



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGIA

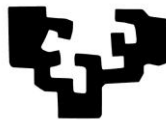
TRABAJO DE FIN DE GRADO

Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*)

Mirella Moreno Fernández

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE

1. Resumen-Abstract.....	4
2. Introducción.....	5
3. Objetivo.....	7
4. Desarrollo.....	7
- Descripción de las instalaciones.....	8
- Calidad del agua.....	10
- Limpieza de las peceras.....	13
- Alimentación.....	14
- Reproducción.....	16
- Principales dificultades.....	19
5. Conclusiones.....	20
6. Bibliografía.....	21
7. Anexo I.....	22
- Protocolo de calidad del agua y limpieza.....	22
8. Anexo II.....	24
- Protocolo de alimentación.....	24
9. Anexo III.....	25
- Protocolo de reproducción.....	25

RESUMEN

El pez cebra (*Danio rerio*) se utiliza como organismo modelo en distintos campos como la biomedicina o la toxicogenómica. Las ventajas que ofrece frente a otros modelos animales, hace que se haya convertido en los últimos años en uno de los organismos modelo más utilizado en experimentación. La similitud de su desarrollo embrionario con el de otros vertebrados superiores o la semejanza de su genoma con la del ser humano lo han colocado en el punto de mira de las principales investigaciones. Pero disponer de ejemplares óptimos tanto de embriones como de adultos para su utilización en investigación, requiere de unos cuidados y de una atención adecuada. Para su mantenimiento se deberán tener en cuenta el tipo de instalaciones para su cría, la calidad del agua donde se encuentran, la alimentación que reciben o los procesos de reproducción utilizados. El objetivo de este estudio ha sido elaborar un protocolo de mantenimiento del pez cebra, que optimice los cuidados necesarios para que el número de embriones viables sea máximo y también poder mantener un número de ejemplares adultos en buenas condiciones.

ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) is used as a model organism in different fields such as biomedicine and toxicogenomics. The advantages that this model offers compared to other animal models, makes it one of the most commonly used in experimental model organisms in recent years. The similarity of its embryonic development with the development of other higher vertebrates or the likeness of its genome with the human genome have placed it in the crosshairs of most outstanding research. But having individuals, both embryos and adults, in optimal conditions to be used in research requires adequate attention and care. For their maintenance and reproduction, the type of facility, the quality of the water, the diet they receive or the reproduction processes used must be taken in to account. The objective of this study was to develop a protocol for maintenance of the Zebrafish, which optimizes the necessary care so that the maximum number of viable embryos is obtained and also to maintain a number of adult specimens in good condition.

INTRODUCCIÓN

El pez cebrá *Danio rerio* se ha convertido en los últimos 30 años en uno de los modelos biológicos más importantes dedicado a la experimentación junto con otros modelos animales como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* o el ratón de laboratorio.

D. rerio es un ciprínido de unos 5-6 cm, dulceacuícola y de aguas tropicales (Figura 1). Es nativo del sur de Asia, se distribuye sobre todo por el norte y este de India, aunque también lo podemos encontrar en lugares como Bangladesh y Nepal. Habita en lagos, lagunas y charcas con abundantes plantas acuáticas, creciendo en la orilla más que en los ríos y arroyos ya que prefiere los cursos de agua remansada antes que las corrientes (Díaz, 2006).

La geografía de estas regiones está caracterizada por poseer climas monzónicos con lluvias abundantes y estaciones más secas. Estas condiciones ejercen unos cambios drásticos en el medio ambiente del pez cebrá, llegando incluso a cambiar tanto las condiciones físico-químicas como la disponibilidad de recursos en el agua, por lo que está adaptado a sobrevivir en ambientes variables en los cuales los factores de salinidad, pH o temperatura no son estables.

Probablemente eso explica su amplio rango de tolerancia ante distintos factores y la importancia que ello conlleva para facilitar su mantenimiento en cautividad (Harper & Lawrence, 2011).

A finales de los años setenta en la universidad de Oregon, el equipo del doctor George Streisinger realizó un estudio detallado sobre las características del pez cebrá y propuso nuevas técnicas de cuidado que poco después fueron utilizadas por el resto de la comunidad científica. De esta manera se crearon las bases necesarias para su posterior uso como organismo modelo (Rojas-Muñoz et al., 2007).



Figura 1. Un individuo de la especie *D. rerio*, en la que se observa su pigmentación característica por la cual recibe su nombre (Imagen tomada de Rojas-Muñoz et al., 2007).

La importancia de estudiar este organismo como modelo experimental en comparación con otros modelos, radica en que su patrón de desarrollo es similar al de los vertebrados superiores, incluidos los mamíferos y por lo tanto el hombre (Rocha et al., 2001). También se ha demostrado la similitud entre el genoma humano y el del pez cebrá, por eso muchas de las mutaciones que se producen en el pez cebrá puede dar lugar a fenotipos similares a los que presentan muchas enfermedades humanas. Hay que destacar que este organismo es ideal para mantener acumuladas mutaciones seleccionadas sin que se produzca la muerte del embrión a diferencia de lo que ocurre con otros mamíferos (Bopp et al., 2006). Por ello, gracias a los estudios sobre cribados mutacionales, que consisten en alterar las secuencias de ciertos

genes para generar cambios, se puede obtener la función del gen alterado y de este modo observar que órgano se ve afectado por la mutación.

Las características que han hecho del pez cebra una herramienta de gran valor para estudiar la biología del desarrollo, se utilizan ahora para el descubrimiento de nuevos medicamentos gracias a la posibilidad de realizar experimentos a gran escala (Rojas-Muñoz et al., 2007). No solo tiene importancia en el campo de la biomedicina, también es utilizado en toxicogenómica para analizar los efectos de la contaminación en el medio ambiente, y para crear bioindicadores que emitan señales de alarma cuando hay un compuesto tóxico en el medio (Aleström et al., 2006). La versatilidad de las características de este organismo modelo hace que pueda ser aplicado en diversos campos de estudio.

La utilización del pez cebra como modelo experimental tiene ciertas ventajas sobre otros modelos:

- El desarrollo embrionario es externo y los embriones son transparentes durante su crecimiento, lo cual permite al investigador poder observar fácilmente con una lupa el desarrollo de sus órganos internos.

- Tiene fecundación externa, por lo que si se quieren hacer modificaciones genéticas en el embrión, no es necesario manipular a la hembra reproductora.

- Su pequeño tamaño permite mantener un número elevado de ejemplares en un espacio relativamente pequeño.

- El tiempo de desarrollo del embrión es corto (72 h), al igual que el tiempo en el que alcanzan la maduración sexual (3-4 meses).

- Son fértiles todo el año, es decir no tienen una estacionalidad en su reproducción, lo cual les proporciona una gran capacidad reproductora.

- Una única hembra es capaz de poner cientos de huevos por semana, lo cual permite disponer de un gran número de individuos.

- Existe un amplio conocimiento de su biología básica y su genoma está totalmente secuenciado lo que posibilita la disponibilidad de microarrays comerciales de su genoma completo.

- Su obtención y mantenimiento es más económico que el de otros organismos modelo como pueden ser los mamíferos, ya que es capaz de aguantar variaciones producidas en el ambiente, debido a su lugar de procedencia.

El pez cebra puede ser mantenido con variaciones en los parámetros del agua y sobrevivir, pero eso no nos asegura que a la hora de reproducirlos la cantidad de huevos viables sea máxima. Es importante destacar esto puesto que la mayoría de los experimentos que se realizan con pez cebra, requieren más de embriones y no tanto de adultos (Rocha et al., 2002), por lo que necesitaremos unos cuidados óptimos que nos permitan mantener el máximo número de embriones.

OBJETIVO

El grupo de investigación “Biología Celular en Toxicología Ambiental” de la UPV/EHU gestiona, bajo la supervisión general del Animalario de Bizkaia (SGiker), una instalación para el mantenimiento y cría de peces cebra en la FCT-ZTF. Estos peces son utilizados en diferentes proyectos de investigación relacionados con la Toxicología Ambiental.

La disponibilidad de ejemplares óptimos de pez cebra, tanto embriones como adultos, para su utilización en experimentación requiere de un cuidadoso mantenimiento de los peces adultos, así como los procedimientos utilizados en la reproducción y la cría de los descendientes.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo que especificara el mantenimiento adecuado del pez cebra, para poder conseguir una estabilidad fisiológica y como consecuencia una reproducción óptima en cuanto a número y viabilidad de los embriones obtenidos.

DESARROLLO

Durante cuatro meses se trabaja en el acuario de la FCT-ZTF de Bizkaia tratando de mantener constantes los parámetros que afectan de forma directa al mantenimiento del pez cebra. También se aprenden las técnicas de cuidado necesarias para optimizar las necesidades de los peces. El procedimiento utilizado para el mantenimiento, se toma de la rutina que llevan a cabo habitualmente los investigadores del centro.

Del mismo modo se resuelven los distintos problemas que surgen durante su mantenimiento y así poder aprender más sobre las técnicas de cuidado.

El acuario que es objeto de estudio tiene instaladas nueve peceras de las cuales solo una está dedicada exclusivamente a la reproducción. Las puestas que darán lugar a los embriones, se realizan una vez por semana.

Se busca información adicional sobre el mantenimiento del pez cebra para contrastarla con las técnicas ya utilizadas. De este modo se mejoran los cuidados utilizados hasta entonces y se desarrolla un protocolo acorde con las necesidades adecuadas para optimizar su mantenimiento y reproducción.

A continuación se describen las características de las instalaciones empleadas en el mantenimiento y reproducción del pez cebra.

Descripción de las instalaciones

Para el cuidado de los peces cebra se trabajará en un acuario típico para su cría, el cual consistirá en una cámara donde se instalarán unas estanterías que contienen las peceras que albergan a los peces.

En una sala contigua se harán los experimentos y se encontrará el material necesario para el cuidado del pez cebra.

La cámara donde se encuentran los peces será un lugar cerrado sin ventanas, para evitar que entre la luz solar ya que dispondrá de un fotoperiodo que simula su ambiente natural – 12 h de luz y 12 h de oscuridad – el cual estará determinado por un mecanismo regulador de iluminación artificial. Será importante mantener este fotoperiodo para poder controlar la reproducción, puesto que es un factor que está implicado de forma directa en los procesos fisiológicos, bioquímicos, y en el propio comportamiento del animal.

Los materiales en el interior de la cámara serán impermeables y el suelo estará ligeramente inclinado hacia una zona de desagüe.

Como estamos trabajando con organismos que en condiciones naturales se encuentran en aguas tropicales, la temperatura de la cámara tendrá que estar permanentemente a 28 °C. Esto se consigue calentando el aire de la cámara con un calentador, y regulando su temperatura con un termostato. La sala se encontrará aislada térmicamente del exterior para que no haya variaciones en la temperatura interior.

En cuanto a las peceras, estarán distribuidas dependiendo de la edad de los peces. Los alevines y juveniles se encontrarán situados en peceras con un volumen máximo de 11 L y los adultos en peceras con un volumen que rondará los 100 L (Figura 2). Ambos tipos de peceras serán transparentes para poder observar de forma directa la actividad de los peces. Además las peceras donde encontraremos a los adultos estarán tapadas para evitar que salgan de ellas ya que existe la posibilidad de que salten hacia afuera.

El número de peces que colocamos en cada pecera estará claramente relacionado con el volumen de la pecera y la edad de los individuos. En el caso de los peces adultos se podrá colocar un máximo de 100 ejemplares por cada 100 L de agua, pero para evitarles un estrés excesivo lo ideal será colocar 50 peces cada 100 L. Los alevines al tener un tamaño muy inferior que los adultos, se colocarán una media de 50 ejemplares cada 11 L.



Figura 2. A la izquierda se pueden ver las peceras que contienen a los adultos y la imagen de la derecha corresponde a la zona donde se encuentran las peceras de los alevines y juveniles.

La limpieza del agua se hará mediante dos sistemas. Cuando se trate de peceras con alevines y juveniles se utilizará un sistema continuo de salida y entrada del agua. Para las peceras que contienen los adultos, el sistema utilizado estará basado en la recirculación del agua. Este último sistema realizará la limpieza gracias a un proceso mecánico y biológico.

Cada una de las peceras será un sistema independiente y contará con su propio mecanismo de filtración, así se evitará que la posible contaminación de una de ellas perjudique al resto. El sistema de filtrado basado en la recirculación estará compuesto por un par de esponjas entre las que se coloca una capa de perlón y bajo este conjunto, una red que alberga las biobolas (Figura 3).

La filtración mecánica se realizará cuando el agua pase a través de las esponjas y la filtración biológica a partir de las biobolas, las cuales contienen bacterias que ayudarán a oxidar los compuestos nitrogenados producidos por los organismos.

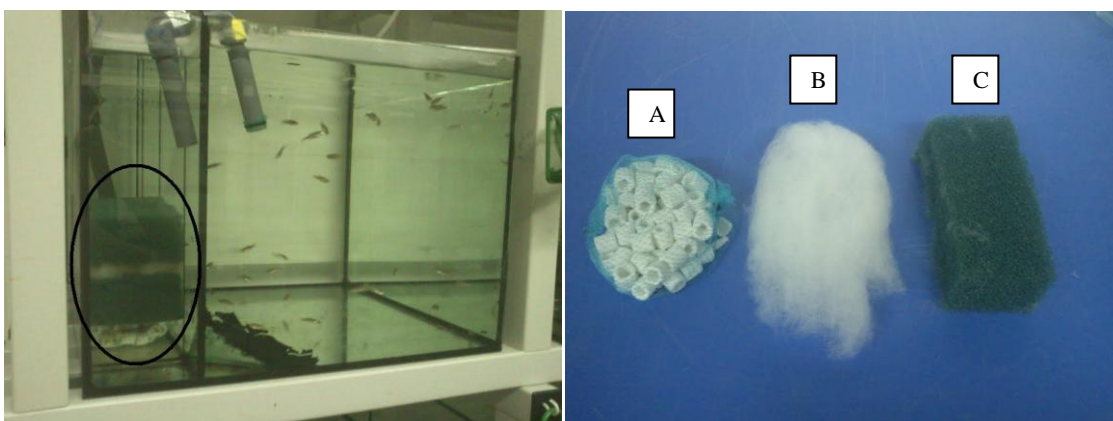


Figura 3. En la imagen de la izquierda se puede ver una pecera de adultos en la que se destaca mediante un círculo el complejo usado para la filtración. La imagen de la derecha muestra los elementos usados para la filtración del agua a) Biobolas b) Perlón c) Esponja.

El sistema consistirá en hacer pasar el agua a través de un rebosadero provisto de una rejilla para que los peces no se cuelen. El agua sucia irá pasando a través de las esponjas y del perlón para quitar las partículas del medio, de forma paralela se producirá la oxidación de los residuos nitrogenados gracias a las bacterias que se encuentran en las biobolas. Una vez concluido el proceso, el agua tratada pasará a través de un tubo para ser distribuida por toda la pecera. Este proceso es constante y se realiza de forma permanente.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el pez cebra se encuentra en aguas dulces, por lo que se utilizará para su mantenimiento agua que tenga una conductividad entorno a $600 \mu\text{S}$. Debido al gran volumen que se necesita, será imprescindible hacer agua acondicionada. Para ello tendremos instalados en la cámara dos tanques de 300 L, uno de ellos corresponderá al agua de $600 \mu\text{S}$ y el otro al agua osmótica. En el exterior de cada tanque habrá un indicador del volumen de agua presente, por lo que será necesario revisar periódicamente el nivel de agua y proceder a llenarlo en el caso de que estén con poco volumen.

Para conseguir agua osmótica se empleará un sistema de osmosis inversa. Para ello será necesario hacer pasar el agua de grifo a través de un equipo que contiene una membrana semipermeable, la cual solo dejará transferir moléculas de agua. El agua desionizada pasará al tanque que le corresponde hasta su posterior utilización.

Cuando se deba preparar agua con la concentración de sales deseada, será necesario pasar el agua osmótica mediante una bomba, al tanque de agua dulce hasta conseguir el máximo volumen. En un recipiente a parte se añadirá 63 g de sal marina SERA y se disolverá en agua osmótica. Una vez disuelto se añadirá la mezcla al tanque de agua dulce y se esperará a que homogenice. Para comprobar que la concentración de sales es la deseada será necesario medir la conductividad. Hay que tener en cuenta que los alevines y juveniles reciben un aporte de agua continuo por lo tanto habrá un gasto progresivo de agua dulce.

Para el cuidado del pez cebra se plantearán cuatro aspectos de trabajo: calidad del agua, limpieza de las peceras, alimentación y reproducción.

Calidad del agua

Será importante llevar un seguimiento de los diferentes parámetros del agua como pueden ser pH, conductividad, y compuestos nitrogenados. Es muy importante mantener estables estos parámetros para evitar que se produzcan daños internos en el pez cebra. Por lo tanto se medirá una vez al día el pH y la conductividad gracias a un medidor como el que se muestra en la Figura 4.

El pH es una función que permite calcular de forma sencilla la concentración de H^+ que hay en el agua. Para los peces, el pH del agua está relacionado con la necesidad de mantener un equilibrio ácido-base en su sangre. En este caso se mantendrá un pH de 7,2 para que el NH_3 que se encuentre disuelto en el agua y el cual es tóxico, reaccione con los H^+ para dar NH_4^+ que es inofensivo para los peces.



Figura 4. Material utilizado para la medida del pH y la conductividad.

En la Figura 5 se ven reflejados los cambios de pH que se han producido a lo largo de un mes en algunas de las peceras consideradas representativas del resto de resultados obtenidos. Se puede ver como hay pequeñas variaciones de los valores de pH ya que el agua no es estática y tiende a variar debido a los procesos biológicos llevados a cabo por los propios organismos, aunque se aprecia como hay una tendencia a descender. El descenso se hace más acusado a los 10-12 días por lo que se añadirá al medio pH + de la marca comercial SERA que lo alcaliniza y genera un aumento del pH. Se añadirá un tapón de este compuesto para aumentar 0,5 el valor de pH. Las flechas muestran los momentos en los que fue añadido este producto.

Hay que destacar que al finalizar el mes los valores son mucho más estables, esto puede ser gracias al exhaustivo control que se ha ejercido durante todo el mes sobre los diferentes parámetros y cuidados del agua.

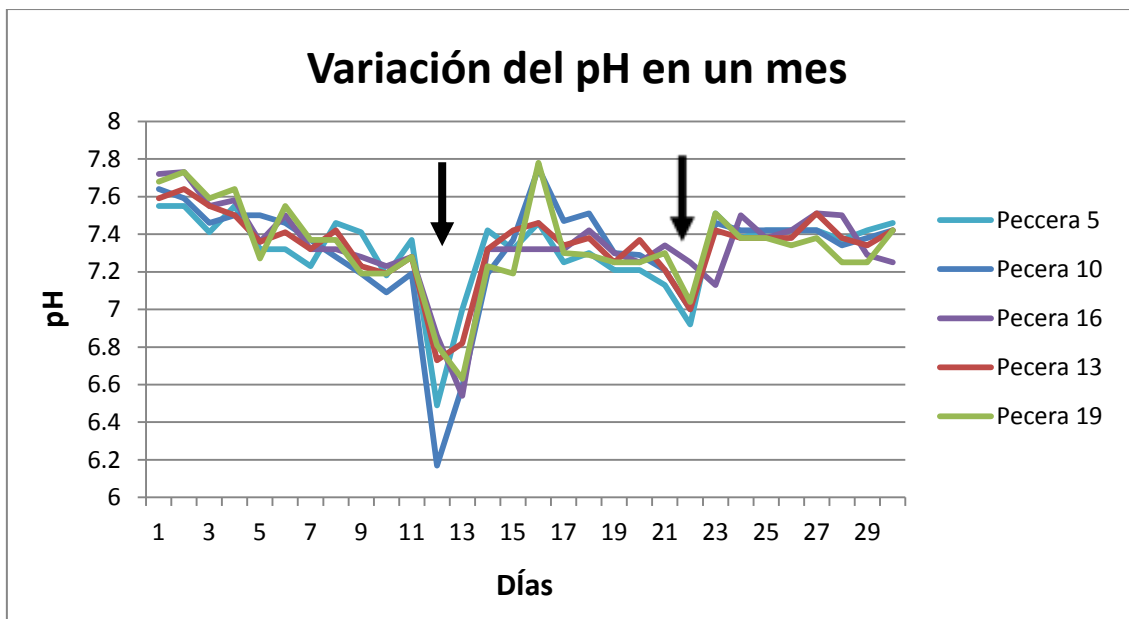


Figura 5. Representación grafica de la variación del pH en cinco de las 9 peceras instaladas en la cámara.

La conductividad es una medida que indica la cantidad de sales disueltas en el medio. Los peces que viven en agua dulce tendrán una concentración de sales mayor en el interior celular que en el exterior por lo que entrará agua al interior. Para eliminar este agua poseerá mecanismos osmorreguladores. Si la concentración de sales en el exterior no se controla llegarán a aumentar provocando de esta manera una salida de agua de las células. Si esto sucede el pez se deshidratará ya que los mecanismos osmorreguladores no podrán adaptarse a esta nueva situación.

Como ya sabemos el aire de la sala estará permanentemente a 28 °C, lo que supone una evaporación del agua de las peceras; como consecuencia la concentración de sales aumentará. Esta variación de la salinidad podemos verla en la Figura 6. Han sido representadas solo aquellas peceras que son representativas de los cambios producidos en la conductividad durante un mes. Como se puede ver en el gráfico, la concentración de sales tiende a ir aumentando a medida que pasan los días, cuando la conductividad sobrepase los 700 μS , se procederá a realizar una dilución del agua vaciando la pecera a la mitad y añadiendo agua osmótica para rebajar de esta manera la concentración de sales presentes. Las flechas nos muestran los momentos en los que se han producido estas diluciones.

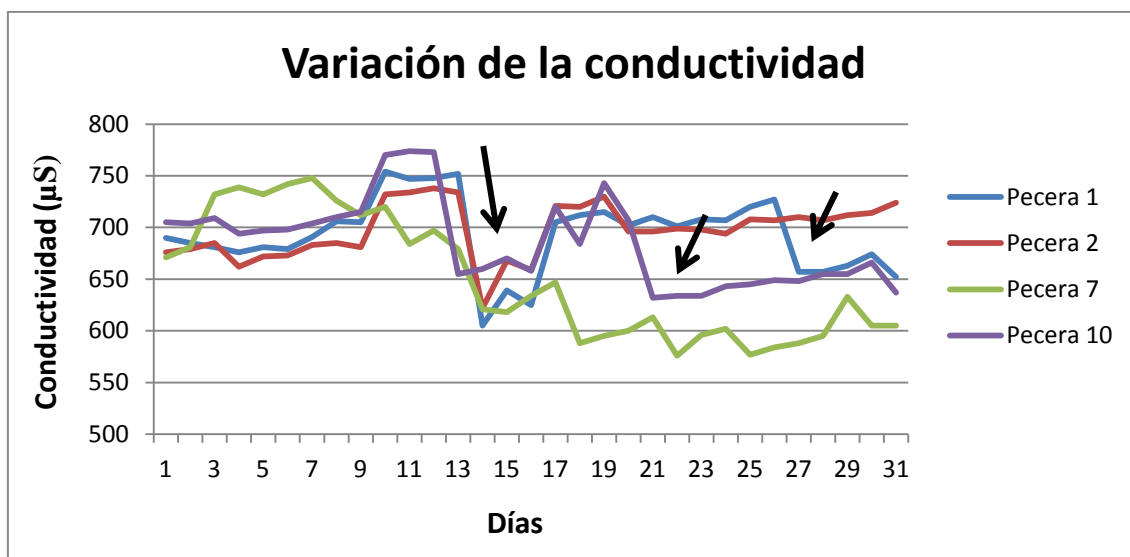


Figura 6. Representación grafica de la variación de la conductividad en el agua durante un mes. La pecera 7 corresponde a los peces adultos dedicados a la reproducción.

Como se puede apreciar en la Figura 6, la pecera número 7 tiene una conductividad menor que el resto. Esto se debe a que se trata de la pecera dedicada exclusivamente a la reproducción y por lo tanto es la que mayores cuidados precisa. Por ello se intentará mantener la conductividad cercana a los 600 μS para alterar lo menos posible el organismo de los peces. Será necesario hacer repetidas diluciones para conseguir mantener estable este parámetro.

La concentración de nitratos, nitritos y amonio se medirán una vez por semana con la ayuda de unos kits comerciales de SERA. Para ello se necesitará una pipeta Pasteur por pecera y un recipiente por cada muestra de agua que se quiere hacer reaccionar. Es muy importante mantener en todo momento condiciones de higiene y no introducir en el agua pipetas ya utilizadas en otras peceras.

Debido al metabolismo bacteriano que actúa en el mecanismo de filtración, la concentración de amonio en el medio será muy baja, en torno a los 0,5 mg/L llegando incluso a ser nula en algunas ocasiones. La oxidación del amonio generará nitratos, por lo que se tendrá especial cuidado en sus concentraciones disueltas en agua ya que pueden ser dañinos para los tejidos de los peces en concentraciones superiores a 25 mg/L. Si supera este valor habrá que hacer un cambio total de agua.

En las peceras pequeñas donde se encuentran los juveniles y alevines, no habrá que medir los parámetros debido a que hay una renovación continua del agua.

Limpieza de las peceras

No solo se acumulan nitratos en el medio, sino todo tipo de sales procedentes de la alimentación de los peces, a través de sus excrementos y de la descomposición de la comida. Como esta acumulación es un proceso que se produce poco a poco, el medio interno de los peces se va adaptando sin que les perjudique. El problema surge cuando después de mucho tiempo se cambia el agua, esto puede suponer un choque osmótico para los peces ya que el cambio brusco de la cantidad de sales y compuestos nitrogenados del medio, les impide activar sus mecanismos de osmorregulación y morirán. Por lo que será necesario hacer un cambio completo del agua una vez al mes para que no se dé una acumulación de compuestos en concentraciones altas. Así los peces podrán adaptarse a los cambios del medio.

El mecanismo de trabajo utilizado para este cambio total del agua consistirá en vaciar la pecera con una bomba manual, pero con cuidado de dejar el agua suficiente para que los peces no mueran, bastará con dejar unos 10 cm. Después se llenará la pecera con agua de 600 µs dejando un espacio de unos pocos centímetros entre la capa superficial de agua y el exterior, y se comprobará que el tubo de aire está en contacto con el agua para que haya una circulación y no se quede estancada.

Cuando se utilice el agua de 600 µs será necesario hacerla pasar por rayos ultravioleta para eliminar todos los microorganismos que puedan ser dañinos para los peces.

La filtración al ser mecánica deberá de llevar un seguimiento puesto que el perlón instalado entre las esponjas quedará lleno de partículas procedentes del agua sucia, por eso cuando se observe que el perlón tenga un color más oscuro de lo normal, se sustituirá por otro. Para ello se sacarán las esponjas y se limpiarán antes de volverlas a introducir. Luego se pondrá una fina capa de perlón entre las esponjas y se volverá a establecer en su lugar.

Este será un proceso realizado de forma manual, por lo tanto a la hora de coger las esponjas habrá que tener en cuenta que las zonas del brazo que vayan a estar en contacto con el agua estén limpias, así se evita el riesgo de que sean introducidos nuevos microorganismos que perjudiquen la supervivencia del pez cebra.

El fondo de las peceras tendrá que estar libre de materia particulada gruesa para que no proliferen organismos indeseables, pero no sucede debido a que se quedan restos de comida acumulados. Por eso habrá que supervisar diariamente el estado del fondo y en caso de haya acumulación de sustrato, retirarlo mediante una bomba manual que recoge el agua con las partículas.

Hay que tener en cuenta que tanto el cambio de filtro como la limpieza de las peceras llevará asociada una pérdida de agua, con lo cual deberemos de reponer el agua hasta llegar al nivel inicial. Para ello se considerarán los valores de conductividad que tiene la pecera que ha sido manipulada y en consecuencia añadir agua destilada si la pecera tiene unos valores superiores a 650 μS o agua de 600 μS si tiene unos valores menores.

Alimentación

A la hora de alimentarles se tendrá en cuenta que son organismos a los que les gusta cazar su propia comida y que además suelen tragársela entera. En su ámbito natural son depredadores tanto de larvas de insectos como de otros organismos que habitan cerca de plantas sumergidas en las orillas de los ríos. Incluso son peces carnívoros que se comen sus propios huevos después de la freza. Esto puede resultar un inconveniente a la hora de reproducirlos en cautividad.

La boca situada en una posición superior solo les permite comer alimentos que estén por encima de ellos. Una vez esta comida descienda, será difícil que puedan llegar a atraparla, por eso deberemos evitar darles de comer cuando haya alguna corriente para que esta no descienda de forma rápida impidiendo que los peces puedan atraparla, es decir, se deberá quitar el suministro de aire cuando se les vaya a dar de comer.

Los requerimientos nutricionales no se conocen muy bien, por eso se han tomado como modelo los conocimientos sobre la nutrición de otros peces que pueden ser aplicados a los del pez cebra.

La dieta constará de dos tipos de comida, una es la comida viva y la otra la comida procesada. La dieta viva incluye algunas especies de zooplancton, en este caso se utilizarán larvas de *Artemia salina* (Figura 7).

La dieta procesada se utilizará para reemplazar a la dieta viva y estará preparada con materiales biológicos; se podrá encontrar en forma de escamas o en forma de gránulos. Se trata de una alimentación comercial utilizada en cualquier acuario típico. Emplear alimento comercial implica una serie de ventajas como pueden ser un mayor ahorro del tiempo y de la economía, mantener un mayor control en los estados nutricionales y reducir la entrada de

patógenos y toxinas. Aunque también tendrá inconvenientes ya que no se sabe con claridad la nutrición del pez cebra, por lo que no se sabrá si con la alimentación procesada estamos actuando de manera efectiva en su requerimiento nutricional.



Figura 7. Artemia nauplio nadando (Imagen tomada de Harper & Lawrence, 2011).

La artemia nauplio es una larva de crustáceo braquiópodo que vive en charcas y lagos hipersalinos donde no pueden vivir los peces. Es decir, los peces en libertad no se alimentan de artemia pero se utiliza porque es excelente para la alimentación en cautividad. La artemia puede estar metabólicamente inactiva cuando las condiciones del medio no son las adecuadas, a estos huevos se les denomina quistes. Por eso es sencillo trabajar con este tipo de alimento vivo ya que no necesitarán un cuidado diario ni será necesario reproducirlos para seguir teniendo más población.

Cuando se quiera darles de comer artemia simplemente se pondrán los quistes en agua para que se rehidraten, con una iluminación constante y oxigenación. Normalmente bajo estas condiciones la artemia eclosionará a las 24 h por lo que será necesario retirarla del recipiente donde está para separarla de la artemia muerta y de las envueltas de los quistes. Su obtención se llevará a cabo gracias a un tamiz especial en el que quedará retenida, luego se pondrá la artemia en agua de 600 μ S y utilizando una pipeta Pasteur se dará de comer a los peces.

Se han comentado los dos tipos de dieta que se podrán proporcionar al pez cebra pero también hay que destacar que existen varios tipos de alimentación dependiendo de la edad que tengan los peces, ya sean alevines, juveniles, o adultos.

Los adultos serán alimentados dos veces al día, una por la mañana con comida comercial en escamas Vipagran baby de SERA, y otra por la tarde con artemia para reforzar su nutrición. Los peces que estén dedicados a la reproducción como gastan más energía que los demás, los alimentaremos solo con artemia el día antes de la puesta ya que se producen mejores resultados.

Los alevines necesitan mucha comida para crecer y necesitan comer de continuo. Pero la comida en polvo que se utiliza aguanta flotando en el agua bastantes horas por lo que no será necesario darles más de dos veces de comer. Estas larvas serán alimentadas con comida procesada (Micron de SERA), especial para larvas de peces. Como se puede ver en la Figura 8b, los gránulos tendrán un diámetro menor para que lo puedan atrapar con facilidad. Las larvas serán alimentadas con este alimento dos veces al día durante una semana y luego se alimentarán con micron por la mañana y artemia por la tarde durante quince días.

Los juveniles también serán alimentados dos veces al día durante un mes pero con comida en gránulos (Vipan baby de SERA) por la mañana y con artemia por la tarde, de esta manera se conseguirá una mayor supervivencia. Los gránulos de este tipo de comida procesada son más grandes que los utilizados para las larvas como podemos ver en la Figura 8a.

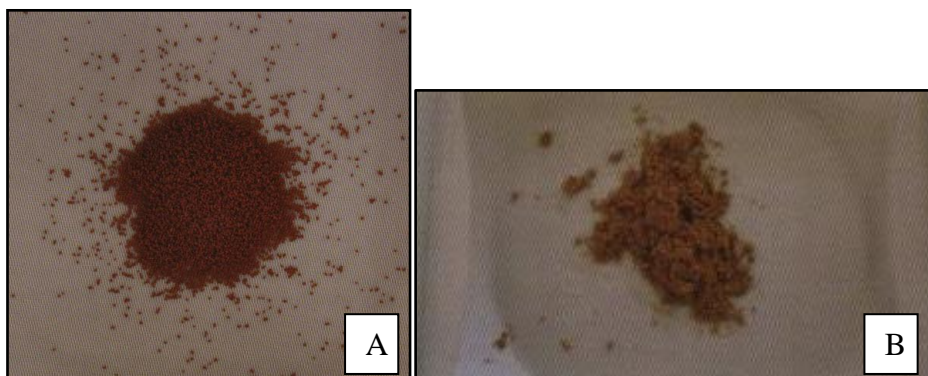


Figura 8. a) Alimentación comercial típica para juveniles con un tamaño de 400-600 μm . b) Alimentación comercial para larvas, las capsulas son muy pequeñas con un diámetro de 10-20 μm .

Reproducción

La reproducción se ve muy influenciada por factores externos como el tipo de alimentación o la iluminación. El mantenimiento de un ciclo circadiano será importante para la freza ya que la reproducción se produce a primeras horas de la mañana.

La alimentación deberá estar basada en comida viva como artemia, ya que tienen una proporción de nutrientes mayores que la comida preparada y les proporciona un mayor aporte de energía.

En su medio natural la freza la realizarán en los remansos de agua que quedan en los márgenes de las lagunas, esta zona normalmente es poco profunda y con abundante vegetación. Los huevos fecundados caerán al sustrato y quedarán tapados por las plantas, de esta manera sus progenitores no podrán comérselos.

Para la expulsión de huevos y su posterior fecundación, hará falta un cortejo que durará varias horas, el macho golpeará la cola de la hembra con la cabeza, mientras esta intenta escapar, como consecuencia la hembra expulsará los cientos de huevos que alberga y gracias a las sustancias que se dispersan en el agua, el macho expulsará los espermatozoides que finalmente fecundarán los óvulos dando lugar a los huevos.

En cautividad, para la puesta primero habrá que seleccionar a los machos y hembras. Las mejores hembras serán aquellas que tengan el abdomen más ancho, ya que esto indicará que está bien alimentada y provista de huevos. El macho seleccionado será grande y con buena apariencia.

Las puestas se harán una vez por semana para dejar descansar a los peces. La pecera en la que tenemos a los reproductores estará dividida transversalmente para que machos y hembras no se encuentren, así estarán bajo control para que solo se reproduzcan cuando se quiera.

Además, el control de la calidad del agua será mucho más exhaustivo e incluso tendrá un termómetro en el interior para mantener en todo momento el agua a la temperatura deseada.

El día antes de la puesta solo se les dará de comer artemia para que tengan más energía. Para la freza se utilizará una pecera más pequeña denominada "paridera". Sus características simulan a un sistema natural puesto que la pecera está ligeramente inclinada para que se genere una zona con menos agua que aparenta ser la orilla de un lago.

En la Figura 9 se puede ver como el fondo de la pecera está dividido longitudinalmente para que los huevos al caer no corran el riesgo de ser devorados por sus progenitores; esta división no permite el paso de los adultos al fondo de la pecera donde se encuentran los huevos. También habrá una división transversal que divide en dos la paridera, en un lado se colocará a uno o dos machos y en el otro una o dos hembras.

Las pequeñas peceras tendrán que estar bien desinfectadas, por eso una vez que son utilizadas se lavarán muy bien con jabón, luego se impregnarán con agua oxigenada, y se dejarán secar hasta la siguiente puesta.

Los peces serán colocados en las parideras el día antes de la puesta, estas peceras tendrán el mismo agua que se utiliza para llenar las peceras grandes. La mañana del día de la freza, antes de que se enciendan las luces del acuario, se retirarán los elementos que dividen las parideras transversalmente y se les dejará una o dos horas para que se reproduzcan. Una vez terminado el proceso de reproducción se devolverán a su pecera de origen.



Figura 9. Pecera típica para la freza de los peces.

A la hora de distinguir los machos y las hembras para volver a colocarlos en su lugar, habrá que fijarse en el color que tienen ya que el macho en el momento de la reproducción tendrá unos tonos anaranjados en su pigmentación, la hembra en cambio tendrá un color grisáceo y un abdomen más pronunciado.

Una vez se haya producido la freza, se pasará a recoger los huevos. Para recogerlos se utilizará un colador como el que se muestra en la Figura 10a. Los huevos se irán recogiendo y depositando en él; una vez se tengan todos, se lavarán con cuidado con agua de 600 μ S y se pondrán en una placa petri con agua que tenga la misma concentración de sales. Los huevos muertos que no sean fecundados o que simplemente no salgan adelante se retirarán con una pipeta Pasteur. Estos huevos serán fáciles de reconocer ya que son de color blanco.



Figura 10. a) Colador utilizado en la recogida de huevos. b) Desarrollo embrionario de *D. rerio* a diferentes horas (Rojas-Muñoz et al., 2007).

La cantidad de huevos que se obtendrán en cada una de las puestas dependerá mucho de los cuidados y mantenimiento de los peces.

Las placas petri con los huevos tendrán que estar a una temperatura de 28 $^{\circ}$ C para el crecimiento de los embriones de pez cebra. También podrán permanecer a temperaturas más frías pero esto hará que se produzca una ralentización del desarrollo.

Las etapas del desarrollo embrionario sucederán rápidamente unas horas después de ser fecundados, y a las 72 h la mayoría ya habrán eclosionado y serán larvas (Figura 10b). A los cuatro días ya estarán todos los alevines desarrollados por lo que se procederá a retirarlos de la placa petri e instalarlos en una pecera pequeña.

En la figura 11 se puede ver la viabilidad de los huevos de puestas realizadas durante 5 semanas. En cada puesta se pusieron una media de 13 hembras y 13 machos. Se observa claramente como ha habido un aumento progresivo del número de huevos puestos por semana, aunque a partir de la cuarta semana el descenso es muy brusco. En cuanto a la viabilidad de los huevos por puesta, se ve como durante las primeras 24 h muere una mayor proporción de huevos que en las horas posteriores, en las que el número se mantiene prácticamente estable.

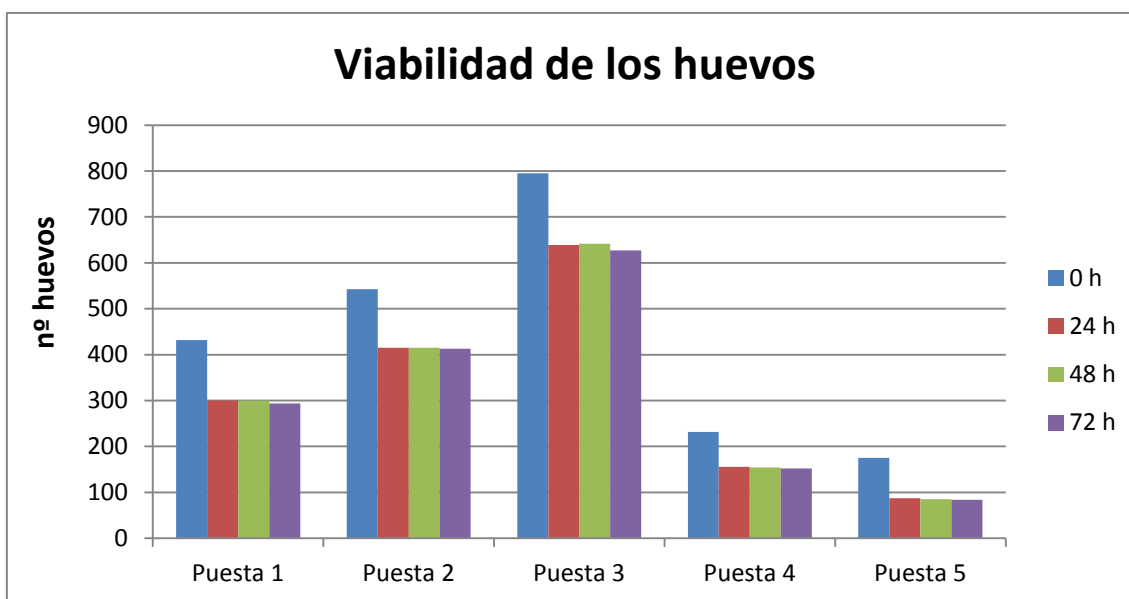


Figura 11. Representación del número de huevos viables a lo largo del tiempo en puestas realizadas durante 5 semanas.

Principales dificultades

Durante el tiempo de estudio, han sido necesarios resolver algunos problemas que afectaban de forma directa la optimización de su mantenimiento:

- Los peces muertos que se encontraron en el fondo de las peceras fueron retirados de inmediato para evitar la contaminación hacia otros peces. Los peces que estaban muy enfermos, se sacrificaron mediante un compuesto químico denominado benzocaina, el cual normalmente es utilizado como anestésico pero que en concentraciones altas puede resultar letal. Se utiliza como un método de eutanasia.
- Cuando se instaló una nueva pecera para introducir peces adultos, durante las primeras dos semanas fue muy difícil mantener unas concentraciones de amonio bajas en el agua ya que el mecanismo biológico de filtración no actuaba de forma correcta. Por lo tanto, fue necesario realizar cambios totales del agua a diario para paliar estos niveles altos de amonio. Al observar que los parámetros no se estabilizaban, se optó por vaciar solo el 20% de la pecera y alimentar a los peces de la nueva pecera una vez al día, para evitar un aporte excesivo de compuestos nitrogenados al medio. Finalmente, de esta manera se consiguió estabilizar los parámetros del agua.

- Uno de los problemas más frecuentes se produjo a la hora de coger a los reproductores ya que son muy escurridizos y difíciles de poner en las peceras de reproducción.
- Otro problema surge cuando las hembras reproductoras debido a distintos factores biológicos no expulsan los huevos a la hora de la freza. Estos huevos se acumularán semana tras semana en su interior hasta causarles la muerte. Para evitar esto, se ayudó a las hembras a soltar los huevos masajeándoles el abdomen.
- Analizando el agua de una de las peceras, se observó que contenía protozoos perjudiciales para la salud de los peces, por lo tanto se tuvo que hacer un cambio total del agua de la pecera afectada.
- Ha sido muy frecuente encontrar problemas relacionados con los aumentos de las concentraciones de amonio producidos por una mala aireación de la pecera. Como solución se optó por llenar más las peceras para que el aire estuviese en contacto con el agua y de esta manera mantener una recirculación para que pudiera ser filtrada.
- Dejar encendido durante mucho tiempo el interruptor de los rayos UV provocó un calentamiento del agua. Este hecho puede llegar a ser peligroso para la supervivencia de los peces ya que pueden llegar a morir debido al choque térmico que les supone el cambio brusco de la temperatura del agua.
- Durante una semana se produjo una bajada brusca del pH que no podía ser resuelta con la adición de compuestos alcalinos. Finalmente se decidió revisar la aireación de las peceras y se comprobó que este era el origen del problema.

CONCLUSIONES

- ✓ El mantenimiento del pez cebra requiere un cuidado diario para conseguir que la producción de embriones viables sea máxima.
- ✓ Los embriones son muy susceptibles a morir las primeras 24 h de desarrollo.
- ✓ Reproducir cada semana los mismos ejemplares aumenta la probabilidad de conseguir buenas puestas.
- ✓ Mantener una alimentación adecuada permite obtener una mejora del stock tanto en viabilidad como en número, pero esto conlleva que los parámetros del agua se vean alterados.
- ✓ Un nivel de agua óptimo en las peceras ayuda a mantener estabilizados los parámetros gracias a la recirculación del agua.
- ✓ La conductividad del agua se estabiliza cuando lleva un mayor seguimiento.

La optimización de los cuidados necesarios hacia *D. rerio* se ha plasmado en los protocolos que se adjuntan como anexos.

BIBLIOGRAFÍA

Aleström P., Holter J.L., Nourizadeh-Lillabadi R., (2006). *Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine*. Trends in Biotechnology, vol. 24 (1): 15-21.

Bopp S.K., Minuzzo M., Lettieri T., (2006). *The Zebrafish (Danio rerio): an Emerging Model Organism in the Environmental Field*. Scientific and Technical Research series. 24.

Díaz E., (2006). *El Danio cebra como animal de laboratorio*. Animales de laboratorio, núm. 34: 4-39.

Harper C. & Laurence C., (2011). *The laboratory ZEBRAFISH*. Taylor and Francis Group LLC. 274.

Matthews M., Trevarrow B., Mattheus J., (2002). *A virtual tour of the guide for Zebrafish core and users*. Lab Animal, vol. 31 (3): 34-40.

Rocha A., Ruiz S., Estepa A., Coll J.M., (2001). *Biología molecular de los peces: Interés y Aplicaciones*. Revista AquaTIC, núm. 15: 1-9.

Rocha A., Ruiz S., Coll J.M., (2002). *Método sencillo para producir huevos embrionarios de pez cebra*. Invest. Agr. : Prod. Sanid. Anim, vol. 17 (1-2): 93-102.

Rojas-Muñoz A., Bernard A., Izpisúa J.C., (2007). *El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina*. Investigación y ciencia, núm. 366: 66-69.

ANEXO I

Protocolo de calidad del agua y limpieza

❖ MATERIALES

- pHmetro y conductímetro.
- Reactivos generales para detección de compuestos nitrogenados (Ref. SERA).
- Sal marina (Ref. SERA).
- Sistema de osmosis inversa.
- Tanques con volúmenes de 300 litros.
- pH + (Ref. SERA)
- Solución comercial de bacterias (Ref. SERA).
- Bomba manual de succión de agua.
- Recipientes de diversos tamaños.
- Pipetas Pasteur.
- Perlón.
- Acuarios de distintos volúmenes.
- Balanza.
- Termómetro.
- Material general de laboratorio.

❖ METODOLOGÍA

- El encargado en el cuidado del pez cebra, deberá mantener en todo momento condiciones de higiene.
- Se medirá diariamente los valores de pH y conductividad.
 - Mantener el pH entorno a 7,2.
 - La conductividad del agua deberá estar en un rango de 600 - 650 μ S.
- Si la concentración de sales está por encima de los 650 μ S, se realizará una dilución quitando el 30% del agua de la pecera y añadiendo agua osmótica.
- Si el pH es superior a 7,6 se hará un cambio total del agua de la pecera y si el pH baja de 7,2 se añadirá medio tapón de pH +. Cada tapón de pH+ equivale a un aumento de 0,5 del pH.
- Una vez por semana se medirán los valores de nitratos, nitritos y amonios mediante reactivos comerciales, utilizando una pipeta Pasteur diferente por pecera.
 - Los valores de amonio estarán en un rango de 0-0,5 mg/L.
 - La concentración de nitritos normalmente será nula.
 - Los nitratos no podrán superar valores mayores de 25 mg/L.
- Si los valores de amonio son superiores a 0,5 mg/L se procederá a añadir 5 mL de bacterias al medio, pero si estos valores persisten durante dos días, habrá que realizar un cambio total del agua; también será necesario el cambio de agua cuando los nitratos sean superiores a 25 mg/L.
- Las peceras se llenarán con una manguera que está comunicada con un tanque de 600 μ S, pero antes de su salida pasará por rayos ultra violeta para eliminar cualquier organismo patógeno que se pueda encontrar en el agua.

- Para preparar agua con la concentración de sales deseada, se deberá llenar un tanque de 300 L con agua destilada, a ese mismo tanque se añadirá una disolución compuesta por 63 g de sal marina de SERA y un litro de agua osmótica. Se esperará a que se homogenice el agua osmótica al que se le ha añadido la disolución salina, y se mide la conductividad para saber si es la correcta.
- Aunque los parámetros sean estables, será recomendable cambiar el agua de cada pecera una vez al mes.
- Para evitar que crezcan microorganismos indeseados se limpiará el fondo de las peceras cuando haya una acumulación de partículas. La limpieza se realizará por medio de una bomba de agua manual, que succionará la zona de agua interesada, llevando consigo la retirada de las partículas.
- El recipiente donde se retirará el agua con las partículas será independiente del que se utilice para rellenar las peceras.
- Se llevará un seguimiento del sistema de filtración. El perlón se cambiará cada 20-25 días, cuando muestre un color más oscuro que el inicial.
- La limpieza completa de las peceras grandes de 100 L, las pequeñas de 11 L, y las parideras utilizadas en la reproducción, se hará fregándolas con un estropajo y jabón. Luego se aclararán con abundante agua, se empaparán en agua oxigenada y se dejarán secar un mínimo de 24 h hasta que puedan ser utilizadas de nuevo.

ANEXO II

Protocolo de alimentación

❖ MATERIALES

- Quistes de artemia.
- Tamiz.
- Agua salada.
- Agua de 600 μ S.
- Luz artificial.
- Alimentación comercial de SERA
 - Micron.
 - Vipán Baby.
 - Vipágran baby.

❖ METODOLOGÍA

- Se alimentará a los peces dos veces al día, preferiblemente mañana y tarde.
- La alimentación comercial estará alternada con alimentación viva (artemia).
- 6-14 dpf (días post-fecundación) serán alimentados con Micron.
- 14-30 dpf se alternará la alimentación con artemia, proporcionándole micrón por la mañana y artemia por la tarde.
- 30-60 dpf se cambia el tipo de alimentación y se le dará por la mañana vipán baby y por la tarde artemia.
- De 60 dpf en adelante les alimentaremos una vez con vipágran baby y otra vez con artemia.
- Los peces destinados a la reproducción tendrán una dieta basada solo en artemia el día antes de la puesta.
- Para hacer comida viva, se pondrán los quistes de artemia en un recipiente con agua hipersalina con una concentración de 33 g/L; dejándolos bajo iluminación y aireación constante durante 24 h, se conseguirá que eclosionen. Una vez se haya producido la descapsulación de la artemia, será necesario descartar las envueltas y los quistes sin eclosionar. Para ello se retirará el agua con los restos hasta que se observe que solo queda la artemia viva suspendida en el agua. Luego se filtrará el agua que contiene suspendida la artemia mediante un tamiz en el que quedará retenida la artemia. Los restos que quedan en el tamiz se diluirán en agua de 600 μ S. Una vez hecho esto se podrá suministrar el alimento a los peces.

ANEXO III

Protocolo de reproducción

❖ MATERIALES

- Pecera de adultos dividida en dos con una malla
- Peceras pequeñas para puestas (Parideras)
- Colador
- Placas petri
- Agua de 600 μS
- Pipeta Pasteur
- Red

❖ METODOLOGÍA

- Para la reproducción, se seleccionarán los machos más grandes y las hembras que tengan un pronunciado abdomen.
- Durante una semana se mantendrá cada sexo separado por una malla que divide la pecera transversalmente en dos.
- Las condiciones del agua tendrán que ser lo menos variables posibles. La reproducción será máxima si la conductividad está estabilizada en 600 μS .
- El día antes de la puesta se les dará de comer artemia dos veces al día para que tengan una mayor energía.
- Las peceras donde realizarán el cortejo se prepararán la tarde antes de la freza. Las parideras se colocarán ligeramente inclinadas para simular una orilla, ya que el desove en condiciones naturales se produce en condiciones parecidas. Estas peceras serán rellenas con agua de 600 μS .
- Con una red se cogerán los peces de las peceras grandes y se pasarán a las parideras, al estar dividida en dos, se colocarán los machos por un lado y las hembras por otro. Se puede colocar tanto una o dos hembras por macho como uno o dos machos por hembra.
- Los individuos permanecerán separados toda la noche y antes de que se enciendan las luces del acuario, el investigador tendrá que retirar la división que los separa.
- En el momento que se enciendan las luces comenzará el cortejo. La pigmentación del macho se volverá anaranjada y con unos movimientos de cabeza le dará a la hembra golpes en la cola. Se dejará que durante una hora actúen y luego se devolverá cada macho y hembra al lugar que le corresponde en la pecera grande.
- Los huevos caerán a una zona inaccesible para los progenitores, de esta manera se evitará que puedan comérselos.
- Para recoger los huevos se utilizará un fino tubo flexible que se llenará de agua para que una vez introducido en el fondo de la pecera, vaya succionando el agua con los huevos. El agua se irá filtrando con un colador donde quedarán retenidos los huevos.
- Los huevos se lavarán con agua de 600 μS y se colocarán en una placa petri con agua de la misma concentración. Se utilizará una placa petri por paridera en la que se anotará el número de placa y la fecha.

- Una vez en la placa, se eliminarán los huevos que no son viables, mediante una lupa y una pipeta Pasteur. Los huevos muertos serán aquellos que tengan un color blanquecino.
- Se dejarán durante cuatro días las placas a una temperatura de 28Cº para conseguir un desarrollo máximo.
- Cada día, desde la puesta hasta el cuarto día, deberán ser revisadas las placas para eliminar huevos muertos y limpiar el medio de la presencia de hongos.
- Cuando ya estén los alevines formados, se pasarán a una pecera pequeña una media de 50 peces por cada 11 L.
- Los restos de comida y otras partículas que queden en el fondo deberán ser retiradas diariamente con una pipeta.
- A los 3 meses ya serán adultos y se podrán pasar a una pecera grande de 100 litros.