



## Artículo de investigación

# Efecto de medicamentos homeopáticos sobre crecimiento, supervivencia y microbiota gastrointestinal, en juveniles del pectínido *Argopecten ventricosus*

José Manuel Mazón-Suástegui<sup>1</sup> Ph.D; Dariel Tovar-Ramírez<sup>1</sup> Ph.D;  
Nadia Livia Ortiz-Cornejo<sup>1</sup> Ph.D; Milagro García-Bernal<sup>1,2\*</sup> Ph.D;  
Jesús Antonio López-Carvalho<sup>1</sup> M.Sc; Joan Sebastian Salas-Leiva<sup>3</sup> Ph.D;  
Fernando Abasolo-Pacheco<sup>4</sup> Ph.D.

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Av. IPN 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, B.C.S., México.

<sup>2</sup> Universidad Central de Las Villas (UCLV-CBQ). Carretera a Camajuani Km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara, CP. 54830, Cuba.

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV). Chihuahua, Chih. México.

<sup>4</sup> Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ). Facultad de Ciencias Ambientales, Quevedo, Los Ríos EC.120501, Ecuador.

\*Correspondence: [milagarcabiernal@gmail.com](mailto:milagarcabiernal@gmail.com)

Recibido: Marzo 2019; Aceptado: Junio 2019; Publicado: Septiembre 2019.

## RESUMEN

**Objetivo.** Estudiar el efecto de medicamentos homeopáticos sobre el crecimiento, supervivencia y microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*. **Materiales y Métodos.** Se aplicaron cinco tratamientos homeopáticos derivados de bacterias [(T1) ViP-ViA 1D, (T2) ViP-ViA 7C], minerales [(T3) AcF-MsS 1D, (T4) PhA-SiT 7C], o venenos [(T5) ViT 31C] y tres controles: (C1) etanol diluido 1:99, (C2) etanol dinamizado 1C y (C3) agua destilada. La microbiota se determinó secuenciando la región V3-V5 del gen 16S rRNA. **Resultados.** El mayor crecimiento en longitud de la concha correspondió a T1 (117  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) y T2 (108  $\mu\text{m d}^{-1}$ ), la mayor supervivencia a T3 y T5 y el mejor resultado global a T3. Las curvas de rarefacción de los grupos tratados y controles mostraron una clara separación. Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre filos (Proteobacteria > Actinobacteria > Firmicutes > Bacteroidetes > Chloroflexi) y para los Géneros: *Symbiobacterium* > *Microbacterium* > *Methylobacterium* > *Bacillus* > *Paenibacillus* > *Burkholderia* > *Nostoc* > *Methylobacterium* > *Leucobacter*. El género *Symbiobacterium* fue dominante ( $p \leq 0.05$ ) para T5, respecto a todos los tratamientos y grupos controles. La especie *Microbacterium maritropicum* (Actinobacteria) mostró la mayor abundancia relativa ( $p \leq 0.05$ ) en T1 y T3 y *Symbiobacterium toebii* (Firmicutes) en T5 y T2 ( $p \leq 0.05$ ), ambas con respecto al inicio del estudio T0. **Conclusiones.** Se presenta por primera vez la composición de la microbiota del TGI de *A. ventricosus* y la aplicabilidad potencial de la homeopatía para mejorar el rendimiento productivo y modular la microbiota gastrointestinal de la especie.

**Palabras clave:** Homeopatía acuícola, microbiota de almeja, rendimiento, 16S rRNA

## ABSTRACT

**Objective.** To study the effect of homeopathic medicines on growth, survival and gastrointestinal (GIT) microbiota of Catarina scallop *Argopecten ventricosus*. **Materials and methods.** Five homeopathic (HOM) treatments derived from bacteria [(T1) ViP-ViA 1D, (T2) ViP-ViA 7C], minerals [(T3) AcF-MsS 1D, (T4) PhA-SiT 7C] or venoms [T5) ViT 31C] and three controls: [(C1) diluted ethanol 1:99, (C2) diluted/succussed ethanol 1C and (C3) distilled water] were evaluated (21 days) in triplicate. Microbiota was analysed by sequencing the V3-V5 region of the 16S rRNA genes. **Results.** The best growth in shell-length corresponded to T1 (117  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) and T2 (108  $\mu\text{m d}^{-1}$ ) and the highest survival to T3 and T5, stating T3 as the best HOM-treatment. A clear separation was found in rarefaction curves of HOM-treated against un-treated control scallops. Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were found for Phyla (Proteobacteria > Actinobacteria > Firmicutes >

### Como citar (Vancouver).

Mazón-Suástegui JM, Tovar-Ramírez D, Ortiz-Cornejo NL, García-Bernal M, López-Carvalho JA, Salas-Leiva JS, et al. Efecto de medicamentos homeopáticos sobre crecimiento, supervivencia y microbiota gastrointestinal, en juveniles del pectínido *Argopecten ventricosus*. Rev MVZ Córdoba. 2019; 24(3):7328-7338. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1536>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2019. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

Bacteroidetes>Chloroflexi and for Genera: *Symbiobacterium*> *Microbacterium*> *Methylobacillus*> *Bacillus*> *Paenibacillus*> *Burkholderia*> *Nostoc*> *Methylobacterium*> *Leucobacter*). The genus *Symbiobacterium* was dominant in T5, finding significant differences ( $p \leq 0.05$ ) with respect to all treatments. At species level, *Microbacterium maritpicum* (Actinobacteria) showed a greater relative abundance ( $p \leq 0.05$ ) in T1 and T3 and *Symbiobacterium toebii* (Firmicutes) was also significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) in abundance in T5 and T2, both against initial T0. **Conclusions.** This study showed for a first time, the composition of GIT microbiota in *A. ventricosus* and focused on the potential applicability of homeopathy to improve overall performance and modulate the GIT microbiota of the species.

**Keywords:** Aquacultural homeopathy, scallop microbiota, performance, 16S rRNA.

## INTRODUCCIÓN

Algunos moluscos pectínidos de importancia comercial se producen a lo largo de la costa del Pacífico y el Golfo de California, México, pero su pesca se considera insostenible (1). *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) es una especie cultivable altamente valorada y de rápido crecimiento (2,3) pero la producción de semillas en laboratorio (4) es afectada por mortalidades masivas en etapas iniciales de su desarrollo (5,6). Para prevenir/reducir enfermedades y muerte masiva de larvas y semillas en laboratorio se utilizan antibióticos y otros quimioterapéuticos, que tienen diferentes efectos secundarios en el medio ambiente (7); inducen el desarrollo y la propagación de cepas resistentes a antibióticos (8,9), se acumulan en los tejidos de los organismos tratados (10) y afectan la microbiota de su tracto gastrointestinal (TGI) (11).

La estructura y actividad del TGI tiene un efecto en el huésped y le ayuda a mantener el equilibrio con el entorno circundante. Se han desarrollado diferentes estrategias para modular la comunidad microbiana del TGI y aprovechar su interacción con el hospedero para promover el crecimiento, la salud y la productividad en la acuicultura (6,11,12).

Esto es insuficiente, por lo que se requiere con urgencia enfoques más eficaces y eco-sostenibles como la homeopatía acuícola (13-17), la cual utiliza medicamentos derivados de minerales, plantas y animales, que ejercen su acción a dosis ultra-bajas según el "principio de similitud", incrementando la inmunidad y resistencia natural del hospedero (18). Los tratamientos homeopáticos también pueden reducir o sustituir el uso de antibióticos, hormonas, desinfectantes y sustancias no ecológicas; disminuyendo costos de producción y aumentando la calidad y la inocuidad de los moluscos, peces y crustáceos cultivados (13-16).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de medicamentos homeopáticos sobre el crecimiento, supervivencia, y modulación de la microbiota del TGI en el pectínido marino *A. ventricosus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Organismos y mantenimiento.** Juveniles de *A. ventricosus* ( $1.98 \pm 0.1$  cm de longitud promedio) provenientes de Bahía de La Paz, Baja California Sur, México, fueron limpiados de epifauna con agua de mar filtrada y esterilizada con UV al llegar al laboratorio y se aclimataron durante una semana ( $22^\circ\text{C}$ , 37 USP de salinidad). Los juveniles se cultivaron en unidades de surgencia con agua de mar filtrada (arena sílica, bolsa de  $1 \mu\text{m}$  y carbón activado) y esterilizada con UV, alimentándose con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* (1:1) a razón de 10.8% del peso seco de tejidos blandos/día (aproximadamente  $2 \times 10^8$  células  $\text{org}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

**Formulación de los medicamentos homeopáticos.** Se utilizaron medicamentos homeopáticos comerciales para uso humano o productos homeopáticos desarrollados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.S. (CIBNOR) a partir de materias primas y aplicando metodologías estandarizadas (15,16). Se aplicaron cinco tratamientos y tres controles (tres repeticiones c/u), incluyendo (T1) ViP-ViA 1D, (T2) ViP-ViA 7C, (T3) AcF-MsS 1D, (T4) PhA-SiT 7C, (T5) ViT 31C, (C1) etanol diluido 1:99, (C2) etanol dinamizado y (C3) agua destilada.

El etanol es el vehículo típico de dilución-sucusión en homeopatía (19), pero puede desencadenar la actividad de fenoloxidasas y profenoloxidasas en camarones (20) y aumentar el recuento de hemocitos en moluscos (21). Para evitar estos posibles efectos secundarios, la dinamización etanólica "stock" (decimal o centesimal) se preparó en agua destilada para preparar la siguiente y última dinamización homeopática "experimental".

Los tratamientos homeopáticos de T1 y T2 fueron mezclas de dinamizaciones decimales o centesimales obtenidas mediante dilución/sucusión de concentrados o tinturas madre (TM), desarrolladas en el CIBNOR con cultivos bacterianos ( $1 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) de cepas patógenas y virulentas de *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM-170, ViP) y *Vibrio alginolyticus* (CAIM-57 ViA), relacionadas con altas mortalidades en bivalvos y camarón.

Brevemente, y de acuerdo con Mazón-Suástegui et al (16) los siguientes procedimientos fueron aplicados: a) las células bacterianas fueron centrifugadas (8000 g, 4°C, 20 min) y se lavaron dos veces; b) los *pellets* se diluyeron en 7.5 mL de agua MilliQ, se inactivaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación (-80°C y 24°C, respectivamente) y se sonicaron ocho veces, 30 s cada vez, para romper la pared celular y los organelos intracelulares; c) las células no rotas se eliminaron por centrifugación (3000 g, 4°C, 20 min) y el sobrenadante se diluyó (1:1 v/v) en etanol 87° GL (Similia® México) y se agitó dos minutos a 3200 rpm (BenchMixer®, Edison, NJ, EE. UU.) para obtener 15 mL de TM de cada cepa bacteriana.

Las dinimizaciones "stock" (ViP 6C y ViP 6C) se obtuvieron mediante dilución seriada y sucusión en etanol (1:99) de la TM respectiva. Para las dinimizaciones "experimentales" (ViP 7C y ViA 7C) se procedió igual, pero sustituyendo etanol por agua destilada.

El tratamiento homeopático T3 (AcF 1D + MsS 1D) fue la mezcla de dos dinimizaciones decimales (1:9) de ácido fosfórico grado analítico al 86% (Faga Lab®, Guamuchil, Sinaloa, México) y de una solución saturada de metasilicato de sodio (Faga Lab®, Guamuchil, Sinaloa, México). Se definió como TM de AcF al producto comercial sin dilución. La TM de MsS se preparó diluyendo 9.4 g en 45 mL de agua destilada, a 25°C. La primera dinamización decimal "experimental" (1D) de MsS se obtuvo diluyendo 5 mL de MsS en 45 mL de agua destilada (1:9), agitando dos minutos en vortex a 3200 rpm (Benchmark mixer®, Benchmark Scientific Inc.). La primera dinamización decimal "experimental" (1D) de AcF se obtuvo mediante igual procedimiento.

Los tratamientos T4 (PhA 7C + SiT 7C) y T5 (ViT 31C) fueron preparados a partir de medicamentos homeopáticos comerciales para uso humano (dinimizaciones "stock"). T4 fue la siguiente dilución/sucusión centesimal (1:99) de *Phosphoricum acid*® 6C y de *Silicea terra*® 6C (Similia®, México) y T5 (ViT 31C) la siguiente 1:99 de VidatoX® 30C (Labiofam®, Habana, Cuba). Las dinimizaciones "experimentales" de PhA 7C, SiT 7C y ViT 31C se prepararon utilizando agua destilada.

**Diseño experimental.** Se utilizaron 24 unidades experimentales con 36 L de agua de mar filtrada y esterilizada y un flujo ascendente de recirculación continuo (1.68 mL s<sup>-1</sup>) durante 21 h d<sup>-1</sup>. Cada unidad tenía cuatro cilindros de PVC con un fondo de malla plástica; se colocaron 13 juveniles cilindro<sup>-1</sup> y 52 juveniles unidad<sup>-1</sup>. La temperatura y la salinidad fueron de 23.5±0.5°C y 37±0.5 UPS, respectivamente. Los desechos orgánicos se

eliminaron diariamente drenando no más del 60% del agua para reducir variaciones ambientales. Los moluscos se alimentaron de la manera descrita anteriormente.

Los tratamientos se añadieron directamente al agua de mar durante 21 días (100 µL L<sup>-1</sup>) deteniendo el flujo de agua y el alimento durante tres horas para favorecer su absorción en tejidos epiteliales y branquiales. Al final del ensayo, se registró el crecimiento y supervivencia y se tomaron muestras para metagenómica de cada tratamiento y sus tres réplicas.

**Análisis de la microbiota.** El ADN bacteriano se extrajo en dos tiempos: 24 muestras al principio (T0) y 192 al final (T21) del bioensayo (ocho individuos réplica<sup>-1</sup>; 24 individuos tratamiento<sup>-1</sup>). El TGI de cada individuo fue fijado individualmente (100 mg de tejido en 500 µL de RNA-Later®) y se conservaron a -20°C.

**Extracción de ADN y secuenciación de Illumina MiSeq.** El tejido del TGI de cada individuo (216 muestras) se homogenizó por separado utilizando el homogenizador FastPrep, (MP Biomedicals®) a alta velocidad (6 m s<sup>-1</sup>) durante 30 s en 500 µL de tampón TE (50:50 Tris: EDTA, pH 8), seguido de la adición de 20 µL de SDS al 10% e incubación a 56°C durante 30 min. Luego, se agregaron 250 µL de acetato de potasio 7.5 M a las células lisadas y la mezcla se incubó en hielo durante 15 min.

Después de centrifugar el lisado celular a 8000 g a 4°C durante 10 min, la fase acuosa se extrajo con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó. La fase acuosa resultante se extrajo con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó. Posteriormente, se agregó al sobrenadante 350 µL de isopropanol frío, seguido de la incubación durante toda la noche a -20°C y la recolección de ADN mediante centrifugación. El sedimento de ADN se lavó dos veces con etanol frío a 70°GL, se centrifugó, se secó al aire y se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasa (22).

Los ADN de cada réplica se mezclaron después de la extracción para un total de 27 muestras. La concentración y la calidad del ADN se determinaron a A260 nm y A280 nm a través del espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop 8000, Thermo Scientific®) y la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v), utilizando el indicador Sybr Safe® (Invitrogen). El ADN total de cada muestra individual, se diluyó en agua libre de nucleasas hasta una concentración final de 100 ng µL<sup>-1</sup> y se usó para amplificar ±700 pb de la región hipervariable V3-V5 del gen 16S rRNA (posiciones 339 y 939 de *Escherichia coli*).

La amplificación se realizó con los cebadores universales 357F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (23) y CD [R] (5'-CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC-3') (24). Los amplicones de PCR resultantes se secuenciaron a través del formato 2x300 de la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq del Laboratorio Nacional de Genómica y Biodiversidad (LANGEBIO-CINVESTAV) en Irapuato, Guanajuato, México.

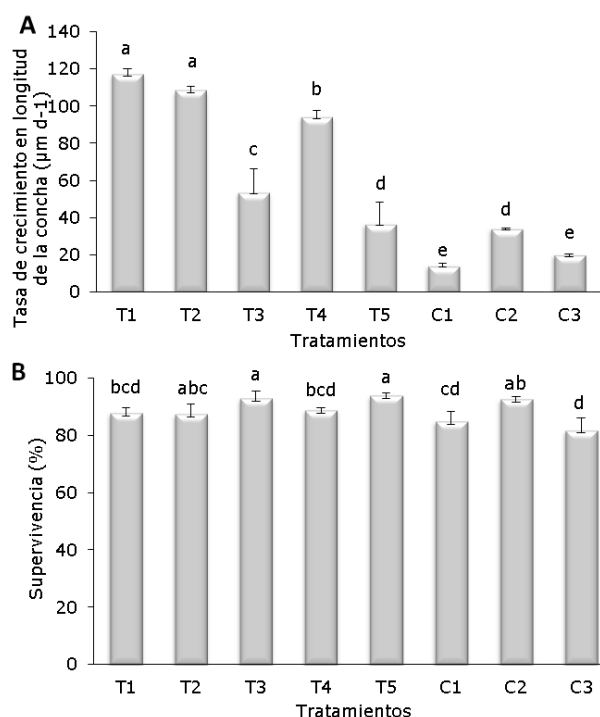
**Análisis filogenético.** Las secuencias se procesaron utilizando el software clasificador RDP (Ribosomal Database Project) con una calidad de secuencia promedio (Phred quality score) >30 y un umbral de similitud (Confidence Cutoff) del 80%, capaz de clasificar las secuencias a nivel de género. La base de datos de genes 16S rRNA de Green (<http://greengenes.lbl.gov> "Green genes 16S") se utilizó para la clasificación taxonómica en filo, clase, orden, familia y género, y sólo en algunos casos a nivel de especie. El análisis bioinformático fue realizado por LANGEBIO-CINVESTAV, México.

Se utilizaron las estimaciones de software para el análisis estadístico V.9.1.0 (25) para calcular los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H) y Simpson (J), así como las estimaciones de riqueza de Chao y para generar las curvas de rarefacción. El software XLSTAT versión 2016.05.33324 (Addinsoft 1995-2016) se usó para comparar comunidades microbianas y tratamientos a través del Análisis de componentes principales (ACP) (26) y para detectar diferencias en la abundancia del filotipo y el tratamiento mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Sólo aquellos componentes principales con valores altos (>1.0) se consideraron estadísticamente significativos.

**Accesibilidad a los datos.** Las secuencias generadas en este estudio fueron descargadas en el Archivo de Lectura de Secuencias NCBI (SRA) con la clave: Bioproject PRJNA341370 y el número de acceso SRA: SRP089926.

## RESULTADOS

**Crecimiento y supervivencia.** No se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento en peso (aumento de peso diario;  $g\ d^{-1}$ ) entre los grupos tratados con homeopatía y los grupos control, pero se detectaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento en longitud de la concha (Figura 1A). La tasa de crecimiento más alta ( $p < 0.05$ ) correspondió a T1 ( $117\ \mu m\ d^{-1}$ ) y T2 ( $108\ \mu m\ d^{-1}$ ) comparados con C1 ( $14\ \mu m\ d^{-1}$ ), C2 ( $34\ \mu m\ d^{-1}$ ) y C3 ( $20\ \mu m\ d^{-1}$ ). Los tratamientos homeopáticos T3 y T5 mostraron la mayor supervivencia ( $p < 0.05$ ) (95% y 94%, respectivamente) en comparación con los tratamientos control C1 (88%) y C3 (85%), (Figura 1B).



**Figura 1.** Tasa de crecimiento (A) y supervivencia (B) de *A. ventricosus* tratados con medicamentos homeopáticos (HOM) durante 21 días. Los valores son medias  $\pm$  intervalos de confianza al 95%. Letras diferentes denota diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Análisis de la diversidad alfa.** La secuenciación del gen 16S rRNA amplificada por PCR, de la microbiota asociada al TGI de *A. ventricosus* generó 21,717,584 lecturas con 80% de clasificación de 27 amplicones. Se demostró que el número de Unidades Taxonómicas Operacionales UTOs fue homogéneo y tuvo una gran riqueza con un número de UTOs/Chao-1 de alrededor de 699/779 y 703/768 para los grupos tratados y controles, respectivamente, mientras que el grupo control inicial (T0) al inicio del experimento exhibió el valor más alto de 689/985 (Tabla 1). Los índices de Shannon-Weaver ( $H'$ ) y Simpson ( $1-\lambda$ ) también mostraron una alta y homogénea diversidad para todos los grupos experimentales.

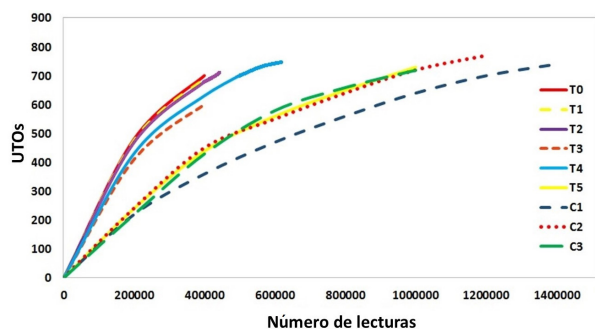
Aunque las curvas de rarefacción no alcanzaron la fase asintótica, se detectó una clara separación y diferenciación entre las curvas de rarefacción correspondientes a los grupos tratados con HOM y los grupos sin tratar. Como excepción, la curva de rarefacción de la dinamización baja (decimal) del tratamiento homeopático T1 (ViP 1D + ViA 1D) se agrupó junto con T5 y los tratamientos control (Figura 2). Los grupos C1, C2, C3, T1 y T5 alcanzaron la fase asintótica, mientras que T0, T2, T3 y T4 no la alcanzaron claramente. Por lo anterior, se asume que varias UTOs permanecieron sin ser detectadas en estos grupos.



**Tabla 1.** Análisis de secuencias y estimación de la diversidad alfa de la microbiota asociada con *A. ventricosus* tratados con medicamentos homeopáticos (HOM).

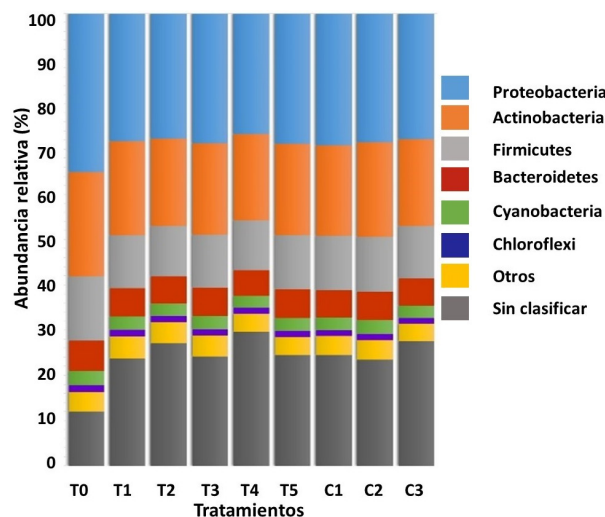
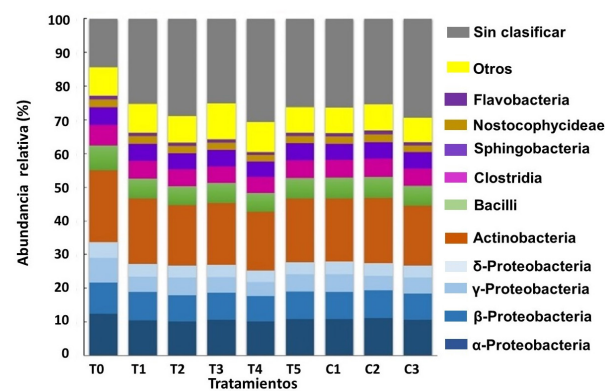
Tratamientos	Lecturas	Lecturas clasificadas (%)	UTOs*	Chao-1	Simpson (1-λ)	Shannon (H')	
T0	Inicio del exp.	482.966	78.30	689	985	0.997	2.87
T1	ViP 1D + ViA 1D	624.892	86.10	605	693	0.996	2.78
T2	ViP 7C + ViA 7C	443.731	83.20	699	737	0.996	2.78
T3	AcF 1D + MsS 1D	462.288	85.60	690	761	0.996	2.80
T4	PhA 7C + SiT 7C	501.562	84.30	685	774	0.996	2.81
T5	ViT 31C	1,086.950	83.30	696	779	0.996	2.82
C1	Ctr (+) Etanol 1:99	1,012.939	80.80	703	770	0.996	2.83
C2	Ctr (+) Etanol 1C	954.613	83.30	688	768	0.996	2.83
C3	Ctr (-) Agua	773.867	80.90	703	760	0.996	2.83

UTOs: Unidades Taxonómicas Operacionales \*Base de datos <http://greengenes.lbl.gov> "Greengenes 16S".

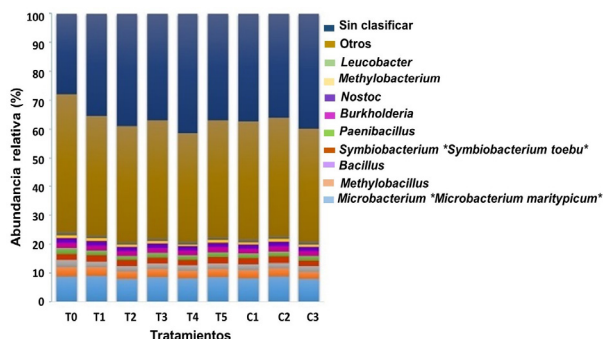
**Figura 2.** Curvas de rarefacción de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) asociada a tratamientos homeopáticos (HOM) en juveniles de la escalopa marina *A. ventricosus*.

**Composición de la microbiota.** El análisis filogenético mostró la presencia de 32 filos, 68 clases, 134 órdenes, 295 familias, 894 géneros y 3241 especies entre todos los grupos experimentales. La composición microbiana asociada al TGI de *A. ventricosus*, basada en una abundancia relativa >1%, estuvo dominada por los filos Proteobacteria ( $\approx$ 29%), Actinobacteria ( $\approx$ 20%), Firmicutes ( $\approx$ 12%), Bacteroidetes ( $\approx$ 6.0%), Cyanobacterias ( $\approx$ 3.0%) y Cloroflexi ( $\approx$ 1.3%), (Figura 3). En general, todos los grupos experimentales presentaron filos dominantes similares con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para Proteobacterias, entre T0 (34.9%) y T4 (26.1%), y para Actinobacteria, entre T0 (22.9%) y T4 (18.7%) (Figura 3).

Proteobacterias estuvo dominada por las clases  $\alpha$ - ( $\approx$ 11%),  $\beta$ - ( $\approx$ 8%),  $\gamma$ - ( $\approx$ 6%,  $p \leq 0.001$ ) y  $\delta$ - ( $\approx$ 4%,  $p \leq 0.05$ ). Las diferencias significativas entre T0 y todos los otros grupos se registraron para la clase  $\gamma$ -Proteobacteria. También se detectaron diferencias significativas entre T0 y los tratamientos T2, T3 y T4 para la clase  $\delta$ -Proteobacteria (Figura 4).

**Figura 3.** Abundancia relativa (%) de filos dominantes ( $\geq 1\%$ ) en el TGI de *A. ventricosus* después del tratamiento con diferentes medicamentos homeopáticos (HOM).**Figura 4.** Abundancia relativa ( $> 1\%$ ) a nivel de clase y Proteobacterias asociadas al TGI de *A. ventricosus* tratados con diferentes medicamentos homeopáticos (HOM).

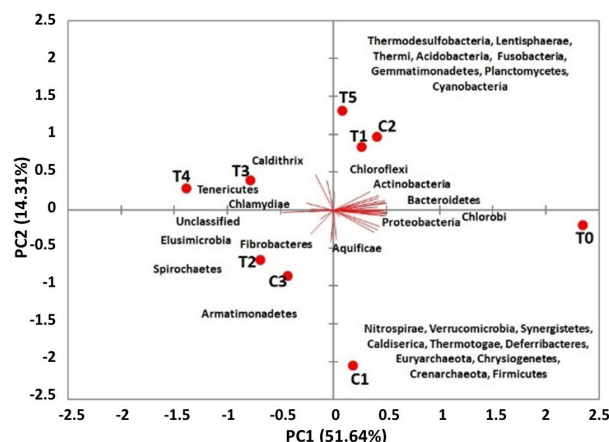
*Symbiobacterium* fue el único género, entre todos los géneros dominantes, que presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los individuos tratados con homeopatía (T5, la más abundante) y los no-tratados al inicio del bioensayo (T0, la menos abundante). Otros géneros con una abundancia relativa *dominante*  $\leq 1\%$  se incluyeron *Microbacterium* > *Methylobacillus* > *Bacillus* > *Paenibacillus* > *Burkholderia* > *Nostoc* > *Methylobacterium* > *Leucobacter* (Figura 5).



**Figura 5.** Abundancia bacteriana relativa (> 1%) a nivel de géneros y especies de la microbiota del TGI asociada a vieira marina *A. ventricosus* bajo tratamientos homeopáticos (HOM) según el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey. (\*) Significa diferencia significativa  $p \leq 0.05$ .

A nivel de especie, *Microbacterium maritypicum* (Actinobacteria) mostró una mayor abundancia relativa ( $p \leq 0.05$ ) en individuos tratados con homeopatía que recibieron T1 y T3, contra los no tratados al inicio del bioensayo (T0). *Symbiobacterium toebii* (Firmicutes) fue la otra especie cuya abundancia fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en T5 y T2 con respecto a T0 (Figura 5).

La variación en la composición de la microbiota mediante el Análisis de los Componentes Principales (ACP), de los organismos tratados con diferentes medicamentos homeopáticos puede explicarse por dos componentes principales (CP1 = 51.64%; CP2 = 14.31%) con una varianza acumulada de 65.95%. Los tratamientos T2, T3, T4 y C3 control se encontraron en la CP1 negativa asociada a los filos Spirochaetes, Fibrobacteres, Tenericutes and Chlamydiae, y otros filos menos abundantes, mientras que T0, T1, T5 y el control C2 se encontraron en la CP1 positiva asociada con los filos Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes, Cianobacterias y otros filos menos abundantes. Estos resultados coincidieron con la abundancia relativa y la composición a nivel de filo descrita anteriormente (Figura 6).



**Figura 6.** Análisis de los Componentes Principales (ACP) a nivel de filo de la microbiota asociada al tracto gastrointestinal, en juveniles de *A. ventricosus* tratados y no tratados con homeopatía.

## DISCUSIÓN

Las enfermedades relacionadas con las bacterias y los virus causan grandes mortalidades y pérdidas económicas globales en la industria de la acuicultura, e incluso pueden afectar a las poblaciones naturales de moluscos, crustáceos y peces. Las bacterias están presentes de forma natural en la microbiota del TGI de los animales, incluidos los moluscos bivalvos; algunas especies o cepas son patógenos facultativos que pueden atacar a los animales susceptibles. Los moluscos pectínidos, como la almeja Catarina *A. ventricosus* que son filtro alimentadores pueden convertirse en reservorio de patógenos potenciales transmisibles a otros organismos de la misma o diferente especie, incluido el hombre (27).

En este estudio, la almeja juvenil *A. ventricosus* tratada con nosodes homeopáticos T1 (ViP 1D + ViA 1D) y T2 (ViP7C + ViA7C) mostró diferencias significativas en la tasa de crecimiento en longitud de la concha ( $\mu\text{m d}^{-1}$ ) con respecto a los grupos control ( $p < 0.05$ ). Los nosodes son preparaciones homeopáticas de amplio espectro, muy utilizadas y provenientes de material biológico como cultivos o muestras clínicas de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos y virus), de parásitos, tejidos enfermos (tejidos cancerosos), o de productos en descomposición de humanos o animales (28).

Kiarazm et al (29) realizaron un estudio en vacas con mastitis subclínica y al tratarlas con una combinación de medicinas homeopáticas desarrolladas a partir de nódulos, observaron un menor recuento de células somáticas y una reducción en las bacterias aisladas respecto al grupo control. Carmelink et al (30) demostraron

que el agente homeopático Coli 30K es una alternativa potencial atractiva en la prevención de la diarrea por *E. coli* en lechones. Mazón-Suástegui et al. (16), demostraron el efecto de T2 sobre la respuesta inmune y antioxidante de *Seriola rivoliana*

La mayor tasa de supervivencia correspondió a los tratamientos T3 y T5 con respecto al grupo control C3. El tratamiento homeopático T3 consistió en dinamizaciones decimales de soluciones concentradas (TMs) de metasilicato de sodio y ácido fosfórico. En ratas, la adición de metasilicato de sodio tiene una acción benéfica en cantidades o concentraciones fisiológicas susceptibles, porque la sílice influye en la compleja red de interacción de citoquinas que regula la respuesta inmune (31).

La nutrición es el factor ambiental más importante que interactúa con otros procesos del cuerpo, y también tiene una profunda influencia en los mecanismos de defensa inmunológica. Los niveles deficientes o excesivos de nutrientes pueden alterar el sistema inmunológico y se refleja no sólo en efectos medibles en diversas funciones inmunitarias ensayadas *in vivo* o *in vitro*, sino también en procesos de enfermedades, como infecciones (32).

El fósforo tiene una amplia gama de funciones en el metabolismo animal, y el ácido fosfórico homeopático es apropiado para tratar afecciones gastrointestinales relacionadas con desnutrición y mala asimilación de los alimentos; también se utiliza cuando existen problemas de agotamiento y pérdida de vigor, y se ha relacionado con la mejora del desempeño general de *A. ventricosus* (14). La interacción sinérgica entre metasilicato de sodio y ácido fosfórico en dilución homeopática decimal (1D) incrementó la respuesta inmune en juveniles de *A. ventricosus*; cuando este tratamiento se aplicó en una dinamización centesimal (7C) no mostró un efecto claro sobre la respuesta inmune en esta especie, pero aumentó sus reservas energéticas en manto, músculo y glándula digestiva, que son importantes tejidos de almacenamiento de energía en moluscos bivalvos. (29).

El tratamiento T5 es un medicamento homeopático comercial (Vidatox®) para uso humano, cuyo principio activo es el veneno del escorpión rojo *Rhopalurus junceus*, una especie endémica de Cuba. Las propiedades antitumorales atribuidas al Vidatox® se han demostrado a través de varios estudios preclínicos (33). Según Mazón-Suástegui et al (15), aumentó la supervivencia y la inmunidad del camarón blanco juvenil *Litopenaeus vannamei* retado con una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus*.

La microbiota asociada al TGI es un factor clave para el desarrollo de la inmunidad y la nutrición

del hospedero (21). La mayoría de esas bacterias pueden ser representativas de la microbiota del ambiente circundante (22) y son relevantes para reducir la vulnerabilidad del huésped contra los patógenos y las enfermedades infecciosas relacionadas (22-24). En este estudio, los valores del índice de Shannon mostraron valores similares en todos los grupos experimentales de 2.75 a 2.83, lo que indica que la microbiota asociada con estos organismos fue diversa en todos los grupos.

En un estudio realizado por Trabal-Fernández et al (11) se demostró que la microbiota asociada a semillas (juveniles) de ostra fue más diversa que la asociada a los adultos de la misma especie. En este sentido, la madurez del TGI puede influir en la composición de la microbiota en organismos marinos (34).

Proteobacterias fue el filo dominante del TGI de *A. ventricosus*, tanto en los grupos tratados como en los controles, seguido de Actinobacteria y Firmicutes. También se encontró que este filo fue predominante en estadios juveniles y adultos tempranos y avanzados de las ostras *C. corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea* (11); en los estadios larvales de *C. gigas* (35), *C. virginica* (36), *Haliotis discus* (37), *Patella pellucida* (38) y *Patinopecten yessoensis* (39), en peces como *Oncorhynchus mykiss* y en camarón *L. vannamei* (40).

La mayoría de las clases dentro de las Proteobacterias, juegan un papel importante en los moluscos bivalvos, ya que son capaces de degradar la celulosa y el agar, los cuales son componentes principales de sus alimentos, y además, fijan el nitrógeno en el TGI en los bivalvos (41). Nuestros resultados concuerdan con los de Lasa et al (42) quienes informaron que Proteobacteria fue el filo más abundante en moluscos ostreidos. En este estudio, Actinobacteria fue el segundo filo con la abundancia relativa más alta. Algunos de sus miembros producen metabolitos secundarios los cuales pueden proteger y beneficiar al huésped contra varias infecciones (43), y juegan un papel importante en la mineralización de la materia orgánica, la inmovilización de nutrientes minerales, la fijación de nitrógeno y la protección del medio ambiente, además de su actividad celulolítica (44) y quitinolítica (45).

Firmicutes fue el tercer filo más abundante ( $\approx 12\%$ ) en el TGI de *A. ventricosus* en todos los grupos experimentales, con una abundancia relativa menor a la de los dos fillos anteriores. Firmicutes es un grupo altamente relevante en ambientes acuáticos y se encuentra en la microbiota de los ostreidos (11), el cual está involucrado en procesos enzimáticos complejos, como la degradación y fermentación de los polisacáridos (46). El mismo es dominante en el TGI de los organismos herbívoros donde algunas

especies, como *Lactobacillus*, pueden estimular el sistema inmunológico y proteger al hospedero de la invasión y el establecimiento de patógenos (47).

Las clases dominantes en este estudio fueron Alfa- y Betaproteobacterias; las Alfaproteobacterias son dominantes en los ambientes marinos (48), (Figura 4). Nuestros resultados coincidieron con los de Trabal-Fernández et al (11), quienes informaron que las Proteobacterias son las más abundantes en ostras; sin embargo, en la etapa juvenil temprana, Alpha- y Gammaproteobacteria fueron más abundantes, mientras que en adultos, la clase más abundante fue Gammaproteobacteria, seguida de Beta- y Alphaproteobacteria.

Los géneros predominantes en el TGI de juveniles de *A. ventricosus* fueron *Symbiobacterium* y *Microbacterium*, seguido por *Methylobacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Nostoc*, *Methylobacterium* y *Leucobacter*, comúnmente en el medio marino (42). *Symbiobacterium* fue dominante ( $p \leq 0.05$ ) en el tratamiento T5 (Vidatox®), el cual estimula el sistema inmune. *Symbiobacterium* sp. es un género muy extendido en el entorno natural, pero el conocimiento limitado en la sistemática de este género dificulta su aislamiento (49).

Las conchas de las ostras son una fuente común de *Symbiobacterium* sp. y otras bacterias relacionadas con su crecimiento (50). Ishii et al (51) infirieron que este grupo de bacterias puede jugar un papel importante en el ciclo del nitrógeno en ambientes anaeróbicos, por tanto, son beneficiosas ya que participan en la fijación de nitrógeno, favoreciendo la nutrición de los organismos marinos.

A nivel de especie, *Microbacterium maritypicum* fue más abundante ( $p \leq 0.05$ ) en T1 y T3 con respecto a los controles. Esta bacteria produce sideróforos, los cuales pueden inhibir el crecimiento de patógenos oportunistas que carecen de la capacidad de producir hierro (52). El hierro es un metal bioactivo limitante en el agua de mar, pero es esencial para el crecimiento de bacterias marinas (53), por lo que estos tratamientos con homeopatía pueden contribuir a reducir los patógenos.

Los tratamientos homeopáticos T2 y T5 incrementaron la abundancia de *Symbiobacterium toebii* con respecto a T0 ( $p \leq 0.05$ ). Las especies de *Symbiobacterium* son simbióticas (54), pero también muestran un crecimiento mono-marcado si el CO<sub>2</sub> o el bicarbonato están disponibles (55). Joong-Jae et al. (54) mostraron que *Geobacillus kaustophilus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* tuvieron efectos sobre el crecimiento de *S. toebii*, indicativo de que existen factores promotores del crecimiento ampliamente presentes en diversas cepas bacterianas.

Como conclusión, se ha descrito por primera vez la composición y diversidad de la microbiota gastrointestinal de *A. ventricosus*, con predominio de los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes. La medicación homeopática promovió el crecimiento y la supervivencia en juveniles, pero también la proliferación de *Microbacterium maritypicum* (T1, T3) y *Symbiobacterium toebii* (T2, T5). Esto permite asumir que la homeopatía acuícola tiene potencial para modular la microbiota del TGI y mejorar la producción de semillas en el laboratorio.

### Conflicto de intereses

Los autores no declaramos ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

Al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (México), Proyecto Ciencia Básica CONACYT 258282 "Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial" bajo la responsabilidad académica de JMMS. Todos los autores contribuyeron con el manuscrito y agradecen al personal técnico del CIBNOR: Delfino Barajas, Pablo Ormart, Julián Garzón, Guillermo García, Eulalia Meza. Diana Fischer editó el manuscrito en inglés.

## REFERENCIAS

1. Ruíz-Verdugo CA, Koch V, Félix-Pico V, et al. Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. In: Shumway S, Parsons GJ. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 40: Elsevier; 2016. p.1111-1125, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-62710-0.00029-8>.
2. Mazón Suástegui JM. Biología y cultivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). [Tesis doctoral]. Barcelona (España): Universitat de Barcelona; 2005.
3. Mazón-Suástegui JM, Lodeiros Seijo C, Avilés-Quevedo A, Rodríguez-Jaramillo C, Ortiz-Cornejo N, Abasolo-Pacheco F. Cornstarch as a dietary supplement in conditioning broodstock and spat nursery of the Pacific calico scallop, *Argopecten ventricosus*. Lat Am J Aquat Res 2017; 45(5):915-921. DOI: <http://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue5-fulltext-6>



4. Oyinlola MA, Reygondeau G, Wabnitz CCC, Troell M, Cheung WWL. Global estimation of areas with suitable environmental conditions for mariculture species. PLoS ONE 2018; 13:e0191086. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191086>
5. Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde S, Figueras JL. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve mollusks. Environ Microbiol Rep 2010; 2:34-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x>
6. Abasolo-Pacheco F, Campa-Córdova AI, Mazón-Suástegui JM, Tovar-Ramírez D, Araya R, Saucedo PE. Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strains during early development. Aquac Res. 2017; 48:4597-4607. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.13283>
7. Zheng D, Chang Q, Gao M, She Z, Jin C, Guo L, et al. Performance evaluation and microbial community of a sequencing batch biofilm reactor (SBBR) treating mariculture wastewater at different chlortetracycline concentrations. J Environ Manage. 2016; 182:496-504. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.003>
8. Undabarrena A, Beltrametti F, Claverías FP, González M, Moore ERB, Seeger M and Cámara B. Exploring the Diversity and Antimicrobial Potential of Marine Actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia, Chile. Front Microbiol. 2016; 19(7):1135. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01135>
9. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. J Clin Invest. 2014; 124(10):4212-4218. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI72333>
10. Rand-Weaver M, Margiotta-Casaluci L, Patel A, Panter GH, Owen SF, Sumpter JP. The Read-Across Hypothesis and Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals. Environ Sci Technol. 2013; 47:11384-11395 DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/es402065a>
11. Trabal-Fernández N, Mazón-Suástegui JM, Vázquez-Juárez R, Ascencio-Valle F, Romero J. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. FEMS Microbiol Ecol. 2014; 88(1):69-83. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12270>
12. Mente E, Gannonb AT, Nikoulia E, Hammerc H. Gut microbial communities associated with the molting stages of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. 2016; 463(1):181-188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.045>
13. Mazón-Suástegui JM, Rosero-García A, Avilés-Quevedo A, Dumas S, Vega R, Rodríguez-Jaramillo C, Tovar-Ramírez D. Homeopathy for marine fish aquaculture: Increased growth and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Homeopathy. 2016; 105:32-33. DOI: <https://10.1016/j.homp.2015.12.055>
14. Mazón-Suástegui JM, García-Bernal M. Saucedo PE, Campa-Córdova AI, Abasolo-Pacheco F. Homeopathy outperforms antibiotics in juvenile scallop *Argopecten ventricosus*: Effects on growth, survival, and immune response. Homeopathy. 2017; 106: 18-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.homp.2016.12.002>
15. Mazón-Suástegui JM, García-Bernal M, Avilés-Quevedo A, Campa-Córdova A, Salas-Leiva J, Abasolo-Pacheco F. Assessment of homeopathic medicines on survival and antioxidant response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Rev MVZ Córdoba. 2018; 23(3):6850-6859. DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1373>
16. Mazón-Suástegui JM, Salas-Leiva J, Teles A, Tovar-Ramírez D. Immune and antioxidant enzyme response of Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles to ultra-diluted substances derived from phosphorus, silica and pathogenic *Vibrio*. Homeopathy. 2019; 108(1):43-53. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1672197>
17. Ortiz-Cornejo NL, Tovar-Ramírez D, Abasolo-Pacheco F, Mazón-Suástegui JM. Homeopatía, una alternativa para la acuicultura. Revista Médica de Homeopatía. 2018; 10(1):18-24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.006>
18. Bellavite P, Conforti A, Ortolani R. Immunology and homeopathy. 3. Experimental studies on animal models. Evid Based Complement Alternat Med. 2006; 3(2):171-186. DOI: <https://doi.org/10.1093/ecam/nel016>
19. Bellavite P, Signorini A. The emerging science of homeopathy: complexity, biodynamics, and nanopharmacology. 2nd ed Berkeley (CA): North Atlantic Books; 2002.
20. Hernández-López J, Gollás-Galván T, Vargas-Albore F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp Biochem Physiol C. 1996; 113(1):61-66. DOI: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0)

21. Luna-González A, Maeda-Martínez AN, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immun.* 2003; 15(4):275–282. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00165-1)
22. Hart ML, Meyer A, Johnson PJ, Ericsson AC. Comparative evaluation of DNA extraction methods from feces of multiple host species for downstream next-generation sequencing. *PLoS one.* 2015; 10(11):e0143334. DOI: <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70103>.
23. Turner S, Pryer KM, Mia VPM, Palmera JD. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46(4):327–338. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
24. Rudi K, Skulberg OL, Larsen F, Jakobsen KS. Strain Characterization and Classification of Oxyphotobacteria in Clone Cultures on the Basis of 16S rRNA Sequences from the Variable Regions V6, V7, and V8. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(7):2593–2599. <https://aem.asm.org/content/63/7/2593>
25. Colwell RK, Elsensohn JE. EstimateS turns 20: statistical estimation of species richness and shared species from samples, with nonparametric extrapolation. *Ecography* 2014; 37:609 – 613. DOI: <https://doi.org/10.1111/ecog.00814>
26. Krzanowski W. Principles of multivariate analysis: A User's Perspective Vol. 23. 2nd ed. Oxford University Press; 2000.
27. Johnson C, Bowers J, Griffitt K, Molina V, Clostio R, Pei S, et al. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Applied and Environmental Microbiology.* 2012; 78:7249–7257. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01296-12>
28. Shah R. Scientific method of preparing homeopathic nosodes. *Indian J Res Homeopath.* 2014; 8(3):166–173. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-7168.141740>
29. Kiarazm M, Tajik P, Nava HG. Assessment of the effect of homeopathic nosodes in subclinical bovine mastitis. *Ann Biol Res.* 2011; 2(5):552–562. <https://www.semanticscholar.org/paper/Assessment-of-the-effect-of-homeopathic-nosodes-in-Kiarazm-Tajik/7f86d1909a2ca8c21217c23da53ec8f65835b90b>
30. Camerlink I, Ellinger L, Bakker EJ, Lantinga EA. Homeopathy as replacement to antibiotics in the case of *Escherichia coli* diarrhoea in neonatal piglets. *Homeopathy.* 2010; 99(1):57–62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.homp.2009.10.003>
31. Nielsen FH. A novel silicon complex is as effective as sodium metasilicate in enhancing the collagen-induced inflammatory response of silicon-deprived rats. *J Trace Elem Med. Bio.* 2008; 22:39–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.11.004>
32. Costa V, Casamassimi A, Ciccodicola A. Nutritional genomics era: opportunities toward a genome-tailored nutritional regimen. *J Nutr Biochem.* 2010; 21(6):457–467. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.10.012>
33. Díaz-García A, Morier-Díaz L, Frión-Herrera Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D, et al. *In vitro* anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res.* 2013; 4:5–12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717326/>
34. Kesarcodi WA, Philippe M, Jean-Louis N, Rene R. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture.* 2012; 344–349:29–34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.029>
35. Asmani K, Petton B, Le Grand J, Mounier J, Robert R, Nicolas JL. Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture.* 2016; 464(1):434–444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.020>
36. King GM, Judd C, Kuske CR, Smith C. Analysis of Stomach and Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. *Plos One.* 2012; 7(12):1–11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051475>
37. Lee MJ, Lee JJ, Chung HY, Choi SH, Kima BS. Analysis of microbiota on abalone (*Haliotis discus hannai*) in South Korea for improved product management. *Int J Food Microbiol.* 2016; 234(3):45–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.032>
38. Dudek M, Adams J, Swain M, Hegarty M, Huws S, Gallagher J. Metaphylogenomic and Potential Functionality of the Limpet *Patella pellucida*'s Gastrointestinal Tract Microbiome. *Int J Mol Sci* 2014; 15(10):18819–18839. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms151018819>

39. Sun X, Liu J, Li M, Zhao X, Liang J, Sun P, Ma, Y. Characterization of bacterial communities associating with larval development of Yesso Scallop (*Patinopecten yessoensis* Jay, 1857) by high-throughput sequencing. *J. Ocean Univ. China*. 2016; 15(6):1067-1072. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11802-016-3092-8>
40. Zhang M, Suna Y, Liu Y, Qiao F, Chena L, Liub WT, Du Z, Li E. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. *Aquaculture*. 2016; 454(1):72-80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.014>
41. Zeng S, Huang Z, Hou D, Liu J, Weng S, He J. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. *Peer J*. 2017; 5:e3986. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3986>
42. Lasa A, Mira A, Camelo-Castillo A, Belda-Ferre P, Romalde JL. Characterization of the microbiota associated to *Pecten maximus* gonads using 454-pyrosequencing. *Int Microbiol*. 2016; 19(2):93-99. DOI: <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.267>
43. Jensen PR, Moore BS, Fenical W. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Nat Prod Rep*. 2015; 32(5):738-751. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4np00167b>
44. Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res*. 2012; 167(10):571-80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>
45. Baier F, Copp JN, Tokuriki N. Evolution of enzyme superfamilies: comprehensive exploration of sequence-function relationships. *Biochemistry*. 2016; 55:6375-6388. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00723>
46. Dudek M, Adams J, Swain M, Hegarty M, Huws S, Gallagher J. Metaphylogenomic and Potential Functionality of the Limpet *Patella pellucida*'s Gastrointestinal Tract Microbiome. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(10):18819-18839. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms151018819>
47. Nayak SK. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res* 2010; 41(11):1553-1573. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
48. Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2014; 54(7):938-956. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.619671>
49. Yilmaz P, Yarza P, Rapp JZ, Glöckner FO. Expanding the world of marine bacterial and archaeal clades. *Front. Microbiol*. 2016; 6:1524. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01524>
50. Sugihara T, Watsuji TO, Kubota S, Yamada K, Oka K, Watanabe K, Meguro M, Sawada E, Yoshihara K, Ueda K, Beppu T. Distribution of *Symbiobacterium thermophilum* and related bacteria in the marine environment. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(1):204-211. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.70619>
51. Ishii S, Yamamoto M, Kikuchi M, Oshima K, Hattori M, Otsuka S, Senoo K. Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(2):7070-7078. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01481-09>
52. Sugita H, Mizuki H, Itoi S. Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. *Aquacult Res*. 2012; 43(2):481-488. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02851.x>
53. Boyd PW, Ellwood MJ. The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nat Geosci* 2010; 3(10):675. DOI: <https://doi.org/10.1038/ngeo964>
54. Joong-Jae K, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu, Jin-Ho Seo, Kwang Kim, Moon-Hee S. Characterization of Growth-supporting Factors Produced by *Geobacillus toebii* for the Commensal Thermophile *Symbiobacterium toebii*. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18(3):490-496. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388467>
55. Watsuji TO, Kato T, Ueda K, Beppu T. CO2 supply induces the growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a syntrophic bacterium. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70(3):753-756. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.70.753>