

Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces

Omic molecular characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain isolated from the paiche *Arapaima gigas* microbiota with antagonistic activity against fish pathogenic bacteria

Manuel Feria^{1,5}, Arnaldo Castañeda¹, Odalis Toledo¹, Deysy Castillo³
Mario Cueva³, Virna Cedeño^{2,4}

RESUMEN

Se analizaron las características de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada del intestino de *Arapaima gigas*, seleccionada por su capacidad para generar inhibición de múltiples bacterias patógenas de peces, mediante el uso de herramientas moleculares como PCR y espectrometría de masas - MALDI TOF/TOF. Los resultados mostraron a través de PCR que esta cepa cuenta con genes claves para la generación de péptidos antimicrobianos como *bmyB* (bacillomycin L synthetase B), *fenD* (fengycin sintetasa), *srfAA* (subunidad 1 surfactin sintetasa), *bacA* (proteína de biosíntesis de bacilysin) e *iturin* (iturin A). Además, mediante el análisis por espectrometría de masas se detectaron bacteriocinas (plipastatin, gramicidin, fengycin, surfactin), proteínas de fijación al intestino (like-enolase), proteínas transportadoras de péptidos antimicrobianos (ABC-transporters) y proteínas de estimulación del sistema inmunitario como flagelin. También se detectaron proteínas tipo colagenasas, chitinasas y xilosa-isomerasas que contribuyen con el proceso de digestión y asimilación. Todos estos resultados permiten considerar los múltiples beneficios de esta cepa para ser utilizada como probiótico en el cultivo de peces.

Palabras clave: *Bacillus amyloliquefaciens*; MALDI TOF; probióticos; *Arapaima gigas*

¹ Universidad Nacional de Tumbes, Perú

² Instituto de Investigación Inca Biotec S.A.C, Tumbes, Perú

³ Cooperativa de Trabajadores BioteCoop, Tumbes, Perú

⁴ Concepto Azul, Guayaquil, Ecuador

⁵ E-mail: manuelezevallos@gmail.com

Recibido: 6 de noviembre de 2018

Aceptado para publicación: 2 de mayo de 2019

ABSTRACT

The characteristics of a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the intestine of *Arapaima gigas*, selected for its ability to generate inhibition of multiple pathogenic bacteria of fishes were analyzed by using molecular tools such as PCR and mass spectrometry - MALDI TOF / TOFM. The results showed through PCR that this strain has key genes for the generation of antimicrobial peptides such as *bmyB* (bacillomycin L synthetase B), *fenD* (fengycin synthetase), *srfAA* (subunit 1 surfactin synthetase), *bacA* (bacilysin biosynthesis protein) and *iturin* (iturin A). In addition, by mass spectrometry analysis were detected bacteriocins (plipastatin, gramicidin, fengycin, surfactin), intestine binding proteins (like-enolase), antimicrobial peptide transport proteins (ABC-transporters) and immune system stimulation proteins like flagelin. Collagenase, chitinases and xylose-isomerases proteins were also detected that contribute to the digestion and assimilation process. All these results allow to consider the multiple benefits of this strain to be used as a probiotic in fish culture.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; MALDI TOF; probiotic; *Arapaima gigas*

INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha convertido en una de las principales actividades productivas a nivel mundial, incluso superando por primera vez en 2014 la contribución de la pesca extractiva para el consumo humano (FAO, 2016). La presión de la demanda obliga a aumentar las densidades de los cultivos, lo que lleva a generar enormes riesgos, en lo que se refiere a la calidad del agua y al manejo del estrés animal. Estas condiciones pueden desencadenar brotes infecciosos que comprometen los niveles productivos (Telli *et al.*, 2014; Banerjee y Ray, 2017).

Las enfermedades causadas por bacterias son las más comunes en el cultivo de peces de agua dulce (Mukherjee y Ghosh, 2016). Convencionalmente, el uso de los antibióticos se elige para controlar las enfermedades que atacan los cultivos, pero esta estrategia se encuentra cuestionada porque se considera una fuente de contaminación ambiental (Ayandiran *et al.*, 2014), afecta a los microorganismos beneficiosos y genera un desequilibrio en el tracto gastrointestinal

de los peces (Kesarcode-Watson *et al.*, 2008). Además, su uso no controlado genera bacterias resistentes a los antibióticos, pudiendo convertirse en un riesgo para la salud pública (Banerjee y Ray, 2017).

Estratégicamente, se propone el uso de probióticos, que se definen como organismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped (Araya *et al.*, 2002). Estos microorganismos tienen múltiples ventajas para el animal, como promover el crecimiento (Midhun *et al.*, 2017), mejorar la respuesta inmune, aumentar la actividad digestiva (Nayak, 2010), modular la colonización microbiana, controlar enfermedades y mejorar la calidad del agua (Chi *et al.*, 2014).

Entre los géneros bacterianos con mayor atención para la investigación y desarrollo de probióticos, se encuentran especies del género *Bacillus* (Silva *et al.*, 2015). Entre ellas, la especie *Bacillus amyloliquefaciens* es un antagonista de amplio espectro (Kaewklom *et al.*, 2013) y tiene la capacidad de producir enzimas con actividad digestiva (Wang *et al.*, 2008).

Actualmente, a través del uso de herramientas genómicas y enfoques dirigidos al análisis funcional, mediante la caracterización de las proteínas (proteómica, MALDI TOF TOF), se pueden identificar determinadas características que contribuyan a la selección de bacterias para su uso como probióticos en la acuicultura (Lippolis *et al.*, 2011; Vinusha *et al.*, 2018).

El objetivo del presente estudio fue conocer las características funcionales de mayor relevancia en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada a partir del tracto digestivo de paiche *Arapaima gigas*, mediante el uso de herramientas como la espectrometría de masas (shotgun MALDI TOF TOF) para conocer las principales proteínas producidas por esta cepa. Además, a través de técnicas como PCR, determinar la presencia de genes clave para la biosíntesis de péptidos antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa Bacteriana y Condiciones de Cultivo

Bacillus amyloliquefaciens 11CI-2 fue aislada del intestino de *Arapaima gigas* «paiche» en un estudio previo (Castillo, 2017). La cepa almacenada en caldo soya tripticaseína (TSB) con 18% de glicerol a -20 °C fue subcultivada en medio sólido agar de soja tríptico (TSA) a 37 °C durante 18 horas, y posteriormente transferida a caldo TSB a 37 °C en tubos de 1.5 ml, para su posterior utilización en los ensayos.

Actividad Antimicrobiana

Bacillus amyloliquefaciens 11CI-2 fue enfrentada a bacterias patógenas de peces tales como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio* sp, *Aeromonas veronii*,

Klebsiella sp, *Citrobacter freundii*. Se realizaron ensayos de enfrentamiento célula vs. célula, con extracto de proteínas del sobrenadante libre de células de un cultivo de la cepa *B. amyloliquefaciens*. Los ensayos fueron realizados mediante el método de difusión en agar modificado de Balcázar *et al.* (2008). El agar se perforó con una pipeta Pasteur estéril, generando un pocillo de 0.6 mm, donde se añadieron 20 µl del cultivo bacteriano o del extracto de proteína del sobrenadante libre de células (dependiendo del ensayo) a las placas previamente inoculadas con las bacterias patógenas. Se determinó la capacidad de inhibición a través de la medición del diámetro de la zona de inhibición. Se consideró como resultado negativo una capacidad de inhibición de 6 mm, como leve de 6 a 11 mm, como moderada entre 11 y 16 mm y como fuerte mayor a 16 mm.

Sensibilidad Antibiótica

La susceptibilidad se evaluó con seis antibióticos comerciales: vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), amikacina (30 µg), amoxicilina + ácido clavulánico (30 µg). El procedimiento fue adaptado de (Ramesh *et al.*, 2014). Para esto, se inoculó la cepa de *B. amyloliquefaciens* 11CI-2 (10⁸ UFC/ml) en medio sólido agar de soja tríptico (TSA) con un asa de Drigalski; posteriormente se colocaron los discos con antibióticos sobre el medio y se incubaron a 37 °C por 24 horas. La zona de inhibición fue registrada en milímetros (mm).

Actividad Proteolítica

Este ensayo se realizó para demostrar la producción de componentes enzimáticos con actividad proteolítica. En agar Skim Milk (10%) se realizaron orificios de 6 mm de diámetro y se inocularon 30 µl de la cepa bacteriana. Se incubó por 24 horas a 37 °C. La actividad proteolítica se vio revelada en la aparición de zonas claras alrededor de la zona de inhibición.

Cuadro 1. Secuencias de cebadores utilizados en los análisis de PCR para la detección de genes claves para la síntesis de bacteriocinas

Nombre	Tamaño esperado	T° hibridación (°C)	Secuencia de cebadores (5'→3')
Surfactin	200 pb	58	SRFA-F: TCG GGA CAG GAA GAC ATC AT SRFA-R: CCA CTC AAA CGG ATA ATC CGT A
Bacylisin	498 pb	58	Bac-F: CAG CTC ATG GGA ATG CTT TT Bac-R: CTC GGT CCT GAA GGG ACA AG
Fengycin	269 pb	58	FengD-F: GGC CCG TTC TCT AAA TCC AT FenD-R: GTC ATG CTG ACG AGA GCA AA
Bacylomycin	370 pb	58	BmyB-F: GAA TCC CGT TGT TCT CCA AA BmyB-R: GCG GGT ATT GAA TGC TTG TT
Iturin	647 pb	55	ITUD1F: GATGCGATCTCCTTGATGT ITUD1R: ATCGTCATGTGCTGCTTGAG

Análisis Genómico

La cepa bacteriana fue cultivada en caldo soya tripticaseína (TSB) durante 24 horas a 30 °C. Posteriormente se hizo la extracción de ADN con el método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) basado en el protocolo de Worden (2009). La amplificación de los genes claves para la biosíntesis de péptidos antimicrobianos (surfactin, bacylisin, bacylomycin, fengycin e iturin A) fue realizada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Para cada reacción se utilizó 2.5 µl de buffer 10X, 1 µl de cloruro de magnesio (MgCl₂) a 50 mM, 0.1 unidad de Taq polimerasa recombinante (Gen-On), 0.5 µl de una mezcla de dNTPs a una concentración de 10 mM, 0.6 µl de cada cebador a 15 pmol, en un volumen final de 25 µl y 100 ng de ADN genómico molde. La detección de los principales genes de biosíntesis de péptidos antimicrobianos fue realizada con iniciadores específicos, los cuales son descritos por Mora *et al.* (2011) y Ramarathnam *et al.* (2007). Las secuencias elegidas correspondieron a *bmyB* (bacillomycin L synthetase B), *fenD* (fengycin sintetasa), *ituA* (iturin A), *srfAA* (subunidad 1 surfactin sintetasa), *bacA*

(proteína de biosíntesis de bacilysin). Las condiciones de ciclos para la amplificación de todos los genes fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de alineamiento por 45 s y 72 °C por 45 s. Un paso de extensión final a 72 °C por 5 min seguido por uno de conservación a 4 °C. La temperatura de alineamiento fue a 58 °C para *bmyB*, *fenD*, *srfAA*, y *bacA*, mientras que para *ituA* fue 55 °C. La amplificación de los genes estudiados se hizo con los cebadores detallados en el Cuadro 1. Los productos obtenidos por PCR fueron secuenciados por la empresa MACROGEN (<https://www.macrogenusa.com>, Rockville, USA) y las secuencias obtenidas fueron alineadas en la base de datos libre NCBI-BLAST.

Extracción de Proteínas Celulares

Las proteínas celulares fueron obtenidas siguiendo las indicaciones de Sharifuzaman *et al.* (2011) con algunas modificaciones. El cultivo bacteriano se realizó añadiendo 150 µl de un precultivo de 18 horas a 37 °C de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* 11CI-2 en un matraz de 50 ml que contenía 15 ml de caldo TSB y se incubó a 37 °C a 4 g

y fue cosechado cuando alcanzó su fase de crecimiento exponencial en O.D 600 de 1.0. El componente celular fue recuperado mediante centrifugación a 1792 g a 4 °C por 20 min. La extracción de proteínas se realizó con el Kit QIAGEN, 2011, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Extracción de Proteínas Extracelulares

Siguiendo el método de Sharifuzzaman *et al.* (2011) y Shankar *et al.* (2012) modificado, se extrajeron las proteínas presentes en el sobrenadante de un cultivo de 24 h a 4 g y 37 °C de la cepa de *B. amyloliquefaciens* 11CI-2 en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de caldo TSB. Los sobrenadantes se separaron de los sedimentos bacterianos mediante centrifugación (1792 g, 15 min, 4 °C) y pasaje a través de un filtro Milipor de 0.22 μ m. Las proteínas de la fracción libre de células se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA) al 100%, helado (concentración final 10% w/v) y fenil metilsulfonil fluoruro (PMSF), un inhibidor de proteasa a una concentración final de 1 mM. La precipitación se realizó durante la noche a 4 °C. Los sedimentos de proteína se suspendieron y se lavaron dos veces mediante centrifugación metanol y fueron secados al ambiente. Finalmente, el sedimento se resuspende en agua de grado HPLC con TFA al 0.1% y se almacena a -20 °C para su posterior uso.

Separación por SDS PAGE y Digestión Enzimática Directa

Las muestras de proteínas, tanto celulares como extracelulares, fueron sometidas a dos procesos. En uno se realizó la separación de las proteínas totales mediante un gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) al 15% con un campo eléctrico de 90 V por 2-3 horas. Las bandas seleccionadas se cortan manualmente con ayuda de un bisturí estéril, y son sometidas al tratamiento de tripsinización, siguiendo el protocolo de Shevchenko *et al.* (2007). Por otro lado, los extractos totales de las proteínas celulares y extracelulares fue-

ron además digeridos de manera directa mediante un tratamiento con tripsina, siguiendo el protocolo de Schmidt *et al.* (2009).

Procesamiento y Análisis de Datos

El análisis de proteínas se obtuvo a partir de un sistema analizador proteómico MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System). Los espectros fueron captados en modo MS Reflector Positivo con un láser de Nd: YAD de 349 nm de longitud de onda, con una intensidad de laser de 2800 y una velocidad de 600 μ m/segundo y 750 disparos. Para el análisis de doble tiempo de vuelo (TOF/TOF), los precursores fueron acelerados a 8 kV y se seleccionaron en la puerta de entrada de iones. Todos los fragmentos peptídicos generados por la colisión de los precursores en la cámara de disociación inducida (CID) se aceleraron a 15 kV en la fuente 2 y las masas se analizaron después de pasar por el reflector de iones.

El análisis de los datos se realizó de manera automática por el programa 4000 Series Explorer v. 3.5.3 (Applied Biosystem). Todos los datos obtenidos por MS/MS fueron procesados y analizados por el software ProteinPilot™ 4.5, basado en el algoritmo Paragon™ 4.5.0.0 (Matrix Science, Boston, MA), usando el GPS Explorer software v. 3.6, que permite la búsqueda no redundante de proteínas. Para los análisis se consideró las condiciones de alquilación con iodoacetamida y digestión con tripsina. Las bases de datos asociadas al género *Bacillus* fueron descargadas de los repositorios virtuales libres como UniProt (<http://www.uniprot.org/>) y de la base virtual del Centro Nacional de Información Biotecnológica-NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)

RESULTADOS

Actividad Antimicrobiana

La cepa *B. amyloliquefaciens* demostró tener capacidad de inhibir la mayoría bacterias patógenas de peces seleccionadas de

Cuadro 2. Antagonismo extracto libre de células (LC) y antagonismo célula vs. célula (CC) de *Bacillus amilolyquefaciens*

Bacteria patógena	Antagonismo	Inhibición
<i>Aeromonas hydrophila</i>	LC	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LC	+++
<i>Pseudomonas putida</i>	CC	---
<i>Plesiomona shigelloides</i>	CC	+++
<i>Vibrio</i> sp	CC	+++
<i>Klebsiella</i> sp	CC	+++
<i>Aeromonas veronii</i>	CC	+++
<i>Staphylococcus epidermis</i>	CC	+++
<i>Citrobacter freundii</i>	CC	+++

Los signos positivos significan antagonismo entre la cepa probada y las patógenas. (-) no hubo inhibición; (+) inhibición de 4-6 mm; (++) inhibición de 6-8 y (+++) inhibición >8 mm

estudios anteriores y que pertenecen al cepario de bacterias de IncaBiotec S.A.C. La cepa solo no mostró inhibición contra *Pseudomonas putida* (Cuadro 2.)

Sensibilidad Antibiótica y Actividad Proteolítica

La cepa fue susceptible a todos los antibióticos contra los que fue evaluada. Los antibióticos con mayor inhibición fueron eritromicina y vancomicina (Cuadro 3). Por otro lado, la cepa *B. amylolyquefaciens* 11CI-2 mostró una fuerte capacidad proteolítica, mostrada en los halos claros formados en el medio sólido alrededor del pocillo donde fue inoculada la cepa (19 mm).

Identificación de Genes de Biosíntesis

Se obtuvieron cinco productos correspondientes a los tamaños de *ituA* (647 bp), *bacA* (498 bp), *bmyB* (370 bp), *fenD* (269 bp), *srfAA* (200 pb) (Figura 1). Las secuencias analizadas por BLAST obtuvieron más

Cuadro 3. Perfil de susceptibilidad antibiótica de la cepa *Bacillus amylolyquefaciens* 11CI-2

Antibiótico	<i>Bacillus amylolyquefaciens</i>	Inhibición (mm)
Vancomicina	Sensible	32
Gentamicina	Sensible	19
Amikacina	Sensible	16
Eritromicina	Sensible	34
Cloranfenicol	Sensible	16
Amoxicilina + Ac. clavulánico	Sensible	19

del 90% de cobertura e identidad en la búsqueda de homología con sus respectivos genes de biosíntesis; por lo que se determinó la presencia de genes clave para la producción de péptidos antimicrobianos como iturin A (código accesoión GenBank KP967589.1), bacillomicina L sintetasa B (*bmyB*) (código

Cuadro 4. Secuencias de proteínas identificadas por MALDI TOF TOF del proteoma de *Bacillus amyloliquefaciens* (Parte I)

Prec m/z	Mejor Secuencia	Proteína	Especie	Identificación Base Datos	Identidad %	Accesión
1782.749	AGGAYLPLDAELPPE R	Plipastatin synthase subunit E	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	UniProtKB	100	O31827
1319.642	ESYLEDIDISR	Plipastatin synthase subunit B	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	UniProtKB	100	P39846
1319.624	RVFAGGEPLAPR	Plipastatin synthase subunit C	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	UniProtKB	100	P39847
1672.729	AGGVYIPIDSHYPKA R	Plipastatin synthase subunit A	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	UniProtKB	100	P39845
1945.866	RDTFPLDPGEGSVYF R	Putative thiazole-containing bacteriocin maturation protein	<i>Brevibacillus</i> sp. OK042	Protein Blast	100	SFK75381.1
2965.342	IYDAILPFADMIIVNM PLWTGNEGVGGR	Bacteriocin biosynthesis protein SasD	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	UniProtKB	100	A0A0D7XMD5
1297.672	SHALNHERR	Bacteriocin-associated integral membrane family protein	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. niger	UniProtKB	100	A0A080UML1
1319.642	TDSEVAVEEISR	Bacteriocin maturation protein	<i>Bacillus</i> sp. SA1-12	UniProtKB	100	A0A0M2P818
1741.918	QNPDRNEQLETLKR	MULTISPECIES: polyketide synthase	<i>Bacillus</i> sp.	Protein Blast	100	WP_007409377.1
2919.348	SGDIKIAVVGVSML NTDAHRMFQER	Polyketide synthase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	WP_047474891.1
2919.428	QPENIQTAVEELLRY TSPVIMMANR	Bacillaene polyketide synthase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	AQT19725.1
1321.627	FKLVNSTSQAAR	MULTISPECIES: bacilysin biosynthesis protein BacA	<i>Bacillus</i> sp.	Protein Blast	100	WP_009968341.1
967.4294	APGEQMYR	Gramicidin S synthase 2	<i>Bacillus brevis</i>	UniProtKB	100	P0C064
1945.87	IEPKEVEVILANHPA VR	Bacillomycin D synthetase B	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	AFG19378.1
2578.28	GWFTSLYPVSLQIKA DQDIPQR	Bacillomycin D synthetase C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	AFG19377.1
1438.72	EHLQTHMTMPVR	Bacillomycin D	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	UniProtKB	100	A0A0S1TKG6
1744.81	GRNEQVMKDFVRR	surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	WP_014416876.1
2518.21	QVHHLVESLQQTYYQ SGSQTLR	MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA	<i>Bacillus</i> sp.	Protein Blast	100	WP_010886402.1
3078.41	TEGKQADQGPVEGE AALTPIQRWFFER	surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAB	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	WP_113629788.1
2293.02	PQVQSFEGDRVSAK LPKMLR	MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	WP_108702388.1
1297.67	AYYPTSPAQQR	iturin synthetase A	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i>	Protein Blast	100	API81806.1
1741.87	QLARIWEELFGLER	iturin synthetase A	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i>	Protein Blast	100	API81806.1
2578.279	EDLTHLDEAEQSAY LQRFKER	FenE (Fengycin)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	UniProtKB	100	A0A1J0F5X2
1438.717	AGLFINTVPVRVR	Fengycin family lipopeptide synthetase B	<i>Bacillus</i> sp. RUPDJ	UniProtKB	100	A0A1N7HNM9
1438.677	AGGAYLPIGDDVPR	Fengycin synthetase C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>Bacillus velezensis</i>)	UniProtKB	100	H9TE68
1898.871	IEPAEIEARLTEIDGIR	Nonribosomal Fengycin synthesis	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3	Protein Blast	100	AEB63566.1
1945.866	ALPEPDFASKQTYIPPR	Fengycin synthetase	<i>Bacillus</i> sp. GY19	UniProtKB	100	A0A0A7ACZ3
1581.81	DILAIKHYLASYSR	Fengycin family lipopeptide synthetase D	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	SIQ37361.1
1321.627	DLYPLSFAQKR	Fengycin synthetase B	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	AFG19384.1
1976.03	KKGVMRQEPVAIMMER	Fengycin synthetase FenA	<i>Bacillus subtilis</i>	Protein Blast	100	AAB80955.2

Cuadro 5. Secuencias de proteínas identificadas por MALDI TOF TOF del proteoma de *Bacillus amyloliquefaciens* (Parte II)

Prec m/z	Mejor Secuencia	Proteína	Especie	Identificación Base Datos	Identidad %	Accesión
3412.489	SMAICPNTELANEYGP PTENSVATTAMRHM ER	Fengycin synthetase FenA	<i>Bacillus subtilis</i>	Protein Blast	100	AAB80955.2
2139	LNGACLHVVDKSTM LAPER	Nonribosomal fengycin synthesis	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3	Protein Blast	100	AEB63566.1
2087.057	IQTHLLTIVENAVRN PDR	Fengycin synthetase A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Protein Blast	100	AFG19385.1
1960.875	LRNGRVMLYLGNV GSTR	Subtilin biosynthesis protein SpaB	<i>Bacillus subtilis</i>	Protein Blast	100	WP_1015014 69.1
1732.725	DREMYIEMCNSDR	MULTISPECIES: subtilin biosynthesis protein SpaB	Bacillales	Protein Blast	100	WP_0141151 84.1
1911.843	GNPTVEVEVYTESG AFGR	Enolase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	UniProtKB	100	A0A0D7X9E 7
2322.969	HVSVDTSYKAYTAY EALANR	MULTISPECIES: S- layer protein	<i>Bacillus</i> spp	Protein Blast	100	WP_1139366 35.1
2965.342	FIHTCYGELEKTPQEI ESRLMEVR	nitric oxide synthase	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	Protein Blast	100	WP_0557459 04.1
2992.11	NNILSQASQAMLAQ ANQQPONVQLLR	flagellin	<i>Bacillus safensis</i>	Protein Blast	100	KDE27418.1
2167.02	MKQDQQILEWRMEE FR	flagellar capping protein	<i>Bacillus</i> sp	UniProtKB	100	W4Q3L3
2518.214	GANPNLQSPQDGET YVLLMKELR	Chitinase A,	<i>Bacillus velezensis</i>	Protein Blast	100	APM87875.1
1319.642	FGGLDQQTANR	Chitin-binding protein	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Protein Blast	100	WP_0879521 22.1
1638.724	AGGFKTGGINFDK VR	MULTISPECIES: xylose isomerase	<i>Bacillus</i> sp.	Protein Blast	100	OLF95924.1
2139	SAFYLAFYNSELSL NER	Collagenase	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Protein Blast	100	WP_0010364 34.1
2965.258	QLYGYETNNGGIYIE ETGTFFTYER	Collagenase	<i>Bacillus</i> sp.	Protein Blast	100	WP_0081751 06.1
1233.599	TVTAYFVNRYR	Microbial collagenase ColA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	UniProtKB	100	A0A1B1L7Z 0
2919.428	ALEPGNADDVLTIVI YNSPDEYQLNR	Collagenase	<i>Bacillus thuringiensis</i>	UniProtKB	100	C3HA50
2819.154	MNSYYEQKGSTSV EQHDTMKGR	sporulation protein YabP	<i>Bacillus subtilis</i>	Protein Blast	100	WP_0615711 27.1
967.4227	QGRKPGEGR	stage V sporulation protein R	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Protein Blast	100	WP_1029977 33.1
2634.238	GAKPETEHQMMKHL EEIGVEKGR	sporulation protein YqfD	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Protein Blast	100	WP_1062709 68.1
2922.3	LETILANNEQYKQED LDKIFENVR	L-lactate dehydrogenase	<i>Bacillus</i> sp.	Protein Blast	100	WP_1011652 46.1
2138.99	MSMAYDEYMKQMV KPMR	BrxA/BrxB family bacilliredoxin	<i>Bacillus</i> sp. mrc49	Protein Blast	100	WP_1005315 58.1
1408.673	IEAPFFERMIR	bacillithiol biosynthesis cysteine-adding enzyme	<i>Bacillus coagulans</i>	Protein Blast	100	WP_0615748 49.1
2634.42	VMKGPYGTGGDLM VFGAGEINWR	delta-endotoxin	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Protein Blast	100	ADO32760.1
1660.90	FETTDYNVDQTAKK	Pesticidal crystal protein cry4Aa	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Protein Blast	100	WP_0032683 83.1
1319.64	IDTQQWFEP	Cancer cell-killing Cry protein	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Protein Blast	100	WP_0032960 35.1

accesión GenBank KY111359.1), la proteína de biosíntesis de bacilisina (*bacA*) (código accesión GenBank MF098752.1), fengycin sintetasa (*fenD*) (código accesión GenBank KP453873.1) y la subunidad 1 de la surfactin sintetasa (*surfAA*) (código accesión GenBank KY051728.1).

Análisis MALDI TOF-TOF

Mediante espectrometría de masas doble TOF se pudo identificar secuencias de las proteínas claves involucradas en funciones como la biosíntesis de péptidos antimicrobianos no ribosomales del grupo de

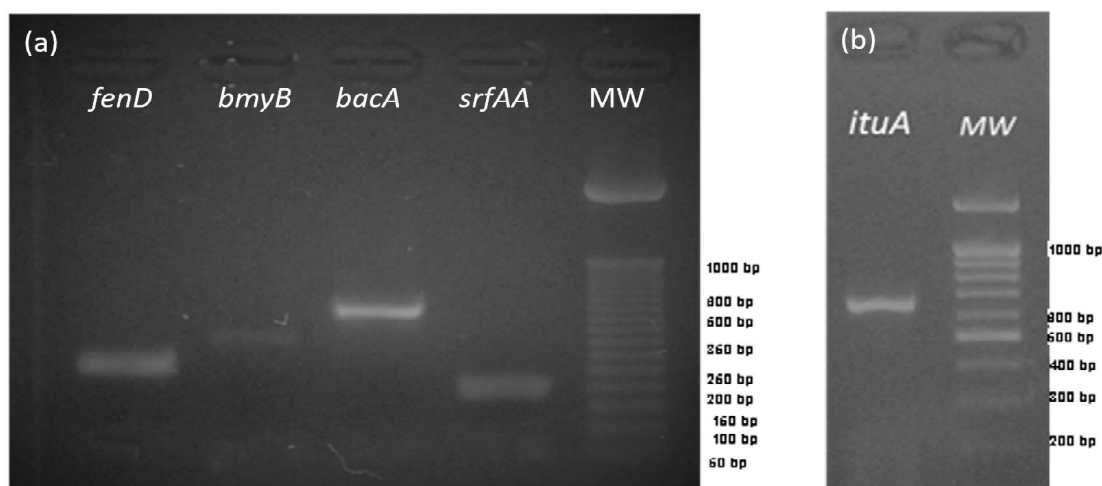


Figura 1. a. El análisis por PCR muestra la amplificación de los principales genes de biosíntesis de bacteriocinas *bacA*, *bmyB*, *fenD*, *srfAA*, MW (marcador de peso molecular). b. Migración de la secuencia correspondiente al gen clave para biosíntesis de *ituA*. Los productos de PCR fueron separados por un gel de 2% de agarosa por 35 min y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta

lipopéptidos antimicrobianos como surfactin, bacillomycin D, fengycin e iturin; del grupo de policétidos antibióticos como bacillaene y el dipeptido antimicrobiano bacylisin; y de bacteriocinas como gramicidin, bacteriocina tipo streptolysin (SagD) y lantibióticos como subtilin (Cuadros 4 y 5). Por otro lado, se encontraron además proteínas relacionadas a otras características como la capacidad de la cepa bacteriana a fijarse en el epitelio intestinal como enolase, y proteína de capa S (S-layer). También se encontraron proteínas relacionadas a la digestión de quitina (chitinasa), colagenasa y del aprovechamiento de azúcares a través de xilosa isomerasa (Cuadros 4 y 5).

La esporulación es un mecanismo clave para que una bacteria sea considerada para su uso en la alimentación animal. Mediante el uso de la espectrometría de masas MALDI TOF TOF se reconocieron proteínas claves para realizar procesos celulares como la proteína de esporulación YqfD, YabP y proteína R del estado V. Además, se pudie-

ron detectar componentes esenciales para el microorganismo y su supervivencia en ambientes ácidos como bacillithiol (cuadros 4 y 5). Así mismo, con esta técnica se pudieron identificar moléculas claves en la estimulación del sistema inmunitario del hospedero como flagellin, así como una sintasa de óxido nítrico, la cual funciona como una principal molécula de respuesta celular y protección de la mucosa intestinal. Además, se identificaron secuencias correspondientes a proteínas cristalinas, clave para la inhibición de insectos patógenos (cuadros 4 y 5).

DISCUSIÓN

Diversas características son tomadas en cuenta para la selección de una cepa como probiótica. Entre estas, la capacidad para generar inhibición contra bacterias patógenas (Thankappan *et al.* 2015; Nandi *et al.*, 2017). El aislado bacteriano identificado como *Bacillus amyloliquefaciens* 11CI-2 fue probado *in vitro* contra bacterias patógenas de

importancia en la piscicultura, como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter freundii* (Eissa *et al.*, 2010; Thanigaivel *et al.*, 2015; Thankappan *et al.*, 2015), demostrando tener capacidad antagónica frente a todas las cepas patógenas.

La sensibilidad frente a antibióticos es una característica resaltante en cepas probióticas, pues evita la posible transferencia de genes de resistencia entre cepas probióticas y patógenas que podrían habitar al hospedero; considerando además a la cadena alimentaria como una vía de transferencia de bacterias patógenas antibióticos resistentes a los humanos (do Vale Pereira *et al.*, 2017). Los resultados demostraron que la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 11CI-2 es susceptible a todos los antibióticos contra la que fue probada, semejante a lo mostrado por Kadaikunnan *et al.* (2015).

Los componentes antimicrobianos producidos por bacterias son abundantes y diversos, y la capacidad de producirlos es considerada una característica principal cuando se trata de selección de bacterias probióticas. Estas bacteriocinas favorecen el establecimiento del probiótico dentro del tracto intestinal, la inhibición de cepas patógenas invasoras y la modulación de la microbiota hospedera. La determinación de los genes claves para la biosíntesis de bacteriocinas como surfactin, fengycin, bacylomycin, bacylisin e iturin A, mediante la prueba de PCR, al igual que en los estudios con *Bacillus* spp de Koumoutsi *et al.* (2004), Ramarathnam *et al.* (2007) y Athukorala *et al.* (2009) permitieron confirmar la presencia de estos genes en la cepa aislada *B. amyloliquefaciens* 11CI-2.

La capacidad de las bacterias para producir enzimas proteolíticas es muy importante desde el punto de vista nutricional. Estas proteasas potencian la digestión, y están involucradas en los mecanismos de defensa contra agentes patógenos (Thankappan *et al.*,

2015); por lo tanto, mediante el crecimiento sobre agar Skim Milk se demostró la capacidad proteolítica de la cepa *B. amyloliquefaciens* 11CI-2 coincidiendo con múltiples antecedentes sobre la evaluación de bacterias del género *Bacillus* (Bairagi *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2013; Nandi *et al.* 2017; Kavitha *et al.*, 2018).

Actualmente, las comunidades bacterianas que componen la microbiota asociada al tracto digestivo de animales y humanos se encuentra bastante estudiada a partir de herramientas de secuenciamiento masivo del ADN (metagenómica); sin embargo, la información obtenida no ayuda a caracterizar la funcionalidad microbiana (Vinusha *et al.*, 2018), la cual podría ser descrita haciendo uso de herramientas de análisis de transcritos o de proteínas; así pues, el análisis proteómico de cepas potencialmente probióticas puede dar información sobre los potenciales beneficios de una cepa de este tipo (Ruíz *et al.*, 2016). En esta investigación, a través del uso de la espectrometría de masas MALDI TOF TOF se identificaron las características de mayor importancia en las cepas potencialmente probióticas a través del análisis de su proteoma celular y extracelular.

Debido a la producción de péptidos con capacidad de inhibir cepas patógenas, diversos trabajos se han centrado en la investigación de cepas de *Bacillus* capaces de sintetizar lipopéptidos antimicrobianos y antivirales como surfactin (Athukorala *et al.*, 2009; Sajitha *et al.*, 2016); iturin y fengycin (Kim *et al.*, 2010), bacillomycin D (Ramarathnam *et al.*, 2007) y el dipéptido bacilysin (Wu *et al.*, 2014). Aparte de estos péptidos identificados por MALDI TOF TOF y PCR, se pudo demostrar la presencia de proteínas claves para la biosíntesis de bacilleane, gramicidín y subtilin, componentes antimicrobianos previamente descritos (Moldenhauer *et al.* 2007; Liou *et al.* 2015; Chen *et al.*, 2018).

Otras moléculas fueron además detectadas mediante espectrometría de masas como las sintasas de óxido nítrico, moléculas clave para la generación de óxido nítrico (NO), el cual está relacionado a la activación del sistema inmunitario a través de la regulación de la comunicación de células de defensa del huésped (Wang *et al.*, 2010). Así mismo, se identificó flagellin, una proteína capaz de incrementar la producción de péptidos defensinas (β -defensin 2) (Schlee *et al.*, 2007).

La capacidad de aprovechar y degradar componentes como la quitina, es una característica muy útil para mejorar el proceso de digestión y asimilación en peces, a través de su microbiota asociada (Dutta *et al.*, 2015). En el presente estudio, se logró identificar mediante proteómica la presencia de enzimas chitinasas de la cepa de *B. amyloliquefaciens* 11 CI-2. Además, se identificaron enzimas colagenasas y xilosa isomerasa, involucradas en la nutrición de los peces (Ray *et al.*, 2012).

Para que una bacteria con características probióticas pueda prosperar en un ambiente difícil como el tracto digestivo, es necesario que resista las condiciones de estrés, y para esto, mecanismos como la esporulación son muy importantes (Elshagabee *et al.*, 2017). En el presente estudio se identificaron proteínas claves para la esporulación como YqfD (Wemhoff y Meinhardt, 2013) y proteínas claves para la biosíntesis de bacillithiol y bacilliredoxin, que sirven como mecanismos de resistencia a estrés ácido (Gaballa *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2011; Chandransu *et al.*, 2017). Por otro lado, la cepa probiótica debe poseer características que le permitan fijarse al tracto digestivo y prosperar, como por ejemplo proteínas de anclaje y comunicación celular (Castaldo *et al.*, 2009), para interactuar con proteínas como la fibronectina de la matriz extracelular y proteínas de capa S (S-layer) (Sánchez *et al.*, 2009). Ambas proteínas pudieron ser identificadas en este estudio a través del análisis por MALDI TOF TOF.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* 11 CI-2 aislada de tracto digestivo de paiche *Arapaima gigas*, ponen en evidencia las buenas características de esta cepa para ser considerada como probiótico para su empleo en la acuicultura de peces.

Agradecimiento

«Círculo de Investigación en biotecnología molecular para el desarrollo y sostenibilidad de los sectores acuícolas del Perú». Código 132-2015.

LITERATURA CITADA

1. **Araya M, Morelli L, Reid G, Sanders ME, Stanton C, Pineiro M, Ben Embarek P. 2002.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada. [Internet]. Available in: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
2. **Athukorala SNP, Fernando WGD, Rashid KY. 2009.** Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Can J Microbiol* 55: 1021-1032. doi: 10.1139/W09-067
3. **Ayandiran TA, Ayandele AA, Dahunsi SO, Ajala OO. 2014.** Microbial assessment and prevalence of antibiotic resistance in polluted Oluwa River, Nigeria. *Egyptian J Aquatic Res* 40: 291-299. doi: 10.1016/j.ejar.2014.09.002
4. **Bairagi A, Ghosh KS, Kumar S, Sen R, Kumar A. 2002.** Enzyme producing bacterial flora isolated from fish. *Aquacult Int* 10: 109-121. doi: 10.1023/A:102135-5406412

5. **Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Muzquiz JL, Girones O. 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.014
6. **Banerjee G, Ray AK. 2017.** The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res Vet Sci* 115: 66-77. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.01.016
7. **Banerjee G, Ray AK, Askarian F, Ringø E. 2013.** Characterisation and identification of enzyme-producing autochthonous bacteria from the gastrointestinal tract of two Indian air-breathing fish. *Benef Microbes* 4: 277-284. doi: 10.3920/BM2012.0051
8. **Castaldo C, Vastano V, Siciliano RA, Candela M, Vici M, Muscariello L, Marasco R, et al. 2009.** Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact* 8: 14. doi: 10.1186/1475-2859-8-14
9. **Castillo D. 2017.** Caracterización molecular de la microbiota intestinal de alevines de paiche *Arapaima gigas* y selección de cepas potencialmente probióticas. Tesis de Maestría. Tumbes, Perú: Univ. Nacional de Tumbes. 38 p.
10. **Chandrangsu P, Loi VV, Antelmann H, Helmann JD. 2017.** The role of bacillithiol in gram-positive firmicutes. *Antioxid Redox Sign* 28: 445-462. doi: 10.1089/ars.2017.7057
11. **Chen L, Gu W, Xu HY, Yang GL, Shan XF, Chen G, Wang CF, Qian AD. 2018.** Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF. *3 Biotech* 8: 114. doi: 10.1007/s13205-018-1125-2
12. **Chi BK, Gronau K, Mäder U, Hessling B, Becher D, Antelmann H. 2011.** S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol Cell Proteomics* 10: M111.009506. doi: 10.1074/mcp.M111.-009506
13. **Chi C, Jiang B, Yu XB, Liu TQ, Xia L, Wang GX. 2014.** Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Shellfish Immun* 36: 9-18. doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.003
14. **do Vale-Pereira G, da Cunha DG, Pedreira-Mourino JL, Rodiles A, Jaramillo-Torres A, Merrifield DL. 2017.** Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria. *J Appl Microbiol* 123: 1298-1311. doi: 10.1111/jam.13572
15. **Dutta D, Banerjee S, Mukherjee A, Ghosh K. 2015.** Selection and probiotic characterization of exoenzyme-producing bacteria isolated from the gut of *Catla catla* (Actinopterygii: Cyprini-formes: Cyprinidae). *Acta Ichthyol Piscat* 45: 373-384. doi: 10.3750/AIP2015.-45.4.05
16. **Eissa NME, El-Ghiet EA, Shaheen AA, Abbass A. 2010.** Characterization of *Pseudomonas* species isolated from tilapia «*Oreochromis niloticus*» in Qaroun and Wadi-El-Rayan lakes, Egypt. *Global Veterinaria* 5: 116-121.
17. **Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. 2017.** *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol* 8: 1490. doi: 10.3389/fmicb.2017.01490
18. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
19. **Silva TA, Petrillo TR, Yunis-Aguinaga J, Marcusso P, Claudiano G, Moraes F, Moraes JR. 2015.** Effects of the

- probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. *Lat Am J Aquat Res* 43: 963-971. doi: 10.3856/vol43-issue5-fulltext-16
20. **Gaballa A, Newton GL, Antelmann H, Parsonage D, Upton H, Rawat M, Claiborne A, et al. 2010.** Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in *Bacilli*. *P Natl Acad Sci Usa* 107: 6482-6486. doi: 10.1073/pnas.1000928107
 21. **Kadaikunnan S, Rejiniemon SS, Khaled JM, Alharbi NS, Mothana R. 2015.** *In-vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Ann Clin Microb Anti* 14: 9. doi: 10.1186/s12941-015-0069-1
 22. **Kaewklom S, Lumlert S, Kraikul W, Aunpad R. 2013.** Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi). *Food Control* 32: 552-557. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.012
 23. **Kavitha M, Raja M, Perumal P. 2018.** Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports* 11: 59-69. doi: 10.1016/j.aqrep.-2018.07.001
 24. **Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008.** Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2007.11.019
 25. **Kim P I, Ryu J, Kim YH, Chi YT. 2010.** Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechn* 20: 138-145. doi: 10.4014/jmb.0905.-05007
 26. **Koumoutsi A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, et al. 2004.** Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J Bacteriol* 186: 1084-1096. doi: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004
 27. **Liou JW, Hung YJ, Yang CH, Chen YC. 2015.** The antimicrobial activity of gramicidin a is associated with hydroxyl radical formation. *Plos One* 10: 5-7. doi: 10.1371/journal.pone.0117065
 28. **Lippolis R, Gnoni A, Abbrescia A, Panelli D, Maiorano S, Paternoster MS, Sardanelli AM, et al. 2011.** Comparative proteomic analysis of four *Bacillus clausii* strains: proteomic expression signature distinguishes protein profile of the strains. *J Proteomics* 74: 2846-2855. doi: 10.1016/j.jpro.2011.-06.032
 29. **Midhun SJ, Neethu S, Vysakh A, Sunil MA, Radhakrishnan EK, Jyothis M. 2017.** Antibacterial activity of autochthonous bacteria isolated from *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) and it's *in vitro* probiotic characterization. *Microb Pathogenesis* 113: 312-320. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.058
 30. **Moldenhauer J, Chen XH, Borriss R, Piel J. 2007.** Biosynthesis of the antibiotic bacillaene, the product of a giant polyketide synthase complex of the trans-AT family. *Angew Chem Int Edit* 46: 8195-8197. doi: 10.1002/anie.20070-3386
 31. **Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. 2011.** Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *Int Microbiol* 14: 213-223. doi: 10.2436/20.1501.01.151
 32. **Mukherjee A, Ghosh K. 2016.** Antagonism against fish pathogens by cellular components and verification of probiotic properties in autochthonous bacteria isolated from the gut of an Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). *Aquac Res* 47: 2243-2255. doi: 10.1111/are.12676

33. **Nandi A, Banerjee G, Dan SK, Ghosh K, Ray AK. 2017.** Probiotic efficiency of *Bacillus* sp in *Labeo rohita* challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. *Aquac Res* 48: 4334-4345. doi: 10.1111/are.13255
34. **Nandi A, Dan SK, Banerjee G, Ghosh P, Ghosh K, Ringø E, Ray AK. 2017.** Probiotic potential of autochthonous bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts. *Probiotics Antimicro* 9: 12-21. doi: 10.1007/s12602-016-9228-8
35. **Nayak SK. 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res* 41: 1553-1573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.-02546.x
36. **Ramarathnam R, Bo S, Chen Y, Fernando WG, Xuewen G, de Kievit T. 2007.** Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp, antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can J Microbiol* 53: 901-911. doi: 10.1139/W07-049
37. **Ramesh D, Vinothkanna A, Rai AK, Vignesh VS. 2014.** Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 45: 268-276. doi: 10.1016/j.fsi.2015.04.018
38. **Ray AK, Ghosh K, Ringø E. 2012.** Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquacult Nutr* 18: 465-492. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.-00943.x
39. **Ruiz L, Hidalgo C, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Sánchez B, Margolles A. 2016.** Tackling probiotic and gut microbiota functionality through proteomics. *J Proteomics* 147: 28-39. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.023
40. **Sajitha KL, Dev SA, Maria Florence EJ. 2016.** Identification and characterization of lipopeptides from *Bacillus subtilis* b1 against sapstain fungus of rubberwood through MALDI-TOF-MS and RT-PCR. *Curr Microbiol* 73: 46-53. doi: 10.1007/s00284-016-1025-9
41. **Sánchez B, Arias S, Chaignepain S, Denayrolles M, Schmitter JM, Bressollier P, Urdaci MC. 2009.** Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology* 155: 1708-1716. doi: 10.1099/mic.0.025288-0
42. **Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. 2007.** Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 75: 2399-2407. doi: 10.1128/IAI.01563-06
43. **Schmidt F, Fiege T, Hustoft HK, Kneist S, Thiede B. 2009.** Shotgun mass mapping of *Lactobacillus* species and subspecies from caries related isolates by MALDI-MS. *Proteomics* 9: 1994-2003. doi: 10.1002/pmic.200701028
44. **Shankar J, Walker RG, Ward D, Horsburgh MJ. 2012.** The *Enterococcus faecalis* exoproteome: identification and temporal regulation by fsr. *Plos One* 7: e33450. doi: 10.1371/journal.pone.0033450
45. **Sharifuzzaman SM, Abbass A, Tinsley JW, Austin B. 2011.** Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immun* 30: 347-353. doi: 10.1016/j.fsi.2010.11.005
46. **Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2007.** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856-2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468
47. **Telli GS, Ranzani-Paiva MJ, Dias Dde C, Sussel FR, Ishikawa CM, Tachibana L. 2014.** Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of

- Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish Shellfish Immun* 39: 305-311. doi: 10.1016/j.fsi.2014.05.025
48. **Thanigaivel S, Vijayakumar S, Gopinath S, Mukherjee A, Chandrasekaran N, Thomas J. 2015.** *In vivo* and *in vitro* antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture* 437: 252-255. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.008
49. **Thankappan B, Ramesh D, Ramkumar S, Natarajaseenivasan K, Anbarasu K. 2015.** Characterization of *Bacillus* spp from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita* - towards to identify novel probiotics against fish pathogens. *Appl Biochem Biotech* 175: 340-353. doi: 10.1007/s12010-014-1270-y
50. **Vinusha KS, Deepika K, Johnson TS, Agrawal GK, Rakwal R. 2018.** Proteomic studies on lactic acid bacteria: a review. *Biochem Biophysics Reports* 14: 140-148. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.04.009
51. **Wang YB, Li JR, Lin J. 2008.** Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 281: 1-4. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.002
52. **Wang Y, Osatomi K, Yoshida A, Liang X, Kanai K, Oda T, Hara K. 2010.** Extracellular products from virulent strain of *Edwardsiella tarda* stimulate mouse macrophages (RAW264.7) to produce nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF)- α . *Fish Shellfish Immun* 29: 778-785. doi: 10.1016/j.fsi.2010.07.014
53. **Wemhoff S, Meinhardt F. 2013.** Generation of biologically contained, readily transformable, and genetically manageable mutants of the biotechnologically important *Bacillus pumilus*. *Appl Microbiol Biot* 97: 7805-7819. doi: 10.1007/s00253-013-4935-5
54. **Worden A. 2009.** CTAB extraction buffer. *Cold Spring Harbor Protocols*. [Internet]. Available in: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/10/pdb.rec11984>
55. **Wu L, Wu H, Chen L, Xie S, Zang H, Borriss R, Gao X. 2014.** Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Appl Environ Microb* 80: 7512-7520 doi: 10.1128/AEM.02605-14