

## Caracterización de la microbiota intestinal en robalo (*Centropomus* sp) y aislamiento de bacterias probióticas potenciales

### Characterization of the intestinal microbiota in snook (*Centropomus* sp) and isolation of potential probiotic bacteria

Adrian E. Zatán<sup>2,4</sup>, Deysy Castillo<sup>3</sup>, Arnaldo E. Castañeda<sup>1,2</sup>,  
Manuel A. Feria<sup>1,2</sup>, Odalis E. Toledo<sup>1,2</sup>, Jorge L. Aguilar<sup>2,4</sup>,  
Mario D. Cueva<sup>3</sup>, Emmerik Motte<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar la microbiota del tracto intestinal de robalo (*Centropomus* sp), proveniente de medio natural y cautiverio, además de aislar e identificar bacterias con potencial probiótico. La microbiota intestinal se caracterizó mediante metagenómica dirigida al gen 16S ARNr. Además, se sembraron muestras de mucus intestinal en medio de cultivo MRS para el aislamiento bacteriano. La identificación molecular se hizo mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Las capacidades probióticas se evidenciaron mediante ensayos proteolíticos y de antagonismo bacteriano frente a *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* y *Vibrio harveyi*. Los géneros bacterianos con mayor abundancia fueron *Clostridium*, *Photobacterium*, *Cetobacterium* y *Rubritepida*. Las especies bacterianas, incluyendo *Klebsiella* sp, dos cepas de *Weisiella cibaria* y *Lactococcus* sp fueron aisladas en agar MRS a partir del tracto intestinal. Las cepas *W. cibaria* mostraron amplio espectro antagonista y actividad proteolítica positiva.

**Palabras clave:** *Centropomus*, microbiota, metagenómica, probióticos

<sup>1</sup> Incabiotec, Tumbes, Perú

<sup>2</sup> Pezbiotec, Tumbes, Perú

<sup>3</sup> Cooperativa de trabajadores Biotecoop, Tumbes, Perú

<sup>4</sup> Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú

<sup>5</sup> E-mail: pezbiotechsac@gmail.com

Financiamiento: Círculo de investigación en biotecnología molecular para el desarrollo y sostenibilidad del sector acuícola del Perú. Código: 132-2015 (Cienciaactiva - Concytec)

Recibido: 3 de mayo de 2019

Aceptado para publicación: 16 de abril de 2020

Publicado: 11 de agosto de 2020

## ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the microbiota of the intestinal tract of robalo (*Centropomus* sp), from natural environment and captivity, and to isolate and identify bacteria with probiotic potential. The intestinal microbiota was characterized by metagenomics directed to the 16S rRNA gene. In addition, samples of intestinal mucus were cultured in MRS medium for bacterial isolation. Molecular identification was done by sequencing the 16S rRNA gene. Probiotic capabilities were evidenced by proteolytic and bacterial antagonism assays against *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Vibrio harveyi*. The most abundant bacterial genera were *Clostridium*, *Photobacterium*, *Cetobacterium* and *Rubritepida*. Bacterial species, including *Klebsiella* sp, two strains of *Weisiella cibaria* and *Lactococcus* sp were isolated on MRS agar from the intestinal tract. *W. cibaria* strains showed broad antagonistic spectrum and positive proteolytic activity.

**Key words:** *Centropomus*, microbiota, metagenomics, probiotics

## INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial alcanzó 80 millones de toneladas (TM) de pescado en el año 2016, donde la maricultura representó el 35% (FAO, 2018). A nivel nacional, la maricultura produjo el 40% de la producción acuícola total durante 2016-2017; sin embargo, la piscicultura aún se encuentra en proceso de desarrollo a pesar de su amplia variedad de especies (PRODUCE, 2017).

Un recurso hidrobiológico marino de importancia comercial en el norte del Perú es el *Centropomus* sp, conocido comúnmente como robalo, que se distribuye desde Baja California Sur en México hasta Paita en Perú (Muhlia *et al.*, 1994). Es considerado un candidato potencial para su producción intensiva, debido a su rápida adaptabilidad y buena calidad de carne, convirtiéndose en una alternativa rentable (Cerqueira y Tsuzuki, 2009; Ramos y Palas, 2013); sin embargo, tiene como limitantes la dificultad de producir juveniles en cantidades suficientes y la alta mortandad en la etapa larvaria (Souza *et al.*, 2010). Gran parte de esta mortandad es asociada principalmente a enfermedades infecciosas bacterianas, las cuales proliferan de-

bido al aumento de las condiciones de estrés (Austin, 2005; Peso-Echarri *et al.*, 2012; Lafferty *et al.*, 2015).

Para contrarrestar las enfermedades infecciosas, los antibióticos se han convertido en el tratamiento profiláctico y terapéutico más utilizado (Romero *et al.*, 2012); sin embargo, su uso indiscriminado a largo plazo selecciona bacterias resistentes a drogas (multidrogo-resistentes) perjudicando la salud pública (Banerjee y Ray, 2017), además de afectar microorganismos de la microbiota nativa del hospedero, conllevando a la proliferación de patógenos oportunistas (Modi *et al.*, 2014).

La microbiota es un ecosistema microbiano dinámico y complejo, que se encuentra asociado a la piel, branquias y tracto gastrointestinal, habita en forma estable e interacciona entre sí, autorregulando su concentración numérica (Nayak, 2010; Merrifield y Rodiles, 2015). Como parte de la microbiota se encuentran bacterias benéficas que participan en la inmunidad del hospedero (Lazado y Caipang, 2014), siendo sus funciones más resaltantes: 1) modulación del sistema inmune, 2) suministración de nutrientes, 3) producción de compuestos antagónicos frente a

patógenos, y 4) producción de enzimas extracelulares, como proteasas y lipasas (Pirarat *et al.*, 2011; Drider *et al.*, 2016; Zorriehzahra *et al.*, 2016).

Para la correcta selección de probióticos se requieren técnicas moleculares de vanguardia como la secuenciación de nueva generación (NGS) (Cui *et al.*, 2017) que permiten analizar la biodiversidad de las comunidades microbianas presentes, así como también, una mejor comprensión de la relación entre los aislados y la microbiota total (Ju y Zhang, 2015; Oulas *et al.*, 2015). Por lo tanto, conociendo la microbiota intestinal de los peces se pueden descubrir probióticos potenciales que reduzcan la aparición de enfermedades infecciosas y el uso de antibióticos (Wang *et al.*, 2008). El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar, mediante metagenómica, la composición de la microbiota intestinal nativa del robalo *Centropomus* sp e identificar bacterias con potencial probiótico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección de la Muestra

Tres robalos de estado juvenil y aparentemente sanos fueron colectados de los distritos de Zarumilla (medio natural), Corrales (medio natural) y Puerto Pizaro (en cautiverio), localizados en la región Tumbes, Perú, y fueron codificados como R1, R2 y R3, respectivamente. Se procedió a la eutanasia con previa anestesia con eugenol. Se diseccionaron en condiciones asépticas y se colectó 1 g por pez de intestino libre de contenido intestinal en tubos de 2 ml con etanol absoluto. Finalmente, las muestras se trasladaron al laboratorio para estudios metagenómicos.

### Aislamiento Bacteriano

Se realizó un frotis intestinal utilizando hisopos estériles y se colocaron en tubos de 2 ml con caldo Man Rogosa Sharpe (MRS). Las muestras se incubaron a temperatura

ambiente durante 24 h. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (1:10, de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) y se sembraron por esparcimiento en placas Petri con agar MRS. Las colonias fueron subcultivadas por el método de agotamiento hasta obtener colonias puras.

### Antagonismo Bacteriano y Actividad Proteolítica

Las bacterias aisladas se enfrentaron a cuatro bacterias patógenas de peces (*Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* y *Vibrio harveyi*) utilizando el método de difusión en agar con modificaciones (Balcázar *et al.*, 2008). Las bacterias patógenas se cultivaron en caldo Tryptic Soy Broth (TSB) durante 24 h a 28 °C y luego se sembraron 100 µl de cada bacteria patógena en placas con Tryptic Soy Agar (TSA) mediante el método de esparcimiento en superficie. Posteriormente, se realizaron pocillos en el agar con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se agregaron 30 µl ( $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia, UFC) de las bacterias aisladas. Finalmente, se incubaron a 28 °C durante 24 h. Las zonas de actividad inhibitoria fueron calculadas en milímetros (mm), considerándose positivas aquellas que mostraron una zona clara de inhibición.

La actividad proteolítica se evaluó en agar Skim Milk (5%), método adaptado de Reda *et al* (2017). Se sembraron 30 µl de cada bacteria potencialmente probiótica en sus respectivos pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h. Los aislados con actividades proteolíticas mostraron zonas transparentes alrededor.

### Extracción de ADN y PCR

Se extrajo ADN metagenómico bacteriano a partir de 1 g de tejido intestinal utilizando el kit DNeasy PowerSoil® (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se extrajo ADN genómico bacteriano de los aislados utilizando el método CTAB (bromuro de hexadeciltrimetila-

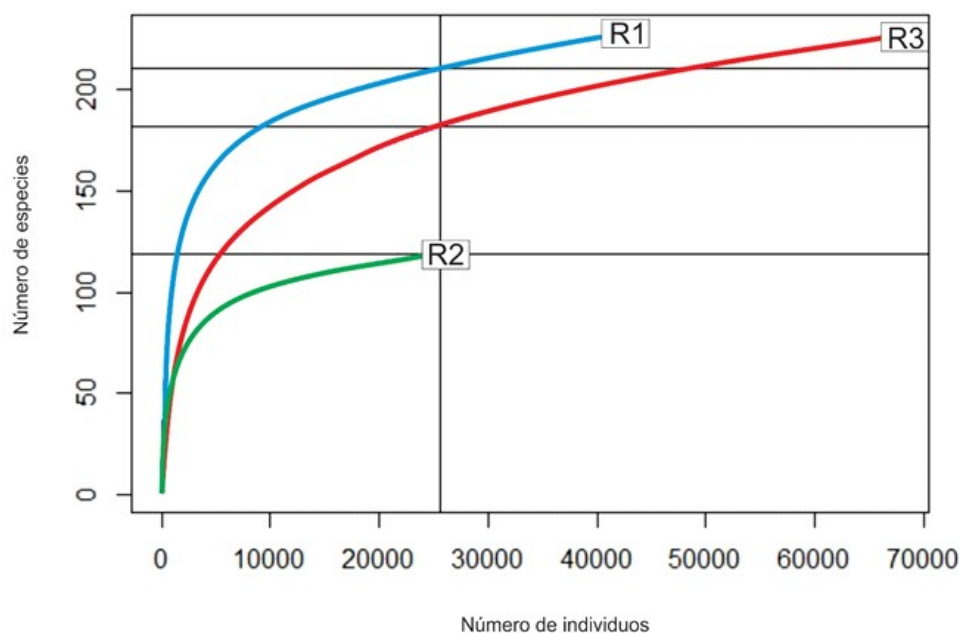


Figura 1. Curvas de rarefacción que muestran la diversidad de especies en las microbiotas intestinales de tres muestras de robalo (*Centropomus* sp) con relación al número de secuencias obtenidas

monio). La amplificación del gen 16S ARNr se hizo utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTAGTCMTG-GCTCAG-3') y 1492R (5'-GGYTACCTT-GTTACGACCTT-3').

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó mediante las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 45 s, 7 °C durante 1 min y 30 s, y un ciclo final de 72 °C durante 6 min. Se verificaron los productos de PCR en un gel al 1.5% de agarosa teñido con bromuro de etidio.

### Secuenciación y Análisis

Los productos amplificados y ADN metagenómico se enviaron a Macrogen (USA) y MRDNA (USA), respectivamente, para su secuenciación. Las secuencias obte-

nidas fueron analizadas mediante los softwares MEGA 6 y Mothur.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La microbiota intestinal es un factor importante en la nutrición e inmunidad de los peces, por lo que su estudio es primordial, especialmente en especies de gran valor comercial. La metagenómica, parte de la genómica que estudia el ADN global de una comunidad de microorganismos, permite también la caracterización de bacterias con propiedades benéficas conocidas comúnmente como probióticos (Tarnecki *et al.*, 2017).

En el presente estudio se caracterizó la microbiota intestinal mediante NGS dirigida al gen 16S ARNr de tres individuos de robalo (dos de medio natural y uno de cautiverio).

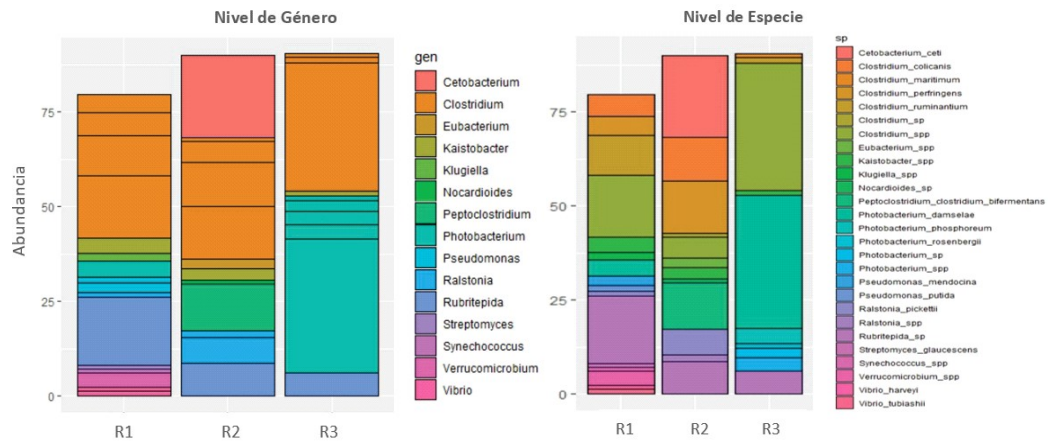


Figura 2. Composición taxonómica de la microbiota intestinal del robalo (*Centropomus* sp), Tumbes, Perú

La curva de rarefacción muestra el número de especies con relación al número de lecturas realizadas, donde las muestras R1 y R3 poseen una riqueza de alrededor de 220 especies y la muestra R2 de 120. La riqueza de especies estuvo relacionado al número de unidades taxonómicas operativas (OTUs, por sus siglas en inglés) establecido para cada muestra (Figura 1).

El estudio metagenómico de la muestra R1 mostró 11 géneros sobresalientes, de los cuales *Rubritepida* (17.94%) y *Clostridium* (37.91%) fueron los más dominantes. La muestra R2 presentó ocho géneros de los cuales resaltan *Cetobacterium* (12.44%) y *Clostridium* (32.16%). La muestra R3 presentó cuatro géneros sobresalientes en donde *Photobacterium* (49.24%) y *Clostridium* (36.53%) tuvieron mayor predominancia (Figura 2). *Clostridium*, del phylum Firmicutes, fue el género más dominante y estuvo presente en las tres muestras. Estudios recientes destacan que especies de los phylum Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes y Tenericutes son los más dominantes en el tracto gastrointestinal de los peces teleosteos (Llewellyn *et al.*, 2014; do Vale Pereira *et al.*, 2017).

Otros géneros sobresalientes fueron: *Rubritepida*, que requiere NaCl o sales marinas para su crecimiento. Es encontrado, además, en aguas termales saladas o lagos salinos. Este hallazgo tiene relación con el lugar de procedencia de las muestras, que son zonas estuarinas y de temperatura cálida. También se logró identificar *Cetobacterium*, que ha sido aislado a partir del intestino de peces como *Oreochromis niloticus*, *Arapaima gigas*, *Cyprinus carpio* y posee la capacidad de producir vitamina B12 (Ramírez *et al.*, 2018), sugiriendo su rol en el metabolismo celular. Por otra parte, la abundancia relativa de especies de *Clostridium* en las muestras de robalo puede explicarse debido a su comportamiento simbiote con peces marinos hospederos (Clements *et al.*, 2009), mientras que la presencia de *Photobacterium* y *Vibrio* está relacionado al tipo de alimentación, y son encontrados comúnmente en peces carnívoros como *Atlantic salmon*, *Salmo salar* y *Black rockcod*, entre otros (Egerton *et al.*, 2018).

Otros estudios mencionan que *Photobacterium* y *Clostridium* podrían ayudar a la digestión como también en la suplementación de ácidos grasos y vitaminas (Balcázar

Cuadro 1. Actividad antagonica<sup>1</sup> de aislados de intestino de robalo (*Centropomus* sp) frente a cuatro patógenos de peces (Tumbes, Perú)

| Código | Identificación molecular | <i>Plesiomonas shigelloides</i> | <i>Aeromonas hidrophyla</i> | <i>Aeromonas veronii</i> | <i>Vibrio harveyi</i> |
|--------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| HE3B-3 | <i>Klebsiella</i> sp     | ++                              | +++                         | +++                      | +++                   |
| HE2C-4 | <i>Weissella cibaria</i> | +                               | +++                         | +++                      | +++                   |
| HE3C-4 | <i>Weissella cibaria</i> | ++                              | +++                         | +++                      | +++                   |
| HE2C-1 | <i>Lactococcus</i> sp    | +                               | -                           | -                        | ++                    |

<sup>1</sup> '-' No evidenció formación de halos, '+' Halos de 4-8 mm, '++' Halos de 8-12 mm, '+++' Halos >12 mm

*et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2012). Más allá de la simbiosis natural, algunas especies de *Clostridium* han sido utilizadas como probióticos en *Oncorhynchus mykiss*, incrementando la resistencia a vibriosis (Sakai *et al.*, 1995); sin embargo, este género también está conformado por especies patógenas como *C. botulinum*, frecuentemente asociado a enfermedades en peces marinos.

La identificación molecular de los aislados mostró tres especies, incluyendo *Klebsiella* sp, dos cepas de *Weissella cibaria* y *Lactococcus* sp. El género *Klebsiella* es conocido por ser responsable de una variedad de enfermedades en peces como *Labeo rohita* y *Amphiprion nigripes* (Gopi *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2018). Por otro lado, cepas identificadas como *Lactococcus* sp y *Weissella cibaria* han sido reportadas como probióticos de uso común en la acuicultura. Heo *et al.* (2013) demostraron la capacidad probiótica de *L. lactis* en *Paralichthys olivaceus*, debido a la activación del sistema inmune. Por otro lado, *W. cibaria* ha sido aislada a partir del intestino de *Salmo trutta* y *Salmo salar* indicando que es un componente común de la microbiota intestinal de peces marinos (Al-Hisnawi *et al.*, 2014); sin embargo, también ha sido aislada del intestino

de peces de agua dulce (Maji y Mohanty *et al.*, 2017). Su capacidad probiótica ha sido demostrada al reducir el número de bacterias patógenas y estimular la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en la microbiota intestinal de *Pseudoplatystoma* sp (Mouriño *et al.*, 2011).

La capacidad antagonica de BAL aislados del intestino de peces frente a patógenos bacterianos ha sido ampliamente demostrada. Además, se menciona que es la propiedad más importante de una bacteria con potencial probiótico (Banerjee y Ray, 2017). En el presente estudio, los aislados HE3B-3 *Klebsiella* sp, HE2C-4 *W. cibaria*, HE3C-4 *W. cibaria* y HE2C-1 *Lactococcus* sp demostraron su capacidad antagonica frente al menos una cepa patógena (Cuadro 1). Esto puede deberse a las propiedades que poseen las BAL para producir sustancias bactericidas como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y proteasas, entre otros (Zorriehzahra *et al.*, 2016). Finalmente, *Klebsiella* sp y *W. cibaria* fueron las cepas con mejores capacidades antagonicas; no obstante, *Klebsiella* es considerada comúnmente un patógeno oportunista (Austin, 2005), mientras que *W. cibaria* es considerada como probiótico.

La microbiota cumple una función importante en la nutrición de los peces, y se debe principalmente a la producción de enzimas (Ray *et al.*, 2012). En este estudio, los aislados HEB-3, HE2C-4, HE3C-4 y HE2C-1 fueron capaces de producir proteasas extracelulares demostradas en la formación de zonas transparentes alrededor de los pocillos en agar Skim Milk (5%).

#### LITERATURA CITADA

1. **Al-Hisnawi A, Ringo E, Davies SJ, Waines P, Bradley G, Merrieffield DL. 2014.** First report on the autochthonous gut microbiota of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus). *Aquac Res* 46: 2962-2971. doi: 10.1111/are.12451
2. **Austin B. 2005.** Bacterial pathogens of marine fish. In: *Oceans and health: pathogens in the marine environment*. Boston, USA: Springer. p 391-413.
3. **Balcázar JL, De Blas I, Ruíz-Zarzueta I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. 2006.** The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114: 173-186. doi: 10.1016/j.vetmic.-2006.01.009
4. **Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruíz-Zarzueta 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
5. **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
6. **Cerqueira VR, Tsuzuki MY. 2009.** A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiol Biochem* 35: 17-28. doi: 10.1007/s10695-008-9245-y
7. **Clements KD, Raubenheimer D, Choat JH. 2009.** Nutritional ecology of marine herbivorous fishes: ten years on. *Funct Ecol* 23: 79-92. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01524.x
8. **Cui J, Xiao M, Liu M, Wang Z, Liu F, Guo L, Huang S. 2017.** Coupling metagenomics with cultivation to select host specific probiotic micro organisms for subtropical aquaculture. *J Appl Microbiol* 123: 1274-1285. doi: 10.1111/jam.13555
9. **Das A, Acharya S, Behera BK, Paria P, Bhowmick S, Parida PK, Das BK. 2018.** Isolation, identification and characterization of *Klebsiella pneumoniae* from infected farmed Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton 1822) in West Bengal, India. *Aquaculture* 482: 111-116. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2017.08.037
10. **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
11. **Drider D, Bendali F, Naghmouchi K, Chikindas ML. 2016.** Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics Antimicrob* 8: 177-182. doi: 10.1007/s12602-016-9223-0
12. **Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP. 2018.** The gut microbiota of marine fish. *Front Microbiol* 9: 873. doi: 10.3389/fmicb.2018.-00873
13. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2018.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/i9540es/I9540es.pdf>
14. **Gopi M, Kumar TTA, Prakash S. 2016.** Opportunistic pathogen *Klebsiella pneumoniae* isolated from Maldivé's

- clown fish *Amphiprion nigripes* with hemorrhages at Agatti Island, Lakshadweep archipelago. *Int J Fisheries Aquatic Studies* 4: 464-467.
15. **Heo WS, Kim YR, Kim EY, Bai SC, Kong IS. 2013.** Effect of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 376: 20-24. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.11.009
  16. **Ju F, Zhang T. 2015.** 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Appl Microbiol Biot* 99: 4119-4129. doi: 10.1007/s00253-015-6536-y
  17. **Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, Saksida SM. 2015.** Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annu Rev Mar Sci* 7: 471-96. doi: 10.1146/annurev-marine-010814-015646
  18. **Lazado CC, Caipang CMA. 2014.** Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immun* 39: 78-89. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.024
  19. **Llewellyn MS, Boutin S, Hoseinifar SH, Derome N. 2014.** Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front Microbiol* 5: 207. doi: 10.3389/fmicb.2014.00207
  20. **Maji UJ, Mohhanty S. 2017.** Genotypic characterization of lactic acid bacteria in gut microbiome of freshwater fish. *Microbiology* 86: 276-285. doi: 10.1134/S0026261717020138
  21. **Merrifield DL, Rodiles A. 2015.** The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: *Mucosal health in aquaculture*. Academic Press. p 273-295. doi: 10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8
  22. **Modi SR, Collins JJ, Relman DA. 2014.** Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest* 124: 4212-4218. doi: 10.1172/JCI72333
  23. **Mouriño JLP, De Nascimento Viera F, Jatoba AB, De Silva BC, Jesus GFA, Seiffert WQ, Martins ML. 2011.** Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquacult Nutr* 18: 73-80. doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00879.x
  24. **Muhlia MA, Arvizu-Martínez J, Rodríguez-Romero J, Guerrero TD, Gutiérrez F, Muhlia AA. 1994.** Desarrollo científico y tecnológico del cultivo del robalo. Secretaría de Pesca. México. [Internet]/ Disponible en: <https://www.inapesca.gob.mx/portal/Publicaciones/Manuales/1994-Muhlia-Melo-et-al.-Cultivo-de-robalo.pdf?download>
  25. **Nayak SK. 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac Res* 41: 1553-1573. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x
  26. **Oulas A, Pavludi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolaou N, Kotoulas G, Iliopoulos L. 2015.** Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights* 9: 75-88. doi: 10.4137/BBI.S12462
  27. **Peso-Echarri P, Frontela-Saseta C, González-Bermúdez CA, Ros-Berruero GF, Martínez-Graciá C. 2012.** Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Rev Biol Mar Oceanog* 47: 373-381. doi: 10.4067/S0718-35519572012000300001
  28. **Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, Katagiri T, Ponpornpisit A, Chansue N, Maita M. 2011.** Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile



- tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. Res Vet Sci 91: e92-e97. doi: 10.1016/j.rvsc.-2011.02.014
29. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2017.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. Lima, Perú. [Internet]. Disponible en: <https://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf>
  30. **Ramírez C, Coronado J, Silva A, Romero J. 2018.** *Cetobacterium* is a major component of the microbiome of giant Amazonian fish (*Arapaima gigas*) in Ecuador. Animals 8: 189. doi: 10.3390/ani8110189
  31. **Ray AK, Ghosh K, Ringo E. 2012.** Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. Aquac Nutr 18: 465-491. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.-00943.x
  32. **Ramos Mogollon C, Palas Garcia L. 2013.** Crecimiento, supervivencia y porcentaje de linfocitos en *Centropomus* sp (robalo) alimentado con tres dietas. Tesis de Ingeniero Pesquero. Tumbes: Univ. Nacional de Tumbes. 58 p.
  33. **Romero J, Feijóo CG, Navarrete P. 2012.** Antibiotics in aquaculture – use, abuse and alternatives. In: Health and environment in aquaculture. InTech. doi: 10.5772/28157
  34. **Sakai M, Yoshida T, Atsuta S, Kobayashi M. 1995.** Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. J Fish Dis 18: 187-190. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.-tb00276.x
  35. **Souza RM, Muriño JL, Vieira F, Buglione CC, Andreatta ER, Seiffert WQ, Cerqueira VR. 2010.** Seleção de bactéria com potencial probiótico e utilização no cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). Bol Inst Pesca 36: 17-24.
  36. **Tarnecki AM, Burgos FA, Ray CL, Arias CR. 2017.** Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unraveled by metagenomics. J Appl Microbiol 123: 2-17. doi: 10.1111/jam.13415
  37. **Wang YB, Tian ZQ, Yao JT, Li WF. 2008.** Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture 277: 203-207. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.-03.007
  38. **Zorriehzahra MJ, Delshad ST, Adel M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Lazado CC. 2016.** Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. Vet Quart 36: 228-241. doi: 10.1080/01652176.2016.1172132