



Identificación microbiológica de algunas cepas nativas cultivables asociadas al tracto digestivo en *Panaque cochliodon*

Juan David Cano-Gil^{1*} ; Luz Adriana Gutiérrez-Ramírez¹ ; Carlos A. David-Ruales¹ ;
Sandra Pardo-Carrasco² ; Valentina Jaramillo-Ruiz¹ ; Manuela Arboleda-Restrepo¹ 

¹Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Zootecnia, Antioquia, Colombia.
²Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal. Medellín, Colombia.

*Correspondencia: jucanog@unal.edu.co

Recibido: Agosto 2023; Aceptado: Febrero 2024; Publicado: Mayo 2024.

RESUMEN

Objetivo. Caracterizar por pruebas microbiológicas y bioquímicas las cepas nativas asociadas al tracto intestinal de la especie *Panaque cochliodon*. **Materiales y métodos.** Se utilizaron tres ejemplares adultos de la especie *Panaque cochliodon* capturados en el río Magdalena que fueron transportados y sacrificados bajo normas de bienestar animal. Se realizó disección del tracto intestinal obteniendo muestras para el aislamiento microbiológico, usando medios de cultivo selectivos, purificando los microorganismos, realizando pruebas bioquímicas metabólicas y pruebas API 20E (Biomeriux) para su identificación. **Resultados.** Se obtuvo información sobre la estructura poblacional microbiana, reportando el phylum Proteobacteria con las especies: *Pantoea* sp, *Erwinia* sp, *Providencia stuarti*, *Providencia alcalifaciens*, *Serratia ficaria*, *Citrobacter koseri* y el phylum Firmicutes con las especies: *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus circulans*. **Conclusión.** Se logró identificar microorganismos predominantes en *Panaque cochliodon* de gran relevancia para la acuicultura que pertenecen al phylum Proteobacteria y al phylum Firmicutes.

Palabras clave: Especies silvestres; microbiota intestinal; firmicutes; proteobacteria (*Fuente: ICYT de Biología animal*).

ABSTRACT

Objective. To characterize by microbiology the native strains associated to the intestinal tract of the species *Panaque cochliodon*. **Materials and methods.** Three adult specimens captured in the Magdalena River that were transported and sacrificed under animal welfare regulations were used. Dissection of the intestinal tract was performed, obtaining samples for microbiological isolation, using culture media, purifying the microorganisms, performing metabolic biochemical tests and API 20E (Biomeriux) tests for their identification. **Results.** Information on the microbial population structure was obtained, reporting the phylum Proteobacteria with the species: *Pantoea* sp, *Erwinia*

Como citar (Vancouver).

Cano-Gil JD, Gutiérrez-Ramírez LA, David-Ruales CA, Pardo-Carrasco S, Jaramillo-Ruiz V, Arboleda-Restrepo M. Identificación microbiológica de algunas cepas nativas cultivables asociadas al tracto digestivo en *Panaque cochliodon*. Rev MVZ Córdoba. 2024; 29(2):e3332. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3332>



©El (los) autor (es) 2024. 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.

sp., *Providencia stuarti*, *Providencia alcalifaciens*, *Serratia ficaria*, *Citrobacter koseri* and the phylum Firmicutes with the species: *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus circulans*. **Conclusion.** The predominant culturable microorganisms in *P. cochliodon* belong to the phylum Proteobacteria and the phylum Firmicutes.

Keywords: Wild species; gut microbiota; firmicutes; proteobacteria (Source: *ICYT de Biología animal*).

INTRODUCCIÓN

P. cochliodon es un pez endémico de los ríos Cauca y Magdalena, reportado como vulnerable (A2d)(1); con alta demanda en el mercado de peces ornamentales y escaso conocimiento en aspectos referentes a su biología, su microbioma intestinal y a su fisiología digestiva; tiene hábitos xilívoros (2), es decir su consumo depende de una materia prima de escaso valor nutritivo como la lignina, pero que en estos peces se convierte en un factor importante para la obtención de energía y, para el mantenimiento de los procesos metabólicos (3); los microorganismos asociados al sistema digestivo cumplen un papel crucial en la digestión y en la modulación metabólica por la descomposición y asimilación de los nutrientes en su sistema digestivo. Estos microorganismos también influyen en el metabolismo de los peces, participando en la síntesis de vitaminas, la producción de enzimas y la regulación de procesos metabólicos clave. Comprender cómo la microbiota interactúa con la fisiología y la nutrición de los peces es esencial para optimizar su alimentación (3), defensa contra patógenos (4) y estimular el sistema inmunológico del hospedero (4). La microbiota tiene interacciones establecidas con los peces desde su ontogenia, así los microorganismos colonizan su cuerpo, estableciendo relaciones simbióticas que son clave para su desarrollo saludable (5). Estudios demuestran alta diversidad de microorganismos en peces en ambientes dulceacuícolas, por ejemplo algunos bacilos Gram negativos y algunos géneros de la familia Enterobacteriaceae y Firmicutes (6).

El microbioma de los peces está cobrando importancia gracias a los diferentes estudios que se acercan a la estructura de sus comunidades, otros relacionan dietas con inclusión o no de probióticos (7,8) o incluso ácidos orgánicos, buscando modular bacterias patógenas, previniendo enfermedades y evitando el uso de antibióticos (8). Dentro de las técnicas de caracterización de la microbiota están las moleculares (8), además de las pruebas bioquímicas, las cuales permiten identificar género y especie de los microorganismos (9).

La caracterización bioquímica de los aislados microbianos permite determinar su diversidad y hacer inferencias sobre sus interacciones (9,10).

Teniendo en cuenta que *P. cochliodon* no tiene estudios previos sobre la microbiota intestinal, se identificaron por pruebas bioquímicas algunos aislados cultivables asociados a su intestino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones éticas. La captura de los especímenes de *P. cochliodon* se realizó en el río Magdalena, sector Barrancabermeja, de acuerdo con los parámetros del decreto colombiano número 1376. Para ello la Corporación Universitaria Lasallista, cuenta con el permiso de colección de especies silvestres con fines de investigación otorgado por la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP), por medio de la Resolución No. 2614 del 28 de diciembre de 2020; adicionalmente se tiene el respaldo del Comité de Ética y Experimentación con animales de la Corporación Universitaria Lasallista (Unilasallista), dentro del Convenio 267 con la AUNAP, con fecha 24 de septiembre de 2020.

Disección y aislamiento del intestino. Para la obtención del material biológico (vísceras), la eutanasia de los ejemplares se hizo con sobredosis de Eugenol® (200 mg/L) y luego corte medular. Posteriormente se procedió a limpiar con etanol al 70% v/v para reducir la contaminación externa. Se realizó disección en la zona ventral con bisturí estéril cortando desde el ano hasta la boca, extrayendo el intestino completo.

Aislamiento bacteriano. De las muestras se escogieron 3g de intestino por pez disectado, se incubaron en caldo BHI cerebro corazón por 2 horas/30°C en condiciones anaerobias, al cabo de las 2 horas se maceró el intestino (9,10) y, se realizó diluciones sucesivas hasta 10^{-5} , de la dilución 10^{-3} , 10^{-4} , y 10^{-5} se sembró por siembra en superficie en Agar BPLS (Verde-brillante Rojo fenol-Lactosa-Sacarosa) (MERCK, 110747); Agar MacCONKEY (Merck, 100205); Agar (de MAN, ROGOSA y SHARPE) (Merck, 110660);

Agar nutritivo (Merck, 111471) y Agar M17 (Merck, 115108); los medios inoculados fueron llevados a incubación a 30°C +/- 2°C por 48 horas, para el aislamiento de *Bacillus sp.*, se llevó la dilución 10⁻² a calentamiento 80°C por 10 minutos y luego se realizó la siembra en agar nutritivo. Después del crecimiento bacteriano, se llevó a cabo el recuento de las colonias (UFC/g); se seleccionaron las diluciones en las que se lograron contar entre 1 y 250 colonias, los datos obtenidos se expresaron en la (Figura 1). Posteriormente se realizó la identificación morfológica de las colonias por tinción de Gram y seguido se hizo la purificación de cada aislado que presentara características particulares diferentes, los aislados se codificaron y se conservaron a -80°C en tubos eppendorf con caldo nutritivo más glicerol hasta ser empleados para las pruebas bioquímicas (9,10).

Identificación bioquímica. Para la identificación de los bacilos esporulados Gram positivos, se emplearon baterías bioquímicas convencionales: Agar SIM (Merck Millipore,105470), Caldo rojo de fenol base (Merck Milipore,110987), Manitol (Merck Milipore, 443907), Nitrato movilidad (Merck milipore,14305-500G), Arabinosa (Merck Milipore, 101492), Glucosa (Merck milipore,117866) Xilosa (Merck, 108689), Gelatina (Merck,107004) Caldo MR-VP (Merck ,105712) Agar huevo-lecitinasa (Merck, 110857) Agar leche- agar caseína (Merck, 110860), Agar almidón (Merck, 101252). Estas pruebas mostraron una identificación de los aislados con un porcentaje de identificación superior al 90%, los cultivos fueron inoculados de acuerdo con los protocolos sugeridos (9,10).

Los bacilos Gram negativos fueron identificados mediante el sistema API 20 E Biomeriux (9,10). Para ello se estandarizó el inóculo a través del patrón de McFarland (1.5 x 10⁸ UFC/mL) y se siguió el protocolo propuesto por Puello-Caballero et al (9) y Gutiérrez-Ramírez et al (10). Para obtener cultivos nuevos y frescos se usaron los medios de cultivo Agar BPLS (Verdebrillante Rojo fenol-Lactosa-Sacarosa) (MERCK, 110747), Agar MacConkey (Merck, 100205) por 24 horas. Posteriormente se incubó cada prueba con el inóculo según las indicaciones del fabricante, y se hizo la lectura obteniendo el perfil numérico para ingresarlo en el Software API

WEB (Francia biomerieux.com), el cual mostró la identificación de los aislados con un porcentaje de identificación superior al 95% (9,10). Todos los ensayos se efectuaron en el laboratorio de microbiología de Unilasallista.

RESULTADOS

Los recuentos bacterianos del intestino de *P. cochliodon* se muestran en la (Figura 1), se recuperó mayor cantidad de bacilos Gram positivos con un recuento de UFC/g 9.9*10⁵ y cocos Gram positivos con UFC/g 2.8*10⁵, en cambio el recuento para bacterias ácido lácticas fue inferior, con una cantidad de UFC/g 2 *10⁴. Estos resultados se muestran en cada una de las diluciones empleadas en las cuales se evidencian que para los bacilos Gram negativos se encontró un recuento de 1.5*10⁶ UFC/g y Gram positivos un recuento de 9.9*10⁵ UFC/g.

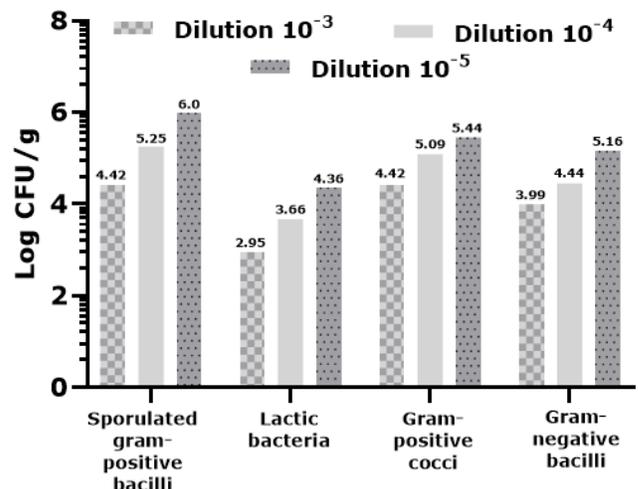


Figura 1. Recuento en logaritmo de unidades formadoras de colonia (UFC/g) del microbioma intestinal de *P. Cochliodon*.

La observación de las colonias permitió determinar las características morfológicas típicas y relevantes del aislado, asociadas a la forma, textura, elevación y color, entre otras, que en conjunto con su respuesta a la tinción de Gram, permitió un acercamiento a la clasificación, en este sentido formas irregulares, bordes ondulares, lobulados y variados tipos de elevaciones se muestran en las figuras 2, 3 y 4.



Figura 2. Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar nutritivo, observación de colonia con forma rizoide, borde rizoide y consistencia dura (2^a). Bacilo largo Gram positivo (2b), magnificación 100x.

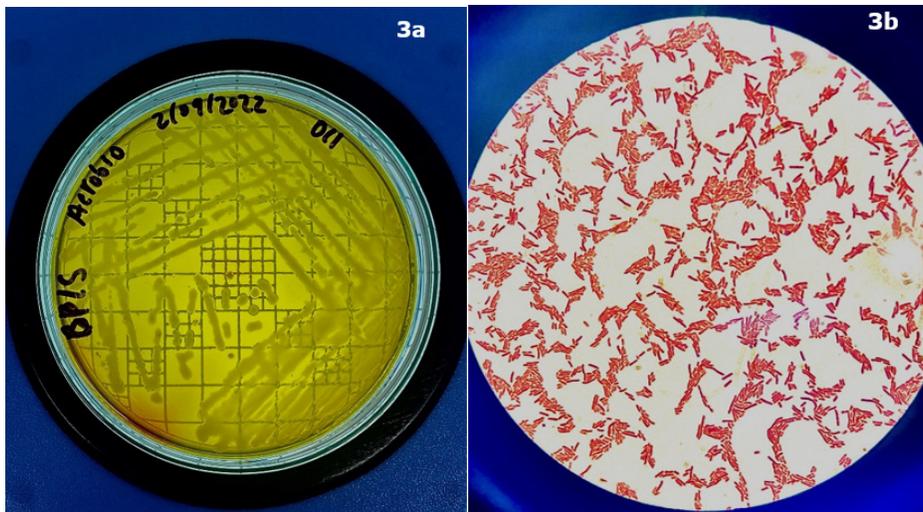


Figura 3. Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar BPLS, observación de colonia con forma irregular, borde ondular y consistencia suave (3a). Bacilos Gram negativos (3b), magnificación 100x.

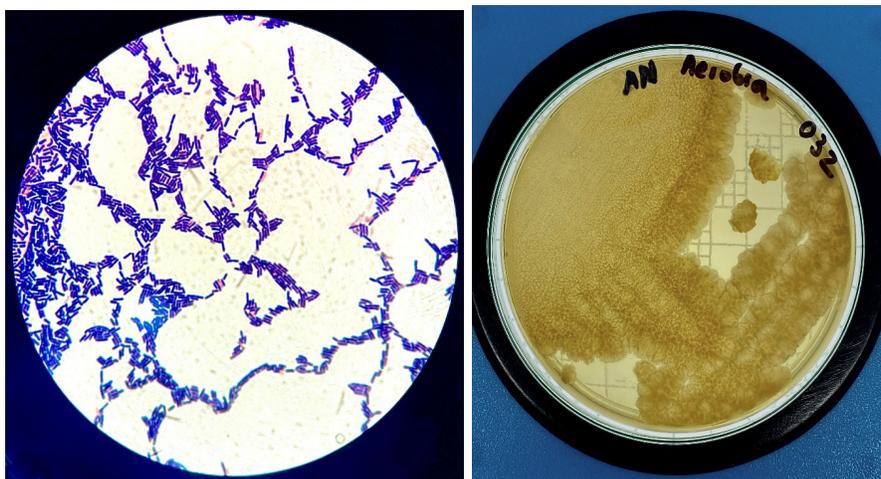


Figura 4. Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar nutritivo, observación de colonia con forma irregular, borde lobulado, elevación umbilicada y consistencia mucoide (4a). Célula bacteriana alargada con forma de bastón Gram positivo (4b), magnificación 100x.

Para los bacilos Gram negativos el sistema API 20E indicó un orden predominante, las Enterobacterales, con cuatro familias diferentes, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Morganellaceae y Yersiniaceae. Los géneros y especies se indican en la tabla 1, con su respectiva codificación con base en los registros del aislamiento.

Se evaluó además en medio selectivos la actividad enzimática para los 6 aislados intestinales

de *P. cochliodon* que dieron coloración Gram positiva (Tabla 2). Se determinó la actividad de las enzimas catalasa, caseinasa, amilasa y lecitinasa, encontrándose que todos los aislados tienen la enzima catalasa y caseinasa, tres de ellos presentan la enzima lecitinasa y cuatro tienen la enzima amilasa, esto se pudo observar en los medios de cultivo específicos y con el reactivo peróxido de hidrogeno (H_2O_2) para determinación de catalasa.

Tabla 1. Cultivos bacterianos seleccionados e identificados con el Sistema API 20E.

Código	Característica de la colonia	Identificación por Gram	Identificación pruebas API
O03	Colonia redonda, elevación convexa, textura lisa brillante y color amarillento.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Erwinia sp</i>
O05	Colonia ovalada de pequeño tamaño, elevación plana, textura lisa brillante y color blanco amarillento.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Pantoea sp</i>
O10	Colonias redondas irregulares, con bordes bien definidos y una textura granulada y gran elevación y color amarillento rosado.	Negativo con forma de bacilo	<i>Providencia alcalifaciens</i>
O11	Color blanco, redondas irregulares, con bordes bien definidos y una textura granulada y gran elevación.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Providencia stuarti</i>
O21	Color blanco, redondas irregulares, con bordes bien definidos y una textura granulada y gran elevación.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Serratia ficaria</i>
O25	Colonias redondas, con bordes definidos y coloración amarilla, naranja y textura lisa.	Negativo con forma de bacilo	<i>Citrobacter koseri</i>

Tabla 2. Características bioquímicas de algunas bacterias del género *Bacillus*.

Código	Característica de la colonia	Identificación por Gram	Identificación pruebas bioquímicas
O04	Colonias opacas y blanquecina, circular con bordes lisos, textura rugosa.	Positivo con forma de bacilo	<i>B.subtilis</i>
O08	Forma de ramificación, color blanco o crema, tienen bordes irregulares y grandes y forma una capa gelatinosa en el medio de cultivo	Positivo con forma de bacilo	<i>B.mycooides</i>
O32	Redonda y compacta, con bordes bien definidos. Colonias lisas y brillantes, con una textura similar a la cera y color blanco o crema.	Positivo con forma de bacilo	<i>B.sphaericus</i>
O33	Colonias redondas, con bordes definidos y coloración blanca o cremosa, textura lisa.	Positivo con forma de bacilo	<i>B.circulans</i>
O13	Redonda con bordes lisos, aspecto opaco, Colonias lisas, color blanco o amarillento.	Positivo con forma de bacilo	<i>B.coagulans</i>
O14	Color blanco y opaco, redondas o ligeramente irregulares, con bordes bien definidos y una textura suave y gran elevación.	Positivo con forma de bacilo	<i>B.thurigiensis</i>

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que los peces son el grupo con mayor diversidad taxonómica y ecológica de los vertebrados, el conocimiento de su microbioma aún está por resolverse (11), probablemente se deba a su alta complejidad, que implica mayores retos en entender no solo su estructura, sino también su función (12). En la actualidad, el desarrollo de técnicas moleculares se emplea con frecuencia en estudios basados en medios de cultivo, estas técnicas han permitido realizar inferencias sobre la función de la microbiota de los peces. (12,13), sin embargo, se debe tener en cuenta la sensibilidad no sólo del microorganismo, sino también de las pruebas a la hora de hacer las descripciones y clasificación de su microbioma (13,14). Para *P. cochliodon* se trata del primer reporte que se hace de cepas nativas cultivables asociadas a su tracto gastrointestinal, entendiéndose que se ha reportado que la captura y el confinamiento de peces silvestres puede influenciar la estructura de la microbiota (14), además de otros aspectos como el medio, la filogenia, la genética del hospedero y las dietas (14,15). De manera general se aprueba que la cantidad de microorganismos bacterianos en el sistema digestivo de los peces puede ser mayor a 10^8 heterótrofos/g y 10^5 anaerobios/g (15,16); en el presente estudio los valores encontrados fueron superiores a 10^5 , indicando una gran cantidad de microorganismos recuperados, es probable que los bacilos esporulados estén presentes en mayor cantidad por su dinámica metabólica, lo cual genera funciones importantes para la hidrólisis de compuestos (16).

Se conoce que los principales grupos de bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal en peces son aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias obligadas (17,18) y, específicamente en peces de agua dulce predominan *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Bacteroides* tipo A, en conjunto con *Plesiomonas*; los grupos menos abundantes son *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Bacteroides* tipo B y *Fusarium* (18,19). En el presente estudio se encontró poblaciones del orden *Enterobacterales*, cuyas características están asociadas a procesos fermentativos de glucosa y otros carbohidratos (20), aunque también se asocian a enfermedades por su carácter oportunista (20,21); similares hallazgos se han reportado para la especie *Piaractus brachypomus* (21) y para otras especies de agua dulce pero con métodos moleculares para este mismo phylum, los cuales incluyen algunos géneros reportados en el

presente estudio: *Oncorhynchus mykiss* (22), *Megalogramma amblycephala*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Carassius auratus*, *Ciprinus carpio*, *Hypophthalmichthys nobilis* y *H. molitrix* (22), *Oreochromis niloticus* (22), *Ictalurus punctatus* (22) y *Danio rerio* (23). Comprendiendo el origen de las capturas, se espera que influencias de origen antrópico y del medio puedan determinar la presencia de estos grupos en *P. cochliodon*, como se ha demostrado en otros estudios (23); por otro lado el hábito alimenticio particular de *P. cochliodon*, podría brindar información sobre la presencia de este tipo de microorganismos y su importancia en la transformación de materia vegetal para la obtención de energía, al respecto se han elucidado mecanismos por los cuales muchos comedores de madera como *Panaque nigrolineatus* e *Hypostomus pyrineusi* usan el biofilm que está asociado a la madera, como fuente de microorganismos con actividad celulolítica, siendo parte de la dieta detritívora o xilívora natural (24) the pH, redox potentials, concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs; por otro lado, trabajos con isótopos han demostrado mayor actividad biotransformadora de los organismos asociados al biofilm que de los microorganismos endosimbióticos (24), lo que ha sido corroborado para otros comedores de madera de los géneros *Panaqolus* y *Panaque*, sugiriendo un mayor rol del microbioma del ambiente (madera y biofilm), que del microbioma intestinal (24,25), incluyendo otros peces con hábitos alimenticios diferentes (25).

Otro phylum de importancia en peces es Firmicutes, que en conjunto con Proteobacteria y Bacteroidetes, representan más del 90% de su microbiota intestinal (25) En *P. cochliodon* también se encontró Firmicutes, similares hallazgos se reportaron para otros peces en el mismo ambiente pero con diferentes hábitos alimenticios (25,26). Dentro de Firmicutes se encuentra el género *Bacillus*, el cual es Gram-positivo, catalasa positivo, forma endosporas, es aeróbico o anaerobio facultativo y de alta ubiquidad en la naturaleza (26), incluyendo ambientes acuáticos (26) y, por su puesto del tracto gastrointestinal de peces (27). El género *Bacillus* presenta algunas especies con características especiales y de interés para la bio-industria, entre ellas la producción de una variedad de enzimas tales como amilasas, lipasas, proteinasas, celulasas, xilanasas y fitasas, entre otras (27), producción de fungistáticos y bacteriocinas (27); en *P. cochliodon* se encontraron las especies:

B. subtilis, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. thurigiensis*, *B. mycooides* y *B. circulans*.

B. subtilis se ha reportado para las especies *Mylopharyngodon piceus*, *Carassius gibelio* y *Megalobrama amblycephala* (28), con elevada actividad microbiana contra *Edwardsiella ictaluri* y *Areomonas hydrophila*, aislada de *Ictalurus punctatus* (29), esta especie también se ha reportado para *Salmo salar* (30) y para algunos representantes de las familias Cyprinidae y Cichlidae (31); además se ha demostrado actividad celulolítica de aislados de intestino de peces del río Amazonas (*Piaractus brachipomus* y *Leporinus friderici*) (32). *B.coagulans*, se ha reportado para *Catla catla*, *Labeo rohita* y *Cirrinhus mrigala*, indicando actividad de las enzimas amilasa, proteasa y celulasa (32). A su vez, se ha descubierto *B. circulans*, en el intestino de *Cyprinus carpio* y *Oreochromis mossambicus* con elevada actividad celulolítica (33), también para la especie *Ctenopharyngodon Idella*, con la misma actividad enzimática (33). En la especie *Salmo salar*, se reporta *B. thurigiensis*, indicando un amplio espectro de actividad enzimática (34).

Por otro lado, la capacidad de producir esporas hace que las especies de *Bacillus* puedan ocupar varios hábitats ofreciendo características importantes en bio-remediación de aguas residuales industriales (35,36), en el cuidado de la calidad del agua en acuicultura (37), en una acuicultura sustentable (37) y de amplio uso como probióticos en diferentes modelos animales (37,38). En peces su aplicación tiene implicaciones directas en mejorar el crecimiento y la conversión alimenticia (38), la resistencia al

estrés (38), la inmunoestimulación y resistencia a enfermedades (39) y de manera general en su bienestar (39).

Como conclusión, Se logró identificar microorganismos cultivables predominantes en *Panaque cochliodon* de gran relevancia para la acuicultura que pertenecen al phylum Proteobacteria, con la clase Gammaproteobacteria, las familias Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Morganellaceae y Yersiniaceae y, las especies: *Pantoea spp*, *Erwinia spp*, *Providencia stuarti*, *Providencia alcalifaciens*, *Serratia ficaria*, *Citrobacter koseri* y el phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae y las especies: *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thurigiensis*, *B. mycooides*, *B. coagulans* y *B. circulans*

Conflicto de intereses

Todos los autores del presente trabajo no tienen conflictos de interés

Agradecimientos

Al apoyo brindado por la Dirección de Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista.

Financiación

La investigación fue financiada en su totalidad por la convocatoria interna de investigación de la Corporación Universitaria Lasallista de diciembre de 2022 a ejecutarse en 2023.

REFERENCIAS

1. Mojica JI, Usma JS, Álva8rez-León R, Lasso CA. Libro rojo de peces dulceacuicolas de Colombia 2012. Bogotá, D.C. Colombia; 2012. <http://hdl.handle.net/20.500.11761/34197>
2. McCauley M, German DP, Lujan NK, Jackson CR. Gut microbiomes of sympatric Amazonian wood-eating catfishes (Loricariidae) reflect host identity and little role in wood digestion. *Ecol Evol.* 2020; 10(14):7117-7128. <https://doi.org/10.1002/ece3.6413>
3. McDonald RC, Watts JEM, Schreier HJ. Effect of Diet on the Enteric Microbiome of the Wood-Eating Catfish *Panaque nigrolineatus*. *Front* 2019; 10:2687. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02687>
4. Vadstein O, Bergh Ø, Gatesoupe FJ, Galindo-Villegas J, Mulero V, Picchiatti S, et al. Microbiology and immunology of fish larvae. *Rev Aquac.* 2013; 5(s1):S1-S25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x>

5. Borges N, Keller-Costa T, Sanches-Fernandes GMM, Louvado A, Gomes NCM, Costa R. Bacteriome Structure, Function, and Probiotics in Fish Larviculture: The Good, the Bad, and the Gaps. *Annu Rev Anim Biosci*. 2021; 9:423-452. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-062920-113114>
6. Anee IJ, Alam S, Begum RA, Shahjahan RM, Khandaker AM. The role of probiotics on animal health and nutrition. *J Basic Appl Zool*. 2021; 82(1):52. <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00250-x>
7. McDonald R, Zhang F, Watts JEM, Schreier HJ. Nitrogenase diversity and activity in the gastrointestinal tract of the wood-eating catfish *Panaque nigrolineatus*. *ISME J*. 2015; 9(12):2712-2724. <https://doi.org/10.1038/ismej.12015.65>
8. Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann P. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.. 5 Ed. Vol. New York: Springer-Verlag New York; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
9. Puello-Caballero LP, Montoya-Campuzano OI, Castañeda-Monsalve VA, Moreno-Murillo LM. Caracterización de la microbiota presente en el intestino de *Piaractus brachyomus* (Cachamablanca). *Rev Salud Anim*,. 2018; 40(2):1-12. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2018000200002&lng=es&nrm=iso
10. Gutiérrez-Ramírez LA, David-Ruales CA, Montoya-Campuzano OI, González-Betancur EM. Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). *Rev Salud Anim*. 2016; 38(2):112-119. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2016000200007
11. Clements KD, Angert ER, Montgomery WL, Choat JH. Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Mol Ecol*. 2014; 23(8):1891-1898. <https://doi.org/10.1111/mec.12699>
12. Wang AR, Ran C, Ringø E, Zhou ZG. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev Aquac*. 2018; 10(3):626-640. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
13. Mouchet MA, Bouvier C, Bouvier T, Troussellier M, Escalas A, Mouillot D. Genetic difference but functional similarity among fish gut bacterial communities through molecular and biochemical fingerprints. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012; 79(3):568-580. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01241.x>
14. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res*. 2013; 69(1):52-60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
15. Talwar C, Nagar S, Lal R NR. Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. *Indian J Microbiol*. 2018; 58(4):397-414. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0760>
16. Navarrete P, Espejo RT, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microb Ecol*. 2009; 57(3):550-561. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9448-x>
17. Llewellyn M.S., Boutin S., Hoseinifar S.H. DN. Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front*. 2014; 5:1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>
18. Türe M, Cebeci A ÖT. The first outbreak of citrobacteriosis caused by *Citrobacter gillenii* in reared Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in Türkiye. *Vet Res Forum*. 2022; 13(3):323-329. <https://doi.org/10.30466/vrf.2021.137808.3076>
19. Michl SC, Ratten JM, Beyer M, Hasler M, LaRoche J, Schulz C. The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PLOS ONE*. 2017; 12(5):e0177735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177735>
20. Liu H, Guo X, Gooneratne R, Lai R, Zeng C, Zhan F, et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Sci Rep*. 2016; 6(1):24340. <https://doi.org/10.1038/srep24340>

21. Zhai Q, Yu L, Li T, Zhu J, Zhang C, Zhao J, Zhang H CW. Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie Leeuwenhoek*. 2017;110(4):501-513. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0819-x>
22. Bledsoe JW, Peterson BC, Swanson KS, Small BC. Ontogenetic characterization of the intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals insights on temporal shifts and the influence of environmental microbes. *PLoS ONE*. 2016; 11(11):1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166379>
23. Green GBH, Williams MB, Chehade SB, Flowers JT, Morrow CD, Lawrence AL, et al. Body Metrics and the Gut Microbiome in Response to Macronutrient Limitation in the Zebrafish *Danio rerio*. *Curr Dev Nutr*. 2023; 7(4):100065. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2023.100065>
24. Lujan NK, German DP, Winemiller KO. Do wood-grazing fishes partition their niche?: morphological and isotopic evidence for trophic segregation in Neotropical Loricariidae. *Funct Ecol*. 2011; 25(6):1327-1338. <http://www.jstor.org/stable/41319630>
25. Kim PS, Shin NR, Lee JB, Kim MS, Whon TW, Hyun DW, et al. Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*. 2021; 9(1):166. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01113-x>
26. Soltani M, Ghosh K, Hoseinifar SH, Kumar V, Lymbery AJ, Roy S, et al. Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Rev Fish Sci Aquac*. 2019; 27(3):331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
27. Ray AK, Ghosh K, Ringø E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut. *Aquac Nutr*. 2012; 18(5):465-492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
28. He S, Wu Z, Liu Y, Wu N, Tao Y, Xu L, et al. Effects of dietary 60 g kg⁻¹ dried distiller's grains in least-cost practical diets on production and gut allochthonous bacterial composition of cage-cultured fish: comparison among fish species with different natural food habits. *Aquac Nutr* 2013; 19(5):765-772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/anu.12023>
29. Ran C, Carrias A, Williams MA, Capps N, Dan BC, Newton JC, et al. Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371>
30. Green TJ, Smullen R, Barnes AC. Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. *Vet Microbiol*. 2013; 166(1-2):286-292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.05.009>
31. Talukdar S, Ringø EGK. Extracellular tannase-producing bacteria detected in the digestive tracts of freshwater fishes (*Actinopterygii*: *Cyprinidae* and *Cichlidae*). *Acta Ichthyol Piscat*. 2016; 46(3):201-210. <https://doi.org/10.3750/AIP2016.46.3.04>
32. Peixoto SB, Cladera-Olivera F, Daroit DJ, Brandelli A. Cellulase-producing *Bacillus* strains isolated from the intestine of Amazon basin fish. *Aquac Res*. 2011; 42(6):887-891. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02727.x>
33. Ray AK, Bairagi A, Sarkar Ghosh K, Sen SK. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyol Piscat*. 2007; 37(1):47-53. <https://doi.org/10.3750/AIP2007.37.1.07>
34. Askarian F, Zhou Z, Olsen RE, Sperstad S, Ringø E. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*. 2012; 326-329:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.016>

35. Deng Z, Jiang Y, Chen K, Gao F, Liu X. Petroleum Depletion Property and Microbial Community Shift After Bioremediation Using *Bacillus halotolerans* T-04 and *Bacillus cereus* 1-1. *Front Microbiol.* 2020; 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00353>
36. Wróbel M, Śliwakowski W, Kowalczyk P, Kramkowski K, Dobrzyński J. *Bioremediation of Heavy Metals by the Genus Bacillus.* *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2023; 20(6):4964 <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>
37. Hlordzi V, Kuebutornye FKA, Afriyie G, Abarike ED, Lu Y, Chi S, et al. The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports.* 2020; 18:100503. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503>
38. Kamilya D, Devi WM. *Bacillus Probiotics and Bioremediation: An Aquaculture Perspective* BT - *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting.* En: Islam MT, Rahman M, Pandey P (eds.) Cham: Springer Int Publ; 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_15
39. González-Díaz, Rosa Leonor, Mercado-Silva, Norman, Reynaga-Delgado, Martínez-Rivera. et al. LM. Bacterial microbiota from wild freshwater fish utilized for subsistence in western Mexico. *Rev Int Contam Ambient.* 2020; 36(1):215-222. <https://doi.org/https://doi.org/10.20937/rica.2020.36.53432>