su uso en alimentación. Es por lo anterior que se utiliza como material antiadherente, ampliamente cotizado en medicina para la fabricación de implantes, *stent*, e instrumentación biomédica (Dhanumalayan y Girish, 2018; Plastigen, 2022).

Si bien los termoplásticos son los más comunes, están también los polímeros termoestables, compuestos por largas cadenas de moléculas de hidrocarburos, con fuertes enlaces cruzados entre las cadenas para formar estructuras de redes tridimensionales. Estos polímeros generalmente son más resistentes, aunque más frágiles que los termoplásticos; los termoestables no tienen una temperatura de fusión fija y es difícil reprocesarlos una vez ocurrida la formación de enlaces cruzados (Neri del Castillo, 2013).

Finalmente están los polímeros elastómeros, los cuales tienen una estructura intermedia, en la cual se permite que ocurra una ligera formación de enlaces cruzados entre las cadenas. Se caracterizan por tener la capacidad de deformarse elásticamente en grandes cantidades sin cambiar de forma permanentemente (Neri del Castillo, 2013).

La distribución de los plásticos sumergidos en el ecosistema marino está fuertemente influenciada por las características físico-químicas del material (densidad, dureza, etc.), ya que el efecto del roce constante genera la erosión de este, produciendo la fragmentación en partículas más pequeñas, las cuáles son conocidas como “microplásticos”; van desde 1 nm a 5 mm (Kershaw, 2015; Rummel *et al.*, 2017). La mayor concentración de microplásticos se encuentra en el sedimento marino, alcanzando 104 partículas por m^3 , versus las columnas de agua 0,1 - 1 partículas por m^3 . Los polímeros más abundantes y de

menor densidad son polipropileno y polietileno, los cuales se encuentran principalmente en la superficie; el poliéster, poliamida y acrílicos (grupo “PP&A”), al tener mayor densidad, se ubican principalmente en aguas profundas. Sin embargo, los polímeros de baja densidad al contaminarse biológicamente pueden llegar a hundirse debido al aumento en la densidad (Erni-Cassola *et al.*, 2019)

En consecuencia, el plástico, al permanecer en el medio marino, ya sea acumulado en el fondo marino, en las corrientes de agua o en la superficie, propicia una buena superficie de adhesión para el desarrollo de biopelículas, favoreciendo la permanencia y diseminación de patógenos en el ecosistema marino. La primera vez que se documentó la presencia de microorganismos en plásticos hallados en el mar fue en el año 1972, cuando se detectaron diatomeas y bacterias gramnegativas en plásticos en el Mar de los Sargazos (Zettler *et al.*, 2013; Levipan *et al.*, 2020). A su vez, también son escenarios propicios para la colonización de organismos pluricelulares (moluscos, algas, entre otras), los cuales dan origen a la “plastísfera”, término acuñado en el año 2015, que hace referencia a un arrecife microbiano artificial; similar es lo que ocurre con la formación de *fouling* tanto en centros de cultivo, embarcaciones, etc. La plastísfera puede trasladarse de una zona geográfica a otra mediante el arrastre por corrientes de agua, según condiciones, actuando posiblemente como fómite para microorganismos patógenos, o posible introducción de especies invasoras, lo cual puede generar impactos ecológicos y sanitarios en distintos lugares (Zettler *et al.*, 2013; De Tender *et al.*, 2015).

En diversos estudios, con bacterias marinas, se describe que no existen diferencias significativas en la manifestación de la biopelícula entre acero inoxidable, PVC, y PE a los 167 días; sin embargo, otros experimentos detectan lo contrario, es decir, un mayor número de bacterias en PE y PVC. Aunque en muchas publicaciones han demostrado que los microorganismos se adhieren más rápidamente a las superficies no polares (plásticos) que a las superficies hidrofílicas (acero inoxidable), es difícil sacar conclusiones anticipadas respecto de la influencia de las propiedades de los materiales para la formación de biopelícula, sobre todo en situación de campo, ya que hay diversas variables ambientales que participan. Incluso en experimentos *in vitro*, las propiedades fisicoquímicas difieren entre los tipos de polímeros con diferentes subunidades de monómeros y co-polímeros, que

se diferencian por grupos funcionales y aditivos, ampliando aún más la gama de propiedades del material (Rummel *et al.*, 2017).

Análisis de antecedentes para elaboración de propuesta experimental de adhesión *in vitro*.

A modo de síntesis, se organizó la información recopilada en la Tabla 1, la cual permite comparar los principales antecedentes de los estudios de adhesión de *P. salmonis*, publicados a la fecha que comprenden el objetivo principal de esta recopilación, y así facilitar la toma de decisiones al momento de determinar la metodología de la propuesta experimental.

De acuerdo con la Tabla 1, la cepa de *P. salmonis* más estudiada es la de referencia, LF-89, sin embargo, se han utilizado cepas del genogrupo EM-90 *like* en las últimas publicaciones, demostrando algunas diferencias en la magnitud de la expresión de la biopelícula, sugiriendo que EM-90 *like* es un grupo aparentemente más patogénico. Junto a lo anterior, al ser dicha cepa más prevalente en salmón del Atlántico (Saavedra *et al.*, 2017), principal especie producida en Chile, se considera un buen objeto de estudio para la propuesta experimental.

En los estudios recopilados, los tiempos de incubación utilizados para obtener biopelículas *in vitro* van desde los dos días hasta los 12 (+2) días (Larenas *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2012; Larenas *et al.*, 2019; Levipan *et al.*, 2020; Zúñiga *et al.*, 2020; Santibáñez *et al.*, 2020). Se determinó para la propuesta experimental utilizar tiempos 24 horas, 6 y 12 días, y así poder tener la posibilidad de comparar resultados con otros estudios similares.

Los sustratos de adhesión abióticos sobre los cuales se han descrito la formación de biopelículas por *P. salmonis* comprenden vidrio (portaobjeto y placa Petri) (Marshall *et al.*, 2012) y plástico del fondo de microplacas (Zúñiga *et al.*, 2020; Santibáñez *et al.*, 2020).

Tabla 1. Análisis comparativo de estudios científicos que evidencian adhesión y/o formación de biopelícula de *Piscirickettsia salmonis* publicados entre los años 2003 y 2020.

Estudio	Cepa(s)	Medio de crecimiento	Medio, T° y T' de incub. desafío 1	Medio, T° y T' de incub. desafío 2	Sustrato(s) de adhesión	Técnica(s) Diagnóstica(s)	Caracterización resultado
Larenas <i>et al.</i> , 2003	LF-89	CHSE-214, sin ATB, según descrito por Fryer <i>et al.</i> , 1990	Suspensión bacteriana 10 ^{5.2} TCID50 ml ⁻¹) 30°, 45°, 1°, 5°, 10°, 30' y 60' /15 °C	-	Ovas	MEB	Tarda 1 minuto en establecer CAP sobre ova de trucha
Quinteros, 2005	LF-89 y SLGO-95	CHSE-214, sin ATB, según descrito por Fryer <i>et al.</i> , 1990	Suspensión bacteriana	-	Ovas	MEB	SLGO-95 presentó un CAP más prominente, posible factor de virulencia
Bravo, 2007	LF-89 y SLGO-95			-	Branquias y piel	MEB	Forman CAP_sobre branquia y piel
Marshall <i>et al.</i> , 2012	LF-89	Placa de agar sangre con 0,1% L-cisteína y 1% glucosa a 23°C (Modificado por Mauel <i>et al.</i> , 2008)	Medio rico (MC1) + LF-89. 48 horas a 23 °C	Medio pobre (MB), altos niveles de sal y bajos niveles de nutrientes + LF-89. 48 horas a 23 °C	Cubreobjeto para Inmunofluorescencia. N.A. para MEB sedimento centrifugación	Microscopía de fluorescencia / MEB / Microscopio confocal / Celulasa	Agregado celular con MB. Celulasa (+) : Biopelícula Genes mazE-F involucrados en la formación de biopelícula
Steven <i>et al.</i> , 2018	LF-89	CHSE-214, sin ATB	Susp. bacteriana 10 ^{5.2} TCID ₅₀ /ml en MEM-4. 1, 24, 48 h / 15°C		HDPE, PVC, PA, PTFE, Concha de <i>Mytilus chilensis</i>	MEB y microanálisis elemental	CAP sobre PTFE y concha Composición CAP: Fe, Ni, K
Larenas <i>et al.</i> , 2019	LF-89	CHSE-214, sin ATB, según descrito por Fryer <i>et al.</i> , 1990	Susp. bacteriana 10 ^{5.3} TCID ₅₀ /ml en MEM-4. 1, 24, 48 h /15 °C.	-	Concha de <i>M. chilensis</i>	MEB, ECP en CHSE-214	Forma CAP_sobre concha ; ECP (+)
Levipan <i>et al.</i> , 2020	Psal-103 (LF-89 <i>like</i>) y Psal-104 (EM-90 <i>like</i>)	Ambas cepas en caldo AUSTRAL-SRS a 18° C .	Medio líquido AUSTRAL- SRS (rico en nutrientes) 288 h (12 días)/ 18 °C	Medio líquido pobre en nutrientes 288 h (12 días)/ 18° C	Placa de Petri (vidrio), Fondo de placa de microtitulación (plástico)	Tinción Cristal Violeta (CV) + microscopía óptica. ECP en SHK-1. Fluorescencia: mucus y nivel nutritivo medio	Forman biopelícula madura vidrio y plástico; ECP (+) inóculo planctónico y biopelícula. Medio nutritivo > volumen biofilm. EM-90 <i>like</i> más resistente al mucus y menor tiempo de retraso en formación biop.
Zuñiga <i>et al.</i> , 2020	LF-89, IBM-034 (EM-90 <i>like</i>) e IBM-040 (LF-89 <i>like</i>)	SHK-1, Medio L-15 Leibovitz a 20° C.	Medio líquido (CASO) + TBS + NaCl + 10%Leisteína + 10%SFB + FeCl ₃ , 18 °C por 3-10ds	Medio sólido, agar triptico de soja (TSA) + NaCl + Leisteína al 10%, glucosa al 20%, SFB, FeCl ₃ , a 18 °C por 7-20 días	Fondo de Placa de microtitulación	Cuantificación CV (Christensen, 1985)	Forman biopelícula madura , Adaptabilidad al medio: a > n° pasaje > producción biopelícula. Genes mazE-mazF involucrados en la formación de biofilm
Santibáñez <i>et al.</i> , 2020	LF-89, LF-89 <i>like</i> , EM-90 <i>like</i>		≠ concentraciones nutrientes NaCl (7.1, 24.6, y 32.1 g/L) y Citrato férrico (0.01, 0.08, y 0.16 mM), 192 h (8 ds) 18 °C. Suspensión bact. 1,5x10 ⁸		Fondo de Placa de microtitulación	Cuantificación CV 0, 2, 4, 8 ds	A > [nutrientes] > producción de biopelícula , en la cepa LF-89 y EM-90 <i>like</i> . Virulencia o expresión génica multifactorial (cepa/condición bacteriana planctónica ó sésil)

Las infraestructuras de los centros de cultivo de salmones están fabricadas principalmente con acero galvanizado y polímeros sintéticos, entre los cuales destaca respecto al uso el polietileno de alta densidad (HDPE) y poliamida o nylon (PA) (Olivares, 2009). Por otra parte, existe una gran concentración de residuos plásticos en el mar, los cuales generan un

impacto negativo para el ecosistema marino; en la superficie marina los plásticos más encontrados son polietileno y polipropileno (PP), y a medida que se vuelve más profundo, aumenta el poliéster, poliamida y acrílicos, dando origen, tanto la patísfera como al *fouling*, descritos anteriormente, permitiendo la mantención de micro y macroorganismos adheridos, sin embargo, se desconoce realmente la magnitud del daño (Zettler *et al.*, 2013; De Tender *et al.*, 2015; Erni *et al.*, 2019).

El estudio de Steven *et al.* (2018), el cual es parte de un Programa para la gestión de la salmonicultura en Chile, describe la adhesión de LF-89 a un plástico que es comercializado como antiadherente (PTFE), resultado que no es concluyente respecto del rol epidemiológico que pudiesen tener realmente las infraestructuras; la propuesta del presente estudio busca darle continuidad a esta premisa, utilizando la cepa EM-90, que, según lo descrito anteriormente, es más patogénica y virulenta.

Las técnicas diagnósticas descritas para evidenciar la biopelícula *in vitro* más utilizadas son microscopía electrónica de barrido (MEB), fluoroscopia y cuantificación con cristal violeta (Larenas *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2012; Larenas *et al.*, 2019; Levipan *et al.*, 2020; Zúñiga *et al.*, 2020; Santibáñez *et al.*, 2020). Además, se utilizan pruebas tales como la evaluación del efecto citopático (ECP) mediante microscopía óptica para medir la viabilidad bacteriana; la evaluación del efecto del mucus de la piel del salmón sobre la biopelícula mediante fluorescencia (Levipan *et al.*, 2020). La propuesta considera utilizar MEB para visualizar morfológicamente la posible biopelícula sobre los plásticos, ya que de este modo es comparable con el estudio de Steven *et al.* (2018), y además se conocen los protocolos de laboratorio de manera directa.

Propuesta experimental: “Adhesión *in vitro* de EM-90 de *Piscirickettsia salmonis* sobre polímeros sintéticos”

Se formuló una propuesta experimental *in vitro* de adhesión de *P. salmonis* para contribuir en la descripción del agente respecto el comportamiento de adhesión y formación de biopelícula para entender con mayor claridad el ciclo de transmisión de la enfermedad.

La formulación de protocolos de laboratorio se creó de acuerdo con los postulados descritos por Fryer *et al.* (1990), adaptaciones y/o modificaciones estudiadas en el Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas

del SERNAPESCA del Departamento de Patología Animal de FAVET, entre otros descritos por otros autores.

Materiales y métodos de la propuesta experimental

Línea Celular CHSE-214

La línea CHSE-214 (ATCC CRL 1681) derivada de riñón embrionario de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), será usada para la multiplicación de *Piscirickettsia salmonis*, y para la observación del efecto citopático (ECP) generado por la bacteria post formación biopelícula. Las células serán cultivadas de acuerdo a lo descrito por Fryer *et al.* (1990) a una temperatura de 17 °C en medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle (MEM) suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB) (MEM-4), 1% de L-glutamina y 1% de bicarbonato de sodio. Se realizará un control de procedimiento con la técnica PCR para asegurar que los cultivos celulares estén libres de *Mycoplasma*, ya que son unos de los principales contaminantes en las líneas de cultivo (Uphoff y Drexler, 2012).

Aislado de la cepa EM-90 de *Piscirickettsia salmonis*

Se utilizará un aislado de la cepa EM-90 de *P. salmonis*. La bacteria será mantenida en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile, y se cultivará de acuerdo con lo establecido por Fryer *et al.* (1990). Se utilizará un cultivo celular CHSE-214 con MEM-4, libre de antibióticos, mantenido a 15 °C en una estufa de cultivo refrigerada hasta que se produzca un 100% de efecto citopático (ECP). Se utilizará como inóculo el sobrenadante que se hará pasar por un filtro milimétrico con poros de 2,2 µm de diámetro para eliminar detritus celular, pero no así la bacteria, la cual tiene un diámetro máximo de 1,5 µm. La bacteria será utilizada en su tercer pasaje. Todos los procedimientos de replicación e inoculación serán realizados en un gabinete de bioseguridad clase II. Se realizará PCR como control positivo, y así corroborar la bacteria de estudio.

Agua de mar

El agua de mar que se utilizará será extraída de la bahía de Hueihue, Chiloé, Región de los Lagos (41°54'55" S y 73°29'24" W), la cual ha sido enviada en otros estudios por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP). Las características del agua, pH y salinidad, serán medidas en el laboratorio con un pH-metro y un refractómetro respectivamente. Los parámetros en general de la zona son: pH 7,73 y salinidad 32%, datos reportados por IFOP. Se filtrarán 500 ml de agua de mar utilizando una jeringa de 20 ml y un filtro con poro de 0,22 μm , se almacenará en frascos Schott de 50 ml y se esterilizará en autoclave.

Sustratos de adhesión

Se utilizarán cinco tipos de plásticos: Polietileno de alta densidad (HDPE), Policloruro de Vinilo (PVC), Poliamida o Nylon (PA), Politetrafluoretileno o Teflón (PTFE), Polipropileno (PP). Además, serán expuestas conchas de *M. chilensis* que serán clasificadas mediante las claves taxonómicas conocidas, las cuales serán utilizadas para el grupo control positivo.

Los plásticos serán adquiridos en una empresa comercial (se recomienda PLASTIGEN®); el formato de comercialización es en planchas de diámetro máximo de 4 mm. Los bivalvos serán conseguidos en el comercio oficial, considerando como criterio de selección: tamaño y superficie homogénea. Se utilizará un protocolo estandarizado de limpieza descrito por Larenas *et al.* (2019): en primera instancia las conchas y los plásticos serán lavados con abundante agua corriente para eliminar la suciedad gruesa, luego con agua tibia destilada, secados y trozados en piezas de 0,25 cm² aproximadamente. Luego serán cepillados con un cepillo dental tipo suave uno a uno con agua destilada y secados sobre papel absorbente. Se desinfectarán sumergidos durante 24 h en una solución de amonio cuaternario al 8,5%, dentro de vasos precipitados, rotulados y cubiertos con Parafilm®. Luego de transcurrido el tiempo, con la ayuda de una pinza y un cepillo estéril, se cepillarán nuevamente todos los trozos con la misma solución desinfectante; se realizarán 10 lavados con agua destilada estéril, y se dejarán sumergidos en esta misma por 24 horas. Finalmente se secarán dentro de la campana de flujo laminar sobre papel absorbente, sometidos a radiación UV por 20 min. por lado y almacenados en tubos estériles rotulados a -20 °C hasta su uso. Se realizará control de limpieza (CL) de todos los materiales trozados, en duplicado, los cuales serán

fijados en glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio (0,2 M), para luego ser procesadas y observadas mediante MEB.

Cinética de adhesión y formación de biopelícula

Se utilizará como guía el procedimiento de la investigación de Larenas *et al.* (2019) respecto de la formación de la adhesión de *P. salmonis* a conchas de *M. chilensis*, modificado para el presente estudio. Se formarán cinco grupos sometidos al desafío (en duplicado para cada técnica diagnóstica), cada uno representado por los distintos materiales plásticos (HDPE, PVC, PA, PTFE, PP) y el control positivo (concha de chorito), detallados en la Tabla 2.

El medio desafío (MD), corresponde al inóculo bacteriano, el cual será compuesto por una parte de sobrenadante de *P. salmonis* y nueve partes de agua de mar estéril filtrada (1:9). El título que se utilizará será calculado de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938), el cual será aproximadamente $10^{5,3}$ TCID₅₀/ml. El medio del grupo control negativo (MCN) mantendrá la misma proporción del MD, pero en MEM-4 y agua de mar estéril filtrada.

Tabla 2: Grupos experimentales de polímeros sintéticos sometidos al desafío de *P. salmonis*

Tiempo		24 horas (T1)		6 días (T2)		12 días (T3)	
GRUPOS SISTRATOS DE ADHESIÓN		Control negativo MEB	Exposición MD MEB/ECP	Control Negativo MEB/ECP	Exposición MD MEB/ECP	Control Negativo MEB	Exposición MD MEB/ECP
GC Posit	Concha de <i>M. chilensis</i>	GcCNT1	GcMDT1	GcCNT2	GcMDT2	GcCNT3	GcMDT3
G1	HDPE	G1CNT1	G1MDT1	G1CNT2	G1MDT2	G1CNT3	G1MDT3
G2	PVC	G2CNT1	G2MDT1	G2CNT2	G2MDT2	G2CNT3	G2MDT3
G3	PA	G3CNT1	G3MDT1	G3CNT2	G3MDT2	G3CNT3	G3MDT3
G4	PTFE	G4CNT1	G4MDT1	G4CNT2	G4MDT2	G4CNT3	G4MDT3
G5	PP	G5CNT1	G5MDT1	G5CNT2	G5MDT2	G5CNT3	G5MDT3

MEB = Microscopía Electrónica de Barrido; **ECP** = Efecto citopático; **MD** = Medio desafío *P. salmonis*; **CGPosit**= Grupo control positivo; **G** = grupo; **N.A.**= No aplica.

Se dispondrá de manera estéril un trozo de cada material por cada tubo Falcon de 10 ml, se rotularán todos los tubos según lo descrito en la tabla 2. Se utilizarán 5 ml de MD por tubo. Se incubará a 15 °C, correspondiente a la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de la bacteria (Fryer *et al.*, 1990) en una estufa de cultivo celular durante 15 días, Los tiempos de corte para cada muestreo y análisis serán: 24 h, 6 y 12 días (T1, T2 y T3 respectivamente). Se utilizará un soporte de tubos artesanal a medida, para mantener los tubos inclinados a 170° aproximadamente (casi horizontal) para aumentar el área de superficie que permite el intercambio gaseoso entre el medio y el aire dentro del tubo.

Se realizarán controles positivos y negativos en duplicados. El grupo control positivo estará constituido por un trozo de concha de *M. chilensis* inmerso en MD, ya que la adhesión de la bacteria ya está descrita sobre este material (Larenas *et al.*, 2019). Las condiciones de

cultivo y las técnicas diagnósticas serán las mismas que los grupos desafiados. Controles negativos se realizarán para cada uno de los grupos y se utilizará 5 ml de MCN. Además, se realizará un control de viabilidad bacteriana, el cual estará compuesto por 5 ml del MD sin ningún sustrato de adhesión.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) con dispersión de Rayos X

Todos los trozos de materiales desafiados, al término del tiempo de incubación, serán fijadas en glutaraldehído al 3% en solución tampón cacodilato de sodio (0,2 M) y mantenidas a temperatura ambiente durante al menos 24 h. Posteriormente las muestras se procesarán en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, donde se realizarán lavados con agua destilada. Luego serán deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), llevadas a secado de punto crítico y sombreadas con oro con un espesor de 20 nm. Las muestras se guardarán al vacío en un desecador hasta el momento de su observación, en un microscopio de barrido (SEM/EDS marca JEOL® modelo JSM-IT300LV) ubicado en el laboratorio mencionado. Se analizará si la bacteria se adhiere o no a la superficie de los plásticos, y luego, de haber adhesión, se describirán las características de la unión de acuerdo a lo descrito por Larenas *et al.* (2019), y de este modo poder evidenciar si los distintos materiales plásticos interfieren de algún modo en la adhesión bacteriana para la formación de biopelículas.

Evaluación del efecto citopático

Para los grupos que presenten adhesión o biopelícula bacteriana, se evaluará la formación de efecto citopático sobre la línea celular CHSE-214, para de este modo evidenciar la capacidad de *P. salmonis* de infectar las células post adhesión. Se ocuparán como inóculo los trozos de polímeros incubados que presentan adhesión y los controles negativos de todos los materiales. El procedimiento comenzará con la extracción del trozo de plástico de cada tubo incubado según corresponda, utilizando una pinza estéril. Luego será enjuagado tres veces con una solución estéril de buffer fosfato salino (PBS). En seguida los sustratos serán colocados cuidadosamente dentro de una botella de cultivo celular de la línea CHSE-214, y serán incubadas a 15 °C hasta que se observe el 100% del ECP. La observación del efecto citopático, demuestra que la bacteria es capaz de ingresar y multiplicar, por ende, infectar,

luego de formar la biopelícula. Se utilizará un microscopio óptico de luz, de acuerdo con lo descrito por Fryer *et al.* (1990) y Larenas *et al.* (2019).

6. DISCUSIÓN

Si bien se describió en distintos estudios científicos que *Piscirickettsia salmonis* forma biopelícula, aún queda mucho por descubrir para conocer con mayor certeza el ciclo de transmisión de la enfermedad. Los antecedentes recopilados de adhesión de la bacteria se concentran principalmente en la cepa de referencia, LF-89, y a su vez, si bien existe un estudio que buscó describir comparativamente la adhesión de *P. salmonis* sobre distintas superficies poliméricas sintéticas, no logró tener una conclusión sustancial al respecto. La presente propuesta experimental aborda un área de investigación relevante para conocer la supervivencia del agente fuera de la célula hospedador durante tiempos más prolongados a todos los descritos. Los resultados del experimento podrían aportar antecedentes para seleccionar de mejor manera los materiales utilizar o evitar utilizar, en infraestructuras y embarcaciones marinas. La técnica propuestas para visualización de la adhesión o biopelícula bacteriana es la microscopía electrónica de barrido, la cual permite caracterizar morfológicamente el tipo de agregado formado; se decidió utilizar este método diagnóstico ya que corresponde a la misma técnica utilizada por los estudios publicados por Larenas *et al.* (2003 y 2019), en donde el primer autor corresponde al docente guía de esta memoria de título, por concluyente esto nos otorga un beneficio en términos de investigación, ya que hay conocimiento experiencial de los protocolos de laboratorio, y para así sobre éstos aplicar modificaciones buscando mejorar el método.

Cuando existen brotes de enfermedades de alto riesgo, como lo es piscirickettsiosis, se activan protocolos del programa de control y erradicación de SERNAPESCA, entre los cuales se incluye restricciones en el tránsito de embarcaciones, tratamientos antimicrobianos, cosecha anticipada o descarte de la masa producida involucrada, además de las medidas generales rutinarias post cosecha (eliminación total del *fouling* existente en las instalaciones del centro de cultivo, cuarentena de tres meses, entre otras); sin embargo, piscirickettsiosis sigue siendo endémica en los cultivos de Chile, por ende sigue existiendo el riesgo de que los agentes patógenos puedan diseminarse a través de los cuerpos de agua como microorganismo de vida libre, ya sea mediante vectores activos como peces portadores silvestres, moluscos, entre otros; o mediante fómites, los cuales mantienen la bacteria en su estado de vida sésil dentro de una biopelícula (Mortensen, 2000, citado por

Vargas, 2014). Por todo lo anterior, es que se considera que las restricciones impuestas no permiten asegurar el total control de la diseminación de la enfermedad.

Se ha descrito la presencia de *P. salmonis* en peces silvestres en distintos países, entre las cuales está la lubina o róbalo (*Dicentrarchus labrax*) en Grecia (McCarthy *et al.*, 2005, citado por Vargas, 2014), y en corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) en cultivos en California (Chen *et al.*, 2000a, citado por Vargas, 2014); en Chile se describió en penegal (*Helicolenus lengerichi*), en camote o camotillo (*Pinguipes chilensis*), especie que habita desde el Perú hasta la Región de Magallanes, y en congrio colorado (*Genypterus maculatus*) (Vargas, 2014). Además, *Mytilus chilensis*, tanto en cultivos productivos como en vida silvestre podrían servir como vectores o biocacumuladores de la bacteria, como también el copépodo parásito *Caligus rogercresseyi* (Campalans, 2011). Todo lo anterior podría indicar que la bacteria se encuentra presente en el ecosistema marino en distintos reservorios o diseminadores, de manera que se infiere que debieran existir otros factores para la manifestación de la enfermedad.

Pareciese que la naturaleza química de la película acondicionadora que se forma en la superficie plástica al entrar en contacto con el medio acuoso marino, compuesta por materia orgánica e inorgánica, es más relevante para el establecimiento de microorganismos, que las características intrínsecas del material (rugosidad e hidrofobicidad de la superficie, interacciones electrostáticas), con lo cual se asume mayor importancia en dicho proceso (Loeb y Neihof, 1975; Rummel *et al.*, 2017). Dicho lo anterior, la relación entre la película y la adhesión de *P. salmonis* parece ser un campo interesante para una futura investigación.

La infraestructura de los centros de cultivo de salmones representa una posible gran superficie abiótica para la adhesión de diversos microorganismos, la cual está compuesta principalmente de diversos plásticos y acero galvanizado (Olivares, 2009). Los centros de cultivo tradicional de balsas jaulas, al estar inmerso en mar abierto, están expuestos a variables ambientales que no se pueden controlar, ya sean los cambios bruscos en la temperatura del agua, la presencia e invasión de otras especies, afloramiento de algas nocivas, entre otras, las cuales pueden provocar dificultades en la crianza y manejo de los ejemplares salmónidos, ya sean, brotes de enfermedad, mortandad, escape de animales por daños estructurales, etc. (Ahmed y Turchini, 2021). Sin embargo, hay decisiones que

pueden marcar la diferencia dentro de cada centro de cultivo; una de las aristas para abordar la problemática sanitaria pudiese ser escoger materiales para la infraestructura que se hayan evidenciado como anti-adherentes, para ello es imprescindible profundizar estudios de investigación relacionado y así fundamentar las decisiones. La propuesta se limita a hacer un análisis comparativo según la variable “tipo de material” (HDPE, PVC, PA, PTFE, PP), dejando de lado factores ambientales, ya sean, temperatura, disponibilidad de nutrientes, exposición a luz ultravioleta (UV), entre otros, lo cual desencadena la oportunidad de abrir campo a nuevas investigaciones, ya sean *in vitro* o de campo.

El manejo productivo, la limpieza y desinfección de los centros de cultivo, entre otros, se dificulta al ser sistemas abiertos inmersos en el mar, ya que las variables ambientales son muy difíciles de controlar, sin embargo, existen alternativas de sistemas acuícolas para la producción del salmón ubicadas en tierra, como también sistemas acuícolas “semicerrados” inmersos en el mar, los cuales permiten controlar las variables ambientales de mejor manera y así evitar posiblemente la aparición de un brote de alguna enfermedad (Ahmed y Turchini, 2021).

Las pisciculturas de recirculación basadas en tierra o sistemas de acuicultura en recirculación (RAS) pueden permitir el ciclo productivo completo del salmón, considerando el uso de agua dulce y agua salada; la principal característica es la recirculación de gran parte del agua utilizada en el proceso. Los RAS son sistemas agrícolas intensivos altamente productivos, ecológicos y eficientes en el uso del agua, que no están asociados con impactos ambientales adversos, como la destrucción del hábitat, la contaminación del agua y la eutrofización, el agotamiento biótico, los efectos ecológicos en la biodiversidad debido al escape de peces, brotes de enfermedades infecciosas y transmisión de parásitos, presencia de vectores, fómites o reservorios de patógenos; se ven mínimamente afectados por los factores climáticos. Si bien una de las desventajas son el alto costo de inversión y la generación de gases de efecto invernadero, las diversas empresas que ofrecen estas instalaciones buscan apuntar hacia la utilización de energías sostenibles no contaminantes, principalmente mediante el uso de piezas mecánicas, alcanzando óptimos cercanos al 100% en la reutilización de agua, utilizando procesos de filtración, desalinización, salinización, y purificación (Ahmed y Turchini, 2021).

Sin embargo, en los RAS existe de igual modo el riesgo de que los microorganismos se establezcan en el sistema a través de biopelícula. En un estudio que comparan distintos métodos de sanitización de los materiales usados en la piscicultura indican que el hipoclorito de sodio y el ácido peracético son los sanitizantes más efectivos (99 y 98 % respectivamente), versus el burbujeo con ozono en el tanque que demostró un 32 % de efectividad (King, 2001).

Recientemente se aprobó el proyecto “Crianza y engorda de salmónidos en estanques en tierra” de la empresa Bordemar-Tumbes SpA, ubicada en la Región del Biobío, la cual permite sostener una producción anual de 4 mil toneladas al año de salmónes y truchas, desde ovas a peso comercial de calidad *premium grade* (5 kg), su principal característica es operar en un ambiente controlado, mediante un circuito cerrado de agua dulce desinfectada y salada, alimentando estanques ubicados en galpones cerrados (Cabello, 2018). Aún falta mucha investigación para alcanzar un ideal en estas tecnologías, y son principalmente los países desarrollados, como Noruega y China, quienes llevan la vanguardia en los avances tecnológicos basados en estudios del proceso completo, para de este modo disminuir los efectos adversos y así alcanzar la sustentabilidad de la producción (Song *et al.*, 2019).

Respecto de otras bacterias que afecten a los salmónes, Coquet *et al.*, describieron la adhesión y formación de biopelícula por *Yersenia ruckeri* sobre materiales utilizados en los centros de cultivo de peces; esta bacteria genera infección intestinal con congestión hemorrágica y es de gran importancia económica en cultivos de trucha arcoíris, mostrando mayor preferencia sobre superficies de características hidrofílicas y con mayor rugosidad. Cabe mencionar que esta bacteria ha sido hallada hasta dos meses después del vacío de jaulas post brote infeccioso (Coquet *et al.*, 2002).

Se realizó un estudio utilizando como técnica diagnóstica MEB para evidenciar la colonización y formación de biopelículas por una comunidad diversa de microorganismos (heterótrofos, autótrofos, depredadores y simbiosis) en plásticos recolectados en el norte del Océano Atlántico, en el cual describen a los plásticos, específicamente PP, como posibles vectores pasivos, o fómites, para la dispersión de *Vibrio* spp., grupo de bacterias principalmente zoonóticas, pero que a su vez pueden afectar a los salmónes, actuando como patógenos secundarios, específicamente *Vibrio ordalii* y *V. anguillarum* (Zettler *et al.*

2013). *V. ordalii* ocasiona la vibriosis atípica, enfermedad recientemente descrita en los salmones producidos en Chile, tiene el potencial de causar graves pérdidas económicas, sin embargo, aún no se dilucidan los factores que determinan su virulencia; 6 de 18 cepas chilenas estudiadas produjeron una formación de biopelícula en la superficie de PE después de 2 horas post inoculación (Ruiz *et al.*, 2015).

Existen otras bacterias patógenas que afectan a los salmones formadoras de biopelícula, entre las cuales se describen, *Streptococcus phocae* (González *et al.*, 2011), *Flavobacterium columnare* (Cai *et al.*, 2013) y *Flavobacterium psychrophilum* (Sundell y Wiklund, 2011).

La basura marina está constituida en su mayoría por plásticos alcanzando entre un 60 y un 95% en algunas áreas del total de la basura, generando daños significativos para la biota marina. Esta también representa una potencial superficie para adhesión y formación de biopelículas bacterianas, las cuales podrían de igual modo convertirse en fómites para la transmisión de la piscirickettsiosis.

Los microplásticos en el mar, colonizados o no por microorganismos, se caracterizan por tener tamaño y forma heterogénea, que cambian con el tiempo, según exposición a la luz UV, oxidación, fricción, entre otras. Además, se mezclan con partículas naturales en suspensión las cuales pueden interferir sinérgicamente en la formación de biopelículas (Rummel *et al.*, 2017). La meteorización (desgaste físico) y fragmentación de los plásticos aumenta la relación superficie-volumen, aumentando con ello el área de colonización bacteriana (biopelícula), y a su vez favoreciendo al proceso de biodegradación, ya que los organismos colonizadores liberan exoenzimas y provocan la descomposición química del polímero, produciendo fragmentos de cadena corta, los cuales pueden atravesar la membrana celular bacteriana y convertirse en fuente de carbono y mineralizarse a CO₂, H₂O y CH₄, siendo esto muy importante para la fracción de microplásticos que se hunden, ya que puede ser el camino para disminuir o eliminarlos del sedimento o columnas de agua, particularmente si las condiciones no son hipóxicas. Sin embargo, la formación de biopelículas también puede frenar el proceso de “envejecimiento abiótico”, por ejemplo, al proteger el plástico flotante de la luz UV, el oxígeno, o la temperatura. Algunos plásticos tienen mayor facilidad de ser biodegradados, sin embargo, los homopolímeros sintéticos que contienen enlaces Carbono-Carbono en su estructura polimérica son menos

susceptibles a la biodegradación (Rummel *et al.*, 2017). Dicha variabilidad en las condiciones ambientales dificulta la investigación en campo, ya que se obtienen resultados menos comparables, por ende, conclusiones poco objetivas; sin embargo, es imprescindible hacer un alcance respecto de la necesidad de estudiar el comportamiento bacteriano de *P. salmonis in situ* sobre los plásticos, ya que no hay estudios relacionados a la fecha.

Por otra parte, aves, mamíferos y peces marinos confunden los plásticos flotantes con alimentos, viéndose afectados negativamente, generando, entre otras cosas, problemas de toxicidad y obstrucción. Año tras año hay atrapamiento de la avifauna marina en las redes de pesca abandonadas, ocasionando grandes mortandades; existe un peligro potencial para los ecosistemas marinos por la acumulación de desechos plásticos no flotantes en el fondo del mar, principalmente termoplásticos, pudiendo inhibir el intercambio de gases entre las aguas suprayacentes y las aguas de los poros del sedimento, y perturbar o asfixiar a los habitantes del mar.

Aún hay gran dificultad para comprender la interacción entre el plástico marino y los microorganismos en situación de campo, debido al desafío tecnológico que ello conlleva, ya que se requiere conocimiento de la composición filogenética de la comunidad de la biopelícula, como también visualización de la distribución espacial de la biopelícula intacta. Recientemente se desarrolló un método CLASI-FISH (*Combinatorial Labelling And Spectral Imaging – Fluorescence In Situ Hybridization*) para estudiar las comunidades de la plastísfera, técnica que permite expandir el número de taxones distinguibles en un solo experimento, la cual implica marcar microorganismos de interés con combinaciones de sondas anidadas junto con imágenes espectrales para permitir el uso de fluoróforos. La técnica creada para el estudio de la plastísfera utiliza tres sondas filogenéticas existentes orientadas a las bacterias alfa y gammaproteobacterias, y cuatro sondas nuevas dirigidas a *Bacteroidetes*, *Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Alteromonadaceae*, marcadas con un total de siete fluoróforos (Schlundt *et al.*, 2020).

7. CONCLUSIONES

Si bien, no está totalmente claro el mecanismo de transmisión que utiliza *Piscirickettsia salmonis*; según varios estudios, la bacteria es capaz de adherirse y formar biopelículas sobre diversas superficies, tanto bióticas como abióticas (plástico, vidrio y teflón), y a su vez mantener la capacidad infectante al momento de liberación. Dicho comportamiento probablemente corresponde a un factor de virulencia que favorecería la permanencia y diseminación del agente en alguna determinada zona. La mayoría de los estudios utilizan la cepa LF-89, por lo realizar la investigación con EM-90, cepa más prevalente y patogénica en Chile, nos permitiría tener información más precisa para tomar mejores decisiones.

Por otra parte, el polietileno, entre otros plásticos, es el principal material utilizado para la fabricación de balsas jaulas para la salmonicultura y, a su vez, es el principal componente de la basura marina; se considera una superficie oportuna para albergar diversos micro y macroorganismo, formando verdaderas colonias adheridas a estos, dando origen a lo que se conoce como *fouling*, en las estructuras para la acuicultura y embarcaciones, y a la plástisfera respecto a la basura marina, formando ecosistemas artificiales que pueden favorecer la permanencia, multiplicación y diseminación de agentes patógenos.

La investigación propuesta en este estudio permitiría conocer si existen diferencias en el comportamiento de adhesión de *P. salmonis*, según la variable tipo de material (HDPE, PVC, PTFE, NYLON), utilizando tiempos considerablemente mayores a los descritos en el estudio de Steven *et al.* (2018), con lo cual se podrían concluir la importancia biológica de los materiales inertes como reservorio de *P. salmonis* en el medio acuático del hospedero; de este modo, por ejemplo, promover el uso de los plásticos que muestren menor adhesión bacteriana. Además, dichos datos servirán para abrir nuevas investigaciones que profundicen más aún en la investigación de vectores y reservorios de piscirickettsiosis.

Por otra parte, se han desarrollado nuevos sistemas semicerrados para la acuicultura, lo cual permite tener un manejo productivo mucho más controlado que la acuicultura tradicional, inclusive, permite la desinfección del agua salada que se utiliza en las jaulas, lo cual disminuye la probabilidad de presencia de agentes patógenos. Los sistemas de acuicultura de recirculación son una inversión para la sustentabilidad en la salmonicultura,

considerando que se disminuye el impacto sobre un ecosistema marino o lacustre, se permite la reutilización de lodos y de este modo agregar valor a los subproductos de la industria, sin embargo, presentan un gran desafío, ya que se producen más gases de efecto invernadero, y considera una inversión económica mayor.

BIBLIOGRAFÍA

- **AHMED, N.; TURCHINI, G. M.** 2021. Recirculating aquaculture systems (RAS): Environmental solution and climate change adaptation. *J Cleaner Prod.* 297: 126604.
- **ALBORNOZ, R.; VALENZUELA, K.; PONTIGO, J.; SÁNCHEZ, P.; RUIZ, P.; AVENDAÑO-HERRERA, R.; YÁÑEZ, A.** 2017. Identification of chemotaxis operon cheYZA and cheA gene expression under stressful conditions in *Piscirickettsia salmonis*. *Microb Pathog.* 107: 436-441.
- **BRAVO, C.** 2007. Comparación de la cinética de presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis* en piel y branquias de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 34 p.
- **BENDINGER, B.; RIJNAARTS, H.; ALTENDORF, K.; ZEHNDER A.** 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol.* 59: 3973 - 3977.
- **CABELLO, P.** 2018. Declaración de Impacto Ambiental: Crianza y engorda de salmónidos en estanques de tierra. Bordemar-Tumbes SPA y Ambygest Consultorías SpA. <https://normas-apa.org/referencias/citar-informes-reportes/comment-page-1/>
- **CAI, W.; DE LA FUENTE, L.; ARIAS, C.** 2013. Biofilm formation by the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: development and parameters affecting surface attachment. *Appl. Environ Microbiol.* 79: 5633-5642.
- **CAMPALANS, M.** 2011. Determinación de patógenos de importancia en la salmonicultura, en *Caligus* y moluscos bivalvos. P. U. Católica de Valparaíso, Fac. de Recursos Naturales. 238 p. Informe final Proyecto FIP 2008-66.
- **CHILE. MINISTERIO DE ECONOMÍA, FOMENTO Y TURISMO.** 2012. Resolución exenta N°3174, establece Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis (PSEVC-Piscirickettsiosis). Subsecretaría de Pesca y Acuicultura; Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura; Dirección Nacional. 28 diciembre 2012.
- **COQUET, L.; COSETTE, P.; JUNTER, G.; BEUCHER, E.; SAITER, J.; JOUENNE. T.** 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids Surf. B.* 26: 373–378
- **CORREAL, P.** 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Memoria título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 62p.

- **DE TENDER, C.; DEVRIESE, L.; HAEGEMAN, A.; MAES, S.; RUTTINK, T.; DAWYNDT, P.** 2015. Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 49: 9629 - 9638.
- **DHANUMALAYAN, E.; GIRISH, M.** 2018. Performance properties and applications of polytetrafluoroethylene (PTFE)—a review. *Adv. Compos. Hybrid. Mater.* 1:247-268.
- **DONLAN, R.** 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890.
- **ERNI-CASSOLA, G.; ZADJELOVIC, V.; GIBSON, M.; CHRISTIE-OLEZ, J.** 2019. Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A metaanalysis. *J. Hazard Mater.* 369: 691–698
- **FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GARCÉS, H.L.; LARENAS, J.J.; SMITH, P.A.** 1990. Isolation of a rickettsial-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25: 107-114.
- **FRYER, J.L.; LANNAN, C.N.; GIOVANNONI, S.J.; WOOD, N.D.** 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonis fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 120-126
- **GOBIERNO DE ESPAÑA; MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN.** 2020. Real academia de la lengua española. Obtenido de Real Academia de la lengua española. <http://dle.rae.es>
- **GÓMEZ, F.; HENRÍQUEZ, V.; MARSHALL, SH.** 2009. Additional evidence of the facultative intracellular nature of fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. Med. Vet.* 41: 261- 267.
- **GONZÁLEZ, C. A.; MAGARIÑOS B.; GODOY, M.; IRGANG, R.; TORANZO, A.; AVENDAÑO, H. R.** 2011. Surface properties of *Streptococcus phocae* strains isolated from diseased Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Dis.* 34: 203- 215.
- **ISLA, A.; MARTINEZ-HERNANDEZ, E.; LEVIPAN, H.; HAUSSMANN, D.; FIGUEROA, J.; RAUCH, C.; MARACAJA-COUTINHO, V.; YAÑEZ, A.** 2021. Development of multiplex PCR assay of genotyping the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* through comparative genomics. *Front. Microbiol.* 12: 673216.
- **ISLA, A.; SILDARRIAGA-CÓRDOBA, M.; FUENTES, D. E.; ALBORNOZ, R.; HAUSSMANN, D.; MANCILLA-SCHULZ, J.; YAÑEZ, A.** 2019. Multilocus sequence typing detects new *Piscirickettsia salmonis* hybrid genogroup in Chilean fish farms: Evidence for genetic diversity and population structure. *J. Fish Dis.* 42: 721-737.
- **KERSHAW, P. J.** 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Joint group of experts on the scientific aspects of marine environmental protection. *Rep. Stud. GESAMP No. 90*, 96 p.
- **KING, R. K.** 2001. The presence of bacterial pathogens in recirculating aquaculture system biofilms and their response to various sanitizers. Dissertation submitted to

the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in food science and technology. 123 p.

- **LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J.G.; NIJLAND, R.** 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 813–823.
- **LANNAN, C.N.; EWING S, A.; FRYER, J.L.** 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *J. Aquat. Anim. Health.* 3: 229-234.
- **LANNAN, C.N.; FRYER, J.L.** 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 17: 545-548.
- **LARENAS, J.J.; BARTHOLOMEW, J.; TRONCOSO, O.; FERNÁNDEZ, S.; LEDEZMA, H.; SANDOVAL, N.; VERA, P.; CONTRERAS, J.; SMITH, P.** 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and *in vitro* study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56: 25-30.
- **LARENAS, J.; ZAMORANO, E.; SMITH, P.** 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 2: 59-67.
- **LARENAS, J.; PÉREZ, M.; MORALEDA, C.; GODOY, M.; LARENAS, C.; ACUÑA-RETAMAR, M.** 2019. *In vitro* adhesion and infectiveness of *Piscirickettsia salmonis* on mussel shells *Mytilus chilensis*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 39: 114-121.
- **LARENAS, J.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; MORALES, M.; SMITH, P.** 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. Med. Vet.* 29:1
- **LAUFFENBURGER, D.A.** 1991. Quantitative studies of bacterial chemotaxis and microbial population dynamics. *Microb. Ecol.* 22: 175-185.
- **LEVIPAN, H.A.; IRGANG, R.; YÁÑEZ, A.; AVENDAÑO-HERRERA, R.** 2020. Improved understanding of biofilm development by *Piscirickettsia salmonis* reveals potential risks for the persistence and dissemination of piscirickettsiosis. *Sci. Rep.* 10: 1-16.
- **LEVIPAN, H, A.; REYES-GARCIA, L.; AVENDAÑO-HERRERA, R.** 2021. Short communication: *Piscirickettsia salmonis* does not evidence quorum sensing based on acylhomoserine lactones. *J. Fish Dis.* 44: 1047-1051.
- **LOEB, G.I.; NEIHOF, R.A.** 1975. Marine conditioning films. *Advances in Chemistry* 145: 319–335.
- **LÓPEZ, C.F.** 2005. Fundamentos de polímeros. Material de apoyo para la VII Escuela Venezolana para la enseñanza de la química. U. de los Andes, Fac. de Cs. Dpto. de Química. 59 p. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/16700>

- **MAQUERA, O.Y.** 2017. Detección mediante inmunohistoquímica de *Piscirickettsia salmonis* en cortes de tejido de *Caligus rogercresseyi*. Memoria título profesional Médico Veterinario. U. de Chile. Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias.
- **MARSHALL, S.H.; GÓMEZ, F.A.; RAMÍREZ, R.; NILO, L.; HENRÍQUEZ, V.** 2012. Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative in vivo survival/persistence strategy in marine environments. Res. Microbiol. 163: 557-566.
- **MAUEL, M.J. ; GIOVANNONI, S.J.; FRYER, J.L.** 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Org. 26: 189-195.
- **MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.** 2002. Piscirickettsiosis and Piscirickettsia-like infections in fish: a review. Vet. Mic. 87: 279-289.
- **MAUEL, M.J.; WARE, C.; SMITH, P.A.** 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. J. Vet. Diagn. Invest. 20: 213–214
- **NERI-DEL CASTILLO, L.** 2013. Estudio del efecto de fibras de politereftalato de etileno (PET) reciclado como agentes de refuerzo en una matriz de polietileno de alta densidad (HDPE). Memoria de título de Ingeniería Química. Fac. Estudios Superiores. Zaragoza. U. Nac. Autónoma de México.
- **OLIVARES, E.A.** 2009. Reconocimiento e inspección de centros de cultivo. Memoria Título Ingeniero Naval. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Fac. Cs, de la Ingeniería. 54 p.
- **OLIVARES, E.A.; MARSHALL, S.H.** 2010. Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a following period in salmon farms. J. Fish Dis. 33, 261-266.
- **PÉREZ S.D.; MORALES R.J.; TAPIA S.; AHUMADA D.; ESPINOZA A.; SOTO H.V.; BRIANSON B.; IBACETA V.; SANDINO A.; SPENCER E.; VALLEJOS V.E.; REYES L.F.; VALDÉS J.; REYES C.S.** 2019. Non-lysosomal activation in macrophages of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) after infection with *Piscirickettsia salmonis*. Front. Immunol. 10: 434.
- **PLASTIGEN.** 2020. Fichas Técnicas. <http://plastigen.cl>
- **QUINTEROS, J.** 2007. Comparación en la presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria para optar al título de Médico veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 54 p.
- **REED, L. J. & MUENCH, H.** 1938. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-497.
- **RENAU-PIQUERAS, J.; FAURA, M.** 1994. Principios básicos del microscopio electrónico de barrido en Josefina Méndez Felpeto, Esperanza Cerdán Villanueva, Ana María Rodríguez Torres (eds.), Técnicas de microscopía, micromanipulación y análisis de imagen. II Reunión científica en biología celular y molecular. p. 73-92. U. da Coruña, Servicio de Publicación. <http://hdl.handle.net/2183/9313>

- **ROVIRA, J.** 2006. Informe y diagnóstico de la basura marina en Chile. Plan de acción para la protección del medio marino y áreas costeras del Pacífico Sudeste. Comisión Permanente del Pacífico Sur (CPPS). Guayaquil Ecuador. 56p. <http://cpps.dyndns.info/cpps-docs-web/planaccion/biblioteca/pordinario/001.Basura%20Marina%20en%20Chile.pdf>
- **ROZAS-SERRI, M.; ENRÍQUEZ, R.** 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. J. Dis. Fish. 37:163-188.**ROZAS-SERRI, M.; ILDEFONSO, R.; PEÑA, A.; ENRIQUEZ, R.; BARRIENTOS, S.; MALDONADO, L.** 2017. Comparative pathogenesis of piscirickettsiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolt experimentally challenged with LF-89-like and EM-90-like *Piscirickettsia salmonis* isolates. J. Fish. Dis. 40: 1451-1472.
- **RUMMEL, C.D.; JAHNKE, A.; GOROKHOVA, E.; KÜHNEL, D.; SCHMITT-JANSEN, M.** 2017. Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. Environ. Sci. Technol. Lett. 4: 258-267.
- **RUIZ, P.; POBLETE, M.; YÁÑEZ, A.J.; IRGANG, R.; TORANZO, A.E.; AVENDAÑO, R.** 2015. Cell-surface properties of *Vibrio ordalii* strains isolated from Atlantic salmon *Salmo salar* in Chilean farms. Dis. Aquat. Org. 113: 9–23
- **SAAVEDRA, J.; HERNÁNDEZ, N.; OSSES, A.; CASTILLO, A.; CANCINO, A.; GROTHUSEN, H.; NAVAS, E.; HENRIQUEZ, P.; BOHLE, H.; BUSTAMANTE, F.; BUSTOS, P.; MANCILLA, M.** 2017. Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *P. salmonis* EM-90-like isolates. J. Fish Dis. 40: 1055-1063.
- **SALINAS.** 1998. Efecto de la densidad poblacional sobre la presentación y transmisión horizontal de piscirickettsiosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas experimentalmente. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile. Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 65p.
- **SANTIBÁÑEZ, N.; VEJA, M.; PÉREZ, T.; YÁÑEZ, A.; GONZÁLEZ-STEGMAIER, R.; FIGUEROA, J.; ENRÍQUEZ, R.; OLIVER, C.; ROMERO, A.** 2020. Biofilm Produced In vitro by *Piscirickettsia salmonis* generates differential cytotoxicity levels and expression patterns of immune genes in the Atlantic Salmon Cell Line SHK-1. Microorganisms. 8:1609.
- **SCHLUNDT, C.; MARK-WELCH, J.L.; KNOCHER, A.M.; ZETTLER, E.R.; AMARAL-ZETTLER, L.A.** 2019. Spatial structure in the “Plastisphere”: Molecular resources for imaging microscopic communities on plastic marine debris. Mol. Ecol. Resour. 20: 620–634.
- **SERNAPESCA.** 2021. Informe sanitario con información sanitaria de agua dulce y mar año 2021 (enero – noviembre), Departamento de Salud Animal, Subdirección de Acuicultura, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Chile. http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_con_informacion_sanitaria_de_agua_dulce_y_mar_ano_2021_20220425.pdf

- **SMITH, P.A.; PIZARRO, P.; OJEDA, P.; CONTRERAS, J.; OYANEDEL, S.; LARENAS, J.J.** 1999. Routes of entry of *P. salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 37:165-172.
- **SONG, X.; LIU, Y.; PETTERSEN, J. B.; BRANDÃO, M.; MA, X.; ROBERG, S.; FROSTELL, B.** 2019. Life cycle assessment of recirculating aquaculture systems: A case of Atlantic salmon farming in China. *J. Ind. Ecol.* 23: 1088-1980
- **STEVEN, A.; SIDHU, J.; CONTRERAS, S.; LARENAS, J.; BERNAL, P.; VAQUERO, P.; OCAMPO, D.; ACUÑA, M.; ARAYA, C.; GODOY, M.; MORALEDA, C.; NEIRA, A.; NÚÑEZ, E.** 2018. Informe final: Vectores y reservorios de *P. salmonis* FIE V014 – Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura. Reporte para SERNAPESCA. CSIRO Chile.
- **SUNDELL, K.; WIKLUND, T.** 2011. Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 34: 373-383.
- **TREUNER-LANGE, A.; SOGAARD-ANDERSEN, L.** 2014. Regulation of cell polarity in bacteria. *J. Cell Biol.* 206: 7-17.
- **UPHOFF, C.C.; DREXLER, H.G.** 2012. Detection of *Mycoplasma* Contaminations. *Methods Mol. Biol.* 1–13.
- **VARGAS, N.A.** 2014. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en peces silvestres del sur de Chile y en *Caligus rogercresseyi*. Memoria Título Bioquímico. Valdivia, Chile. U. Austral de Chile. Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 158 p.
- **VENEGAS, C.** 1996. *Piscirickettsia salmonis*. Prospección en faunas marina asociada a cultivos de salmónidos infectadas. Periodo invierno-primavera. Memoria para optar título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 27 p.
- **VOJDANI, M.; GITTI, R.** 2015. Polyamide as a denture base material: a literature review. *J. Dent. Shiraz. Univ. Med. Sci.* 16: 1-9.
- **YÁÑEZ, A.; VALENZUELA, K.; SILVA, H.; RETAMALES, J.; ROMERO, A.; ENRIQUEZ, R., FIGUEROA, J.; CLAUDE, A.; GONZÁLEZ, J.; AVEDAÑO-HERRERA, R.; CARCAMO, J.** 2012. Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* 97: 197-205.
- **ZHAO, S.; ZETTLER, E. R.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; MINCER, T. J.** 2020. Microbial carrying capacity and carbon biomass of plastic marine debris. *ISME J.*
- **ZETTLER, E.R.; MINCER, T.J.; AMARAL-ZETTLER, L.A.** 2013. Life in the "plastisphere": Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47: 7137-7146.
- **ZÚÑIGA, A.; SOLIS, C.; CARTES, C.; NOURDIN, G.; YAÑEZ, A.; ROMERO, A.; HAUSSMANN, D.; FIGUEROA, J.** 2020. Transcriptional analysis of metabolic and virulence genes associated with biofilm formation in *Piscirickettsia salmonis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 367:180.