



ARTÍCULO / ARTICLE

Identificación molecular de la microbiota intestinal cultivable de *Epinephelus morio* (mero rojo) y su potencial probiótico

Molecular identification of culturable gut microbiota of *Epinephelus morio* (red grouper) and its probiotic potential

Grecia Montalvo-Fernández ¹

0000-0002-0627-3347

grecia.montalvo@enesmerida.unam.mx

Joanna M. Ortiz-Alcantara ¹

0000-0003-2894-3652

joanna.ortiz@ciencias.unam.mx

Claudia Durruty-Lagunes ²

0000-0002-1112-5939

cvdl@ciencias.unam.mx

María Leticia Arena-Ortiz ^{*}

0000000213348087

leticia.arena@ciencias.unam.mx

1. Laboratorio de Estudios Ecogenómicos. Parque Científico Tecnológico de Yucatán. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. Carretera Sierra Papacal - Chuburna Puerto. Km. 5.5 Tablaje 31257. Sierra Papacal, 97302 Mérida, Yucatán, México

2. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. Puerto de Abrigo S/N, 97355 Sisal, Yucatán, México.

* Autor de correspondencia/Corresponding Author: leticia.arena@ciencias.unam.mx

Recibido / Received: 24/07/2024

Aceptado / Accepted: 04/04/2025

Citación / Citation: Montalvo-Fernández, G.; Ortiz-Alcantara, J.; Durruty-Lagunes, C.; Arena, M.L. 2025. Molecular identification of culturable gut microbiota of *Epinephelus morio* (Red grouper) and its probiotic potential. Bol. Invest. Mar. Cost., 54(2): 32-52

RESUMEN

La microbiota intestinal de *Epinephelus morio* (mero rojo) es importante para la digestión, metabolismo y salud, sin embargo, ha sido poco estudiada. En este estudio, la microbiota intestinal cultivable del mero rojo se caracterizó mediante la secuenciación del gen ARNr 16S y se estudió su potencial probiótico. Se utilizaron seis peces adultos entre 3-7 kg y se tomó el contenido intestinal. La identificación molecular de la microbiota intestinal de *E. morio* se realizó basados en secuenciación de ARNr 16S y posterior análisis usando las bases de datos RNaCentral, SILVA y GenBank (BLASTN). Se determinó la actividad amilolítica, quitinolítica y proteolítica de los aislados empleando medios de cultivo específicos. Se obtuvieron 22 aislados, y los phyla que se identificaron fueron Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. La especie aislada con más frecuencia fue *Photobacterium damsela*. Dos aislados presentaron actividad amilolítica y 13 aislados tuvieron actividad proteolítica; ninguno fue positivo para la actividad quitinolítica. *Bacillus infantis*, *Enterococcus faecium* y *Shewanella* sp. se seleccionaron como posibles probióticos para incluirlos en la alimentación de meros en cautiverio, debido a su actividad amilolítica y proteolítica.

Palabras clave: bacteria, microbiota intestinal cultivable, peces marinos, potencial probiótico de mero rojo, secuenciación genética 16S rRNA.

ABSTRACT

The gut microbiota of *Epinephelus morio* or red grouper might be important for digestion, metabolism and health, however, it has been studied little. In this paper, the culturable gut microbiota of wild red grouper in captivity was identified through 16S rRNA gene sequencing, and its potential as probiotic was studied. Six adult fish between 3-7 kg were used for intestinal content sampling. The molecular identification of gut microbiota was performed based on rRNA16S sequencing and analysis using the RNaCentral, SILVA and GenBank databases (BLASTN). Amylolytic, chitinolytic and proteolytic activity of isolates was determined using specific culture media. 22 isolates were obtained, and bacteria of the phyla Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria were identified. The most frequently isolated species was *Photobacterium damsela*. Two isolates had amylolytic activity and 13 isolates had proteolytic activity; none were positive for chitinolytic activity. *Bacillus infantis*, *Enterococcus faecium* and *Shewanella* sp. were selected as possible probiotics to include them, in the first instance, in the feeding of captive groupers due to their amylolytic and proteolytic activity.

Key words: bacteria, culturable gut microbiota, marine fish, red grouper probiotic potential, 16S rRNA gene sequencing



INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal puede contener bacterias, hongos, levaduras, protozoos y virus. Sin embargo, las bacterias son las más abundantes, por lo que la microbiota suele referirse principalmente a las bacterias (Serra *et al.*, 2019). Las bacterias son microorganismos con una gran capacidad de adaptación a distintos ecosistemas. Pueden vivir en condiciones realmente extremas de temperatura, salinidad y presión, incluso pueden vivir dentro de otros organismos terrestres y acuáticos. En los organismos acuáticos, como los peces, la microbiota está asociada a la piel, las branquias y el tracto gastrointestinal, donde diferentes especies viven de forma estable e interactúan entre sí, autorregulando su concentración numérica (Merrifield y Rodiles, 2015).

La composición de la comunidad microbiana del intestino de los peces teleósteos está formada inicialmente por bacterias aerobias, facultativas, anaerobias y anaerobias obligadas (Llewellyn *et al.*, 2014). La colonización posterior dependerá de varios factores, como la fase de desarrollo del hospedador, la absorción de nutrientes, el estado fisiológico del pez, las condiciones ambientales, la dieta y otros (Ghanbari *et al.*, 2015).

Algunas especies bacterianas de la microbiota de los peces pueden ser beneficiosas para el hospedador, desempeñando un papel en la modulación del sistema inmunitario y en la producción de compuestos antagonistas frente a patógenos, influyendo en la vulnerabilidad del hospedador frente a determinadas enfermedades (Dridner *et al.*, 2016; López *et al.*, 2020). Pueden influir en la producción de enzimas digestivas, como proteasas, amilasas, quitinasas y lipasas que ayudan a solubilizar los elementos de la dieta. También pueden proporcionar al hospedador enzimas para digerir compuestos de la dieta que el hospedador por sí mismo no puede aprovechar (Butt y Volkoff, 2019), influyendo así en el crecimiento y desarrollo del pez (Kersarcodi-Watson *et al.*, 2007). Influyen en la expresión de genes del sistema inmunitario y de otros genes relacionados con el estrés en el huésped y ayudan a mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes (Buruiana *et al.*, 2014). Por ello, algunas bacterias se consideran probióticos, como *Bacillus* sp.

Para identificar los componentes de la microbiota intestinal, existen métodos tradicionales de microbiología y métodos que utilizan la biología molecular. En la microbiología tradicional, se

INTRODUCTION

The intestinal microbiota can contain bacteria, fungi, yeasts, protozoans and viruses. However, bacteria are the most abundant, which is why microbiota usually refers primarily to bacteria (Serra *et al.*, 2019). Bacteria are microorganisms with an extensive capacity to adapt to different ecosystems. They can live in really extreme conditions of temperature, salinity and pressure, they can even live inside other terrestrial and aquatic organisms. In aquatic organisms, such as fishes, the microbiota is associated with the skin, gills and gastrointestinal tract, where different species live stably and interact with each other, self-regulating its numerical concentration (Merrifield and Rodiles, 2015).

The composition of the microbial community in the teleost fish intestine is initially made up of aerobic, facultative, anaerobic and obligate anaerobic bacteria (Llewellyn *et al.*, 2014). Subsequent colonization will depend on several factors such as the stage of host development, nutrient absorption, the physiological state of the fish, environmental conditions, diet, and others (Ghanbari *et al.*, 2015).

Some bacterial species of the fish microbiota can be beneficial for the host, playing a role in the immune system modulation and the production of antagonistic compounds against pathogens, influencing the host's vulnerability to certain diseases (Dridner *et al.*, 2016; López *et al.*, 2020). They can influence the production of digestive enzymes, such as proteases, amylases, chitinases and lipases that help solubilize dietary elements. They can also provide the host with enzymes to digest dietary compounds that the hosts by itself cannot take advantage of (Butt and Volkoff, 2019), thus having an influence on the fish growth and development (Kersarcodi-Watson *et al.*, 2007). They influence immune system gene expression and other genes related to stress in the host and help improve antioxidant enzyme activity (Buruiana *et al.*, 2014). That is why some bacteria are considered as probiotics such as *Bacillus* sp.

To identify components of the gut microbiota, there are traditional microbiology methods and methods that use molecular biology. In traditional microbiology, various commercial culture media are currently available to be used for the isolation and identification of microorganisms of interest for food production, aquaculture and clinical microbiology (Tortora *et al.*, 2007). The most used

dispone actualmente de diversos medios de cultivo comerciales que se utilizan para el aislamiento y la identificación de microorganismos de interés para la producción de alimentos, la acuicultura y la microbiología clínica (Tortora *et al.*, 2007). El medio de cultivo más utilizado es el agar triptona soya (TSA). La identificación basada únicamente en la microbiología tradicional tiene el inconveniente de que sólo se puede identificar la fracción cultivable de la microbiota, que es mucho menor que la microbiota total.

Estudios realizados con trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) revelan que el cultivo de bacterias en medio TSA es el 18% respecto a su microbiota total (Navarrete *et al.*, 2010). Otro estudio realizado con salmón atlántico (*Salmo salar*) determinó que las bacterias cultivables son aproximadamente < 1% del total de bacterias (Navarrete *et al.*, 2009).

Una forma de abordar el estudio de la microbiota cultivable es utilizar herramientas tanto microbiológicas como moleculares cultivando y aislando colonias para posteriormente secuenciar el gen ARNr 16S, que es el método más utilizado para la identificación molecular de bacterias. Esto tiene la ventaja de que la identificación no sólo se basa en factores morfológicos y bioquímicos, sino que la información genética hace que la identificación sea más sólida. El número de estudios que utilizan estas herramientas es cada vez mayor (Navarrete *et al.*, 2012; Do Vale *et al.*, 2017; Zatán *et al.*, 2020).

Se estudió la comunidad bacteriana del tracto intestinal de *Epinephelus coioides* mediante el aislamiento y cultivo de cepas seguido de la secuenciación del gen ARNr 16S. Los autores determinaron que los géneros más abundantes fueron *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Psychrobacter* (Sun *et al.*, 2009).

La estructura de la microbiota depende de las condiciones ambientales y de la dieta, por lo que cabría esperar que existieran diferencias en la microbiota intestinal entre los peces de agua dulce y los marinos (Dehler *et al.* 2017). Wang *et al.* (2018) informaron de que los microbios intestinales predominantes de los peces marinos son anaerobios facultativos del género *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* y *Micrococcus* (Ou *et al.*, 2021).

Varios autores han descrito el efecto de la dieta en la microbiota intestinal. Los peces herbívoros eran ricos en bacterias

culture media is Tryptone Soy Agar (TSA). Identification based only on traditional microbiology has the disadvantage that only the culturable fraction of the microbiota could be identified, which is much smaller than total microbiota.

Studies carried out with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveal that the cultivation of bacteria in TSA medium is 18 % on average with respect to its total microbiota (Navarrete *et al.*, 2010). Another study carried out with Atlantic salmon (*Salmo salar*) determined that culturable bacteria are approximately <1 % of the total bacteria (Navarrete *et al.*, 2009).

One way to approach the study of the culturable microbiota is to use both microbiological and molecular tools by cultivating and isolating colonies to subsequently sequence the 16S rRNA gene, which is the most used method for the molecular identification of bacteria. This has the advantage that identification is not only based on morphological and biochemical factors, but that genetic information makes identification more robust. The number of studies that use these tools is increasing (Navarrete *et al.*, 2012; Do Vale *et al.*, 2017; Zatán *et al.*, 2020).

The bacterial community of the intestinal tract of *Epinephelus coioides* was studied by isolating and culturing strains followed by 16S rRNA gene sequencing. The authors determined that the most abundant genera were *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Psychrobacter* (Sun *et al.*, 2009).

The structure of the microbiota depends on environmental conditions and diet, it could be expected that difference would exist in the gut microbiota between freshwater and marine fish (Dehler *et al.* 2017). Wang *et al.* (2018) reported that the predominant intestinal microbes of marine fish are facultative anaerobes, comprising the genera *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* and *Micrococcus* (Zhang *et al.*, 2021).

The effect of diet on the gut microbiota has been reported by several authors. Herbivorous fish were rich in cellulose-degrading bacteria such as *Clostridium* sp., *Citrobacter* sp. and *Leptotrichia* sp. while in carnivores *Cetobacterium* sp. and *Halomonas* sp. were dominant (Liu *et al.*, 2016).

Epinephelus morio is a carnivorous species but when kept in captivity there is a change in diet. Semi-moist food is provided, composed of fresh foods such as fish, shrimp, rich in protein,

degradadoras de celulosa como *Clostridium* sp., *Citrobacter* sp. y *Leptotrichia* sp. mientras que en los carnívoros dominaban *Cetobacterium* sp. y *Halomonas* sp. (Liu *et al.*, 2016).

Epinephelus morio es una especie carnívora pero cuando se mantiene en cautividad se produce un cambio en la dieta. La comida semi-húmeda se suministra compuesta por alimentos frescos como pescado, camarones, ricos en proteínas, ligados a la harina de pescado, uno de los componentes más caros de la dieta, por lo que se tiende a sustituirla por otros componentes. Lograr una digestión y absorción eficientes del alimento de los peces en cautiverio es uno de los objetivos de los productores. El uso de probióticos puede contribuir en este sentido. El objetivo de investigación es realizar la primera aproximación a la identificación de la microbiota cultivable de *E. morio* y determinar su potencial como probiótico para utilizarlo en la mejora de la digestión y absorción de los meros en cautiverio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se utilizaron peces adultos silvestres de la costa norte de Yucatán, México, entre Celestún y Dzilam de Bravo. Se utilizaron seis peces de entre 3-7 kg de peso mantenidos en cautiverio en el área de cría de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Sisal, Facultad de Ciencias, UNAM. Los peces se anestesiaron con aceite de clavo y se introdujo una sonda en la cloaca para tomar una muestra del contenido intestinal. Las sondas se colocaron en un tubo eppendorf con 1 ml de solución estéril de NaCl al 0,85 % y se agitaron enérgicamente para extraer la muestra. Se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-3}) y se distribuyeron 100 ml de cada una en placas Petri por duplicado en dos tipos de medios de cultivo: agar marino y TSA (agar triptona soya) y se cultivaron a 22 °C durante siete días. El crecimiento bacteriano comenzó a controlarse 24 horas después. El muestreo se realizó una vez al año en el periodo comprendido entre 2019-2024.

Aislamiento de la microbiota cultivable

En la placa de cultivo de dilución 10^{-3} fue posible visualizar colonias bien aisladas y se seleccionaron las que eran morfológicamente diferentes teniendo en cuenta el color, los bordes y la textura. Posteriormente, se contaron las colonias formadas a partir de

bound with fish meal, one of the most expensive components of the diet, so there is a tendency to replace it with other components. Achieving efficient digestion and absorption of food from captive fish is one of the goals of producers. The use of probiotics can contribute in this sense. Our research objective is to make the first approach to the identification of the culturable microbiota of *E. morio* and determine its potential as a probiotic to use on improving the digestion and absorption of groupers in captivity.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Adult fish from the natural habitat on the northern coast of Yucatan, México, between Celestun and Dzilam de Bravo were used. Six fish weighing between 3-7 kg kept in captivity in the breeding area of Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Sisal, Facultad de Ciencias, UNAM, were used. The fish were anesthetized with clove oil and a probe was inserted into the cloaca to take a sample of the intestinal contents. The probes were placed in an eppendorf tube with 1 ml of sterile 0.85 % NaCl solution and shaken vigorously to extract the sample. Serial dilutions (10^{-1} - 10^{-3}) were prepared and 100 ml of each were distributed in Petri dishes in duplicate in two types of culture media: marine agar and TSA (tryptone soy agar) and cultivated at 22 °C for 7 days. Bacterial growth began to be monitored 24 hours later. Sampling was carried out once a year in the period between 2019-2024.

Isolation of culturable microbiota

In the 10^{-3} dilution culture plate it was possible to have well isolated colonies and those that were morphologically different considering color, edges and texture were selected. Subsequently, the colonies formed from all samples were counted and the colony forming units per milliliter (CFU/ml) was calculated as following:

UFC/ml= number of colonies counted $\times$ dilution factor/ Sample volume plated. The isolated colonies selected were cultured independently in tryptone soy broth (TSB) and incubated at 37 °C for 24 h in a shaker, then streaked on a plate with TSA medium and incubated at 37 °C for 24 hours. The isolates were named with a code composed of the letters MS referring to the name of the fish (Mero in Spanish) and the method of collecting the gut content samples (Sonda in Spanish), followed by consecutive numbers

todas las muestras y se calcularon las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de la siguiente manera:

UFC/ml= número de colonias contadas × factor de dilución/volumen de muestra sembrado. Las colonias aisladas seleccionadas se cultivaron independientemente en caldo de tripton y soya (TSB) y se incubaron a 37 °C durante 24 h en un agitador; a continuación, se pasaron a una placa con medio TSA y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los aislados se denominaron con un código compuesto por las letras MS que hacen referencia al nombre del pez (Mero en español) y al método de recogida de las muestras de contenido intestinal (Sonda en español), seguidas de números consecutivos (de MS3 a MS36).

Extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación Sanger

A partir del cultivo puro en medio TSB, se obtuvieron los pellets bacterianos por centrifugación. Para la extracción del ADN genómico se utilizó el Quick-DNA fecal/soil Microbe Microprep Kit (Zymo Research). El ADN se cuantificó en un fluorómetro Quantus (Promega Corporation) y se determinó su integridad en un gel de agarosa al 1%. El gen completo del ARNr 16S (~1500 pb) se amplificó mediante PCR y se secuenció con los cebadores 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3'), 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3') y 787R (5'-GGGACTACCAGGGTATCTAAT-3'). La PCR se realizó con los cebadores 8F y 1492R utilizando la mezcla maestra Phusion Flash High Fidelity PCR (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 95 °C 3 min, 30 ciclos 95 °C 45 seg, 50 °C 50 seg, 72 °C 1 min y una extensión final 72 °C 15 min. Los amplicones se purificaron utilizando el DNA Clean & Concentrator TM-25 Kit (Zymo Research) y se enviaron a secuenciar por el método Sanger en el Instituto de Biotecnología UNAM (IBT, Cuernavaca, Morelos, México).

Análisis de secuencias e identificación taxonómica

Las secuencias se editaron con el software libre Chromas versión 2.6.6 (Technelysium Pty. Ltd.) y secuencias del gen casi completo se obtuvieron en Bioedit versión 7.2.5. (Hall, 1999). Se analizaron secuencias de ~1500 pb correspondientes al gen ARNr 16S casi completo.

(from MS3 to MS36).

Genomic DNA extraction, amplification and Sanger sequencing

From the pure culture in TSB medium, the bacterial pellets were obtained by centrifugation. For the extraction of genomic DNA, the Quick-DNA fecal/soil Microbe Microprep Kit (Zymo Research) was used. DNA was quantified in a Quantus Fluorometer (Promega Corporation) and its integrity was determined in a 1% agarose gel. The complete 16SrRNA gene (~1500 bp) was amplified by PCR and sequenced with the primers 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3'), 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3') and 787R (5'-GGGACTACCAGGGTATCTAAT-3'). The PCR was performed with primers 8F and 1492R using the Phusion Flash High Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) according to the instructions of the manufacturer. Amplification conditions were as follows: 95 °C 3 min, 30 cycles 95 °C 45 sec, 50 °C 50 sec, 72 °C 1 min and a final extension 72 °C 15 min. The amplicons were purified using the DNA Clean & Concentrator TM-25 Kit (Zymo Research) and sent to sequence by the Sanger method in the Instituto de Biotecnología UNAM (IBT, Cuernavaca, Morelos, México).

Sequence analysis and taxonomic identification

Sequences were edited in the Chromas free software version 2.6.6 (Technelysium Pty. Ltd.) and sequences of the nearly full gene obtained in Bioedit version 7.2.5. (Hall, 1999). Sequences of ~1500 bp corresponding to the nearly full 16S rRNA gene were analyzed.

To determine the taxonomic identity of the isolates BLASTn program was used. The Core nucleotide database and the Megablast alignment algorithm were used. The hits with the highest percentage of identity and cover percentage = 100% were selected, if several hits coincided with the same identity, the one with the highest percentage of coverage was taken. To confirm the molecular identification of the isolates two strategies were followed: 1) Search in other sequence databases, including RNCentral and SILVA, 2) The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985).

Para determinar la identidad taxonómica de los aislados se utilizó el programa BLASTn. Se utilizó la base de datos de nucleótidos Core y el algoritmo de alineación Megablast. Se seleccionaron las coincidencias con mayor porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura = 100%, si varias coincidían con la misma identidad, se tomó la de mayor porcentaje de cobertura. Para confirmar la identificación molecular de los aislados se siguieron dos estrategias: 1) Búsqueda en otras bases de datos de secuencias, incluidas RNACentral y SILVA, 2) La historia evolutiva se dedujo utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba bootstrap (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) y están en unidades del número de sustituciones de bases por sitio. La variación de la tasa entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1). Este análisis incluyó 89 secuencias nucleotídicas, 22 secuencias procedentes de los aislados obtenidos en nuestro estudio (código de MS3 a MS36), 17 secuencias procedentes de los aciertos resultantes de la alineación en el GenBank de las secuencias de los aislados mediante BLAST (los números de acceso figuran en la Tabla 1), y 36 secuencias de referencia del GenBank que representan todos los géneros identificados en los aislados. Todas las secuencias procedían de genes ARNr 16S. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). En el conjunto de datos final había un total de 1,739 posiciones. Los análisis evolutivos se realizaron en el programa informático MEGA 11 (Tamura et al., 2021). La secuencia del gen ARNr 16S de *Aquificae bacterium* clon SHNS 732 (número de acceso GenBank: HM110206.1) se incluyó como grupo externo.

Actividad amilolítica, quitinolítica y proteolítica

Los aislados conservados a -80 °C se cultivaron en placas TSA a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se inoculó una sola colonia de cada aislado en 2 ml de medio TSB y se incubó a 37 °C durante 24 h con agitación constante. Para determinar la actividad amilolítica, los aislados se cultivaron en medio de agar almidón al 1% y se incubaron a 37 °C durante 24-72 h. A continuación, se realizó la tinción añadiendo Lugol al 1% (Reda et al., 2018). Las muestras positivas mostraban un halo marrón

The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method (Tamura and Nei, 1993) and are in the units of the number of base substitutions per site. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter = 1). This analysis involved 89 nucleotide sequences, 22 sequences from the isolates obtained in our study (code from MS3 to MS36), 17 sequences from the hits resulting from the GenBank alignment of the isolate sequences using BLAST (accession numbers are shown in Table 1), and 36 GenBank reference sequences representing all genera identified in the isolates. All sequences were from 16S rRNA genes. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1739 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 software (Tamura et al., 2021). The 16S rRNA gene sequence of *Aquificae bacterium* clone SHNS 732 (accession number GenBank: HM110206.1) was included as an outgroup.

Amylolytic, chitinolytic and proteolytic activity

The isolates kept at -80 °C were cultivated in TSA plates at 37 °C for 24 h. Subsequently, a single colony of each isolate was inoculated in 2 ml of TSB medium and incubated at 37 °C for 24 h with constant shaking. To determine the amylolytic activity, the isolates were cultivated on 1% starch agar medium and incubated at 37 °C for 24-72 h. Staining was then carried out by adding 1% Lugol (Reda et al., 2018). Positive samples showed a light brown halo around the bacterial growth after staining indicating that the starch has been hydrolyzed; on the contrary, if a deep blue halo was observed, it indicated that the starch had not been hydrolyzed and therefore the isolate was considered negative for the production of starch degrading enzymes. Chitinolytic activity was determined by cultivating the isolates from the inocula in a culture medium containing: 5 g of colloidal chitin, 0.5 g of yeast extract, 0.2 g of peptone and 15 g of agar (Cabra et al., 2014). They were incubated at 37 °C for 72 h. Positive samples would show a transparent halo around them because of the degradation of chitin by hexokinase enzymes. The proteolytic activity was determined by cultivating the inocula in Trypticase Soy Agar culture medium with 10 % skim milk (Reda et al., 2018). Positive samples showed a transparent halo around them indicating casein degradation.

claro alrededor del crecimiento bacteriano tras la tinción, lo que indicaba que el almidón había sido hidrolizado; por el contrario, si se observaba un halo azul intenso, indicaba que el almidón no había sido hidrolizado y, por tanto, el aislado se consideraba negativo para la producción de enzimas degradadoras del almidón. La actividad quitinolítica se determinó cultivando los aislados de los inóculos en un medio de cultivo que contenía: 5 g de quitina coloidal, 0.5 g de extracto de levadura, 0.2 g de peptona y 15 g de agar (Cabra *et al.*, 2014). Se incubaron a 37 °C durante 72 h. Las muestras positivas mostrarían un halo transparente a su alrededor debido a la degradación de la quitina por las enzimas hexoquinasas. La actividad proteolítica se determinó cultivando los inóculos en medio de cultivo Agar de Soya Trypticase con un 10% de leche desnatada (Reda *et al.*, 2018). Las muestras positivas mostraban un halo transparente a su alrededor que indicaba la degradación de la caseína.

RESULTADOS

Caracterización morfológica de la microbiota cultivable

A partir de los cultivos obtenidos del contenido intestinal de peces silvestres y en cautiverio (2019-2024), se pudieron contar las colonias de forma independiente en la dilución 10^{-3} . Se aislaron 22 colonias con diferentes morfologías, 12 en medio TSA y 10 en agar marino. En el medio TSA, las colonias mostraron un tamaño menor en comparación con el medio marino. En el medio marino se observaron colonias de morfología redondeada, diferentes tamaños, colores que incluían claro, oscuro y blanco, beige, y bordes bien definidos. También se observaron colonias redondeadas de diferentes tamaños y de color beige claro y rosa en el medio TSA. El recuento medio de unidades formadoras de colonias en los medios de cultivo Marino y TSA fue de 7.8×10^4 UFC/ 100 μ l y 1.56×10^4 UFC/ 100 μ l respectivamente.

Identidad taxonómica y análisis filogenético

Todas las secuencias presentaban una identidad del 99 % al 100 % con las secuencias del gen ARNr 16S de bacterias de la base de datos GenBank y todos los aislados pudieron asignarse a un género y una especie descritos previamente. La estructura de la microbiota cultivable a nivel de filo estaba formada por Proteobacterias, Firmicutes y Actinobacterias. La especie más representada fue *Photobacterium damsela*. *Shewanella* sp. y *Vibrio* sp. sólo se observaron en muestras cultivadas en medio

RESULTS

Morphological characterization of the culturable microbiota

From the cultures obtained of intestinal contents of wild and captive fish (2019-2024), colonies could be counted independently at the 10^{-3} dilution. Twenty-two colonies with different morphologies were isolated, 12 in TSA medium and 10 in Marine agar. In TSA medium, colonies showed smaller size compared to marine medium. Colonies with round morphology, different sizes, colors including light, dark and white, beige, and well-defined edges were observed in marine medium. Rounded colonies of different sizes, and light beige and pink color were also shown in the TSA medium. The average count of colony-forming units in Marine and TSA culture medium was 7.8×10^4 CFU/ 100 μ l and 1.56×10^4 CFU/ 100 μ l respectively.

Taxonomic identity and phylogenetic analysis

All sequences showed 99 to 100 % identity with 16S rRNA gene sequences of bacteria in the GenBank database and all isolates could be assigned to a previously described genus and species. The structure of the culturable microbiota at the phylum level was formed by Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. The most represented species was *Photobacterium damsela*. *Shewanella* sp. and *Vibrio* sp. were only observed in samples cultured in marine medium. *Enterobacter* sp. and *Bacillus* sp. only grew in TSA medium, unlike *Enterococcus* sp., which grew in marine medium and TSA. *Cytobacillus* sp., *Vibrio* sp., *Acinetobacter* sp., *Shewanella* sp. and *Bacillus* sp. had little presence, it only grew in one sample (Table 1).

marino. *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp. sólo crecieron en medio TSA, a diferencia de *Enterococcus* sp., que creció en medio marino y TSA. *Cytobacillus* sp., *Vibrio* sp., *Acinetobacter* sp., *Shewanella* sp. y *Bacillus* sp. tuvieron poca presencia, sólo crecieron en una muestra (Tabla 1).

Tabla 1. Asignación taxonómica de aislados de la microbiota intestinal de *E. morio* a partir de secuencias de ARNr16S en diferentes bases de datos. / Taxonomic assignment of isolates of *E. morio* gut microbiota from rRNA16S sequences in different databases/Tabla 1. Asignación taxonómica de aislados de la microbiota intestinal de *E. morio* a partir de secuencias de ARNr16S en diferentes bases de datos.

Filo / Phylum	Asignación taxonómica RNAcentral / Taxonomic assignment RNAcentral	Asignación taxonómica SILVA/ Taxonomic assignment SILVA	Asignación taxonómica Genbank / Taxonomic assignment Genbank	Aislado/ Isolate	Medio de cultivo/ Culture medium
Actinobacterias	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.	MS27	TSA
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.	MS31	TSA
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus luteus</i>	MS32	TSA
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus luteus</i>	MS35	TSA
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.	MS36	TSA
Firmicutes	<i>Bacillus infantis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus infantis</i>	MS33	TSA
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Cytobacillus gottheilii</i>	MS18	TSA
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	MS3	TSA
	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus faecium</i>	MS21	Agar marino
	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	MS16	Agar marino
	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus warneri</i>	MS12	Agar marino

El cladograma filogenético mostró los tres filos de los aislados de la microbiota intestinal de *E. morio* (Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes). El filo Proteobacteria fue el más representado con 11 aislados. En el clado más basal se sitúan los aislados MS4, MS22, MS23, MS24, MS25, MS28, MS30, todos los cuales se agruparon con las secuencias de referencia de *P. damselae*. El aislado MS34 se sitúa en el clado del género *Vibrio* sp., coincidiendo con la asignación taxonómica de las bases de datos. El aislado MS26 forma parte del clado del género *Enterobacter*, lo que concuerda con su identificación molecular a partir de bases de datos.

The phylogenetic cladogram showed the three phyla of the isolates from *E. morio* gut microbiota (Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes). The phylum Proteobacteria was the most represented with 11 isolates. In the most basal clade are located the isolates MS4, MS22, MS23, MS24, MS25, MS28, MS30, all of which clustered with the reference sequences of *Photobacterium damselae*. The MS34 isolate is located in the clade of the genus *Vibrio* sp., coinciding with the taxonomic assignment for it from the databases. The MS26 isolate is part of the genus *Enterobacter* clade consistent with its molecular identification from databases.

Del mismo modo, la localización del aislado MS29 coincidió con el clado *Shewanella* sp. MS19 fue el único aislado asociado al clado del género *Acinetobacter* sp. El filo Actinobacteria está representado únicamente por el género *Micrococcus* sp., del que había cinco aislados (MS27, MS31, MS32, MS35, MS36). En todos los casos, se confirma la asignación de género asignado en las bases de datos. El filo Firmicutes está representado por los géneros *Staphylococcus* (aislados MS12 y MS16), *Enterococcus* (aislados MS3 y MS21), *Bacillus* (MS33) y *Cytobacillus* (MS18), lo que coincide con la asignación taxonómica de estos aislados en las bases de datos SILVA, RNACentral y GenBank (Anexo 1).

Actividad amilolítica, quitinolítica y proteolítica

Los resultados de las actividades amilolítica, quitinolítica y proteolítica de los aislados se muestran en la Tabla 2. Los aislados de *Micrococcus* sp. (MS31 y 35) y *Bacillus* sp. (MS33) dieron positivo en las pruebas de actividad amilolítica y proteolítica. Los aislados con actividad amilolítica mostraban un halo marrón alrededor de la colonia, lo que indicaba que el almidón del medio de cultivo se había degradado (Figura 1).

Similarly, the location of MS29 isolate coincided with the *Shewanella* sp. clade. MS19 was the only isolate associated with the clade of the genus *Acinetobacter* sp. The phylum Actinobacteria is represented only by the genus *Micrococcus* sp., of which there were five isolates (MS27, MS31, MS32, MS35, MS36). In all cases, the genus assignment shown in the databases is confirmed. The phylum Firmicutes is composed of the genera *Staphylococcus* (isolates MS12 and MS16), *Enterococcus* (isolates MS3 and MS21), *Bacillus* (MS33) and *Cytobacillus* (MS18) which coincides with the taxonomic assignment of these isolates in SILVA, RNACentral and GenBank databases (Annexe 1).

Amylolytic, chitinolytic and proteolytic activity

The results of the amylyolytic, chitinolytic and proteolytic activities of the isolates are shown in Table 2. The isolates of *Micrococcus* sp. (MS31 and 35) and *Bacillus* sp. (MS33) tested positive for amylyolytic and proteolytic activity. Isolates with amylyolytic activities showed a brown halo around the colony, which indicated that the starch in the culture medium had been degraded (Figure 1).

Tabla 2. Actividad amilolítica, quitinolítica y proteolítica de aislados de la microbiota intestinal de *E. morio*. / **Table 2.** Amylolytic, chitinolytic and proteolytic activity of isolates from the gut microbiota of *E. morio*

Filo/Phylum	Asignación taxonómica GenBank/Taxonomic assignment	Aislado/ Isolate	Actividad amilolítica/ Amylolytic activity	Actividad quitinolítica/ Chitinolytic activity	Actividad proteolítica/ Proteolytic activity
Actinobacterias	<i>Micrococcus</i> sp.	MS27	-	-	-
	<i>Micrococcus</i> sp.	MS31	+	-	+
	<i>Micrococcus luteus</i>	MS32	-	-	-
	<i>Micrococcus luteus</i>	MS35	+	-	+
	<i>Micrococcus</i> sp.	MS36	-	-	-
Firmicutes	<i>Bacillus infantis</i>	MS33	+	-	+
	<i>Cytobacillus gottheilii</i>	MS18	-	-	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	MS3	-	-	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	MS21	-	-	+
	<i>Staphylococcus</i> sp.	MS16	-	-	+
	<i>Staphylococcus warneri</i>	MS12	-	-	+

Tabla 2. Actividad amilolítica, quitinolítica y proteolítica de aislados de la microbiota intestinal de *E. morio*. / **Table 2.** Amylolytic, chitinolytic and proteolytic activity of isolates from the gut microbiota of *E. morio*

Proteobac- terias	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	MS19	-	-	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	MS26	-	-	-
	<i>Shewanella</i> sp.	MS29	-	-	+
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS4	-	-	+
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS22	-	-	-
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS23	-	-	+
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS24	-	-	-
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS25	-	-	+
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS28	-	-	+
	<i>Photobacterium damse- lae</i>	MS30	-	-	+
	<i>Vibrio ponticus</i>	MS34	-	-	+



Figura 1. *Micrococcus* sp. MS35 aislado del contenido intestinal de mero rojo, en medio de cultivo agar almidón 1% teñido con lugol 1%. Positivo en actividad amilolítica.

Figure 1. *Micrococcus* sp. MS35 isolated from the intestinal contents of red grouper, in 1 % Starch agar culture medium stained with 1 % lugol. Positive for amylolytic activity.

Otros aislados sólo dieron positivo en actividad proteolítica, como: *Photobacterium damsela* (MS23, MS25, MS28 y MS30), *Enterococcus* sp. (MS21), *Staphylococcus* sp. (MS16), *Photobacterium* sp. (MS4), *Shewanella* sp. (MS29) y *Vibrio* sp. (MS34). En los aislados que dieron positivo para la actividad proteolítica se observó un cambio de color en el medio de cultivo, volviéndose transparente, lo que indicaba que la proteína láctea del medio de cultivo había sido degradada (Figura 2). La actividad quitinolítica fue negativa para todos los aislados.

Other isolates only tested positive for proteolytic activity such as: *Photobacterium damsela* (MS23, MS25, MS28 and MS30), *Enterococcus* sp. (MS21), *Staphylococcus* sp. (MS16), *Photobacterium* sp. (MS4), *Shewanella* sp. (MS29) and *Vibrio* sp. (MS34). In isolates that tested positive for proteolytic activity a color change was observed in the culture medium, becoming transparent, which indicated that the milk protein in the culture medium had been degraded (Figure 2). Chitinolytic activity was negative for all isolates.



Figura 2. *Micrococcus* sp. MS35 aislado del contenido intestinal de mero rojo, en medio de cultivo agar tripticasa de soja con 10 % de leche desnatada. Izquierda: medio de cultivo sin bacterias. Derecha: medio de cultivo con crecimiento de *Micrococcus* sp. MS35 aislado positivo para actividad proteolítica.

Figure 2. *Micrococcus* sp. MS35 isolated from the intestinal contents of red grouper, in culture medium trypticase soy agar with 10 % skim milk. Left: culture medium without bacteria. Right: culture medium with growth of *Micrococcus* sp. MS35 isolate positive for proteolytic activity

DISCUSIÓN

Asignación taxonómica

La aplicación tanto de la microbiología tradicional como de herramientas moleculares para la identificación de la microbiota intestinal es una estrategia útil para caracterizar las bacterias cultivables en acuicultura, aunque se trata de un enfoque que permite inferir la taxonomía sobre todo a nivel de género, alcanzando en unos pocos casos el nivel de especie. Esto se debe a que el gen ARNr 16S, a pesar de tener regiones hipervariables, es un gen muy conservado en bacterias, por lo que su secuencia es muy similar en muchas especies. Esto hace que estos métodos no sean 100% fiables para la asignación taxonómica a nivel de especie. SILVA es una base de datos

DISCUSSION

Taxonomic assignment

The application of both traditional microbiology and molecular tools for the identification of gut microbiota is a useful strategy to characterize culturable bacteria in aquaculture, although it is an approach that allows taxonomy to be inferred mostly at the genus level, in a few cases reaching the species level. This is because the 16S rRNA gene, despite having hypervariable regions, is a highly conserved gene in bacteria, therefore its sequence is very similar in many species. This makes these methods not 100 % reliable for taxonomic assignment at the species level. SILVA is a database that can be considered more conservative, and for the 16S rRNA gene, it makes assignments at the genus level.

que puede considerarse más conservadora, y para el gen ARNr 16S, realiza asignaciones a nivel de género. Sin embargo, las bases de datos RNCentral y GenBank asignaron estos aislados al nivel de especie ([Anexo 1. material suplementario](#)). Teniendo en cuenta la limitación con las bases de datos para llegar a la asignación a nivel de especie y la ubicación de los aislados en la filogenia, decidimos hacer la asignación taxonómica hasta el nivel de género, con la excepción de los aislados de *P. damselae*, que presentan una fuerte similitud en la filogenia de todos los aislados con las secuencias de referencia de *P. damselae*.

Cultivar y caracterizar la microbiota del mero rojo permitirá seguir estudiando su potencial como probiótico, así como su contribución a la nutrición y al sistema inmunitario del huésped ([Nayak, 2010](#)). Nuestros resultados mostraron que la estructura de la microbiota intestinal cultivable del mero rojo estaba compuesta por Proteobacterias, Firmicutes y Actinobacterias. Estos resultados concuerdan con los de [Tang Xiao et al. \(2021\)](#) que estudiaron el perfil de la microbiota en *Epinephelus coioides*, donde se determinó que Proteobacteria y Firmicutes eran los filos bacterianos más abundantes. Estudios recientes destacan que los filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes y Tenericutes son los más dominantes en el tracto gastrointestinal de los peces teleósteos ([Egerton et al., 2018](#); [Wang et al., 2018](#), [Perry et al., 2020](#), [Biyun et al., 2024](#)).

Las proteobacterias son un grupo que incluye principalmente bacterias anaerobias Gram negativas, con una amplia diversidad morfológica. Tienen gran importancia en el metabolismo funcional, fundamentalmente en el proceso de fijación de nitrógeno ([Yarza, 2014](#)). Se ha informado ampliamente de la presencia de bacterias de este grupo en peces carnívoros marinos, lo que indica que desempeñan un papel importante en las funciones vitales del hospedador. Se ha informado que las Proteobacterias podrían contribuir al proceso digestivo en la especie *Paracanthurus hepatus* (pez cirujano paleta), aportando varias enzimas ([Smriga et al., 2010](#)). [Sun et al. \(2011\)](#) afirmaron que algunos géneros de Proteobacterias pueden contribuir a la asimilación de la dieta y que su ausencia podría causar una disminución en el crecimiento de peces como *Epinephelus coioides*.

En nuestro estudio, las Proteobacterias constituyen el filo más abundante, lo que también se ha señalado en un estudio con individuos juveniles y preadultos de *Seriola lalandi* (medregal de cola amarilla). La composición de la microbiota se caracterizó

However, RNCentral and GenBank databases assigned these isolates to the species level ([Anex 1. supplementary material](#)). Considering the mentioned limitation of this method and regarding the databases to reach assignment at the species level and the location of the isolates in the phylogeny, we decided to make the taxonomic assignment up to the genus level, with the exception of the isolates of *Photobacterium damselae*, which have a strong similarity in the phylogeny of all the isolates with the reference sequences of *P. damselae*.

Cultivating and characterizing the red grouper microbiota will allow further study of its potential as probiotics as well as its contribution to nutrition and the host's immune system ([Nayak, 2010](#)). Our results showed that the structure of the culturable intestinal microbiota of the red grouper was composed of Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. These results agree with [Tang Xiao et al. \(2021\)](#) studying the microbiota profile in the grouper *E. coioides* where it was determined that Proteobacteria and Firmicutes were the most abundant bacterial phyla. Recent studies highlight that the phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes, and Tenericutes are the most dominant in the gastrointestinal tract of teleost fish ([Egerton et al., 2018](#); [Wang et al., 2018](#); [Perry et al., 2020](#); [Biyun et al., 2024](#)).

Proteobacteria is a group that includes mostly Gram-negative anaerobic bacteria, with a wide morphological diversity. They have great importance in functional metabolism, fundamentally in the nitrogen fixation process ([Yarza, 2014](#)). Bacteria of this group have been widely reported in marine carnivorous fish, indicating that they play an important role in the vital functions of the host. It has been reported that Proteobacteria could contribute to the digestive process in the species *Paracanthurus hepatus* (palette surgeonfish), providing several enzymes ([Smriga et al., 2010](#)). [Sun et al. \(2011\)](#) stated that some genera of Proteobacteria can contribute to the assimilation of the diet and that their absence could cause a decrease in the growth of fish such as the orange-spotted grouper *E. coioides*.

In our study, Proteobacteria constitute the most abundant phylum, which has also been reported in a study with juvenile and pre-adult individuals of *Seriola lalandi* (yellowtail amberjack). The composition of the microbiota was characterized by traditional isolation in trypticase soy agar (TSA) culture medium followed by sequencing and taxonomic identification by 16S rRNA.

mediante aislamiento tradicional en medio de cultivo de agar de soya triptícase (TSA), seguido de secuenciación e identificación taxonómica por ARNr 16S. Las Proteobacterias tenían una abundancia relativa del 46 % y se observó que una disminución de las Proteobacterias de clase Gamma en la microbiota intestinal podría ser la causa del bajo crecimiento en cultivo (Aguilera *et al.*, 2013).

Entre las Proteobacterias que aislamos del contenido intestinal de meros rojos silvestres adultos, la especie más representada fue *P. damsela* (aislados MS4, MS22, MS23, MS24, MS25, MS30), registrado como un patógeno generalista que afecta a una amplia variedad de peces, camarones, moluscos y crustáceos (Rivas *et al.*, 2013). Se ha documentado que la presencia de *P. damsela* en peces en cautiverio puede estar relacionada con condiciones de estrés (Magarinos *et al.*, 2001). También se han aislado *Photobacterium* sp. del contenido intestinal de robalos (*Centropomus* sp.) en medio de cultivo de caldo Man-Rogosa Sharpe (MRS) (Zatán *et al.*, 2020).

También se identificó *Acinetobacter* sp. (aislado MS19) en la microbiota cultivable del mero rojo, que son bacilos gramnegativos, no fermentadores, considerados patógenos oportunistas. Solo hay unos pocos estudios que registran de *A. lwoffii* como patógeno de peces, pero recientemente seis cepas bacterianas, aisladas de peces enfermos del género *Schizothorax*, fueron identificadas como *A. lwoffii* mediante morfología, pruebas bioquímicas y análisis de secuenciación del gen ARNr 16S (Kozłowska *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2018). Tienen una amplia distribución en el agua, el suelo, las plantas y los organismos acuáticos. La presencia de esta bacteria puede deberse a que en los peces en cautiverio suelen aparecer bacterias patógenas oportunistas asociadas a enfermedades propias del manejo en granja (Alcántara *et al.*, 2022).

También se identificó *Vibrio* sp. (aislado MS34) en la microbiota cultivable del mero rojo, aunque su presencia sólo se observó en un aislado de los 22 identificados. Es un bacilo patógeno gramnegativo con peligro potencial para los animales de acuicultura y está ampliamente distribuido entre los medios acuáticos (Gai *et al.*, 2022). Es posible que la presencia de *Vibrio* sp. en la microbiota intestinal del mero rojo en cautividad esté relacionada con la presencia de parásitos en algunos individuos notificada durante la manipulación.

Proteobacteria had a relative abundance of 46% and it was observed that a decrease in Gamma class Proteobacteria in the intestinal microbiota could be the cause of low growth in culture (Aguilera *et al.*, 2013).

Among the Proteobacteria that we isolated from the intestinal content of adult wild red grouper, the most represented species was *Photobacterium damsela* (MS4, MS22, MS23, MS24, MS25, MS30 isolates), reported as a generalist pathogen that affects a wide variety of fish, shrimp, mollusks and crustaceans (Rivas *et al.*, 2013). It has been documented that the presence of *P. damsela* in captive fish may be related to stress conditions (Magarinos *et al.*, 2001). *Photobacterium* sp. have also been isolated from the intestinal contents of snook (*Centropomus* sp.) in Man-Rogosa Sharpe (MRS) broth culture medium (Zatán *et al.*, 2020).

We also identified *Acinetobacter* sp. (MS19 isolate) in the culturable microbiota of the red grouper, which are gram-negative, non-fermentative bacilli, considered opportunistic pathogens. There are only a few studies reporting *A. lwoffii* as a pathogen of fish but recently six bacterial strains, isolated from diseased fish of the genus *Schizothorax*, were identified as *A. lwoffii* by morphology, biochemical tests and 16S rRNA gene sequencing analysis (Kozłowska *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2018). They have a wide distribution in water, soil, plants and aquatic organisms. The presence of this bacteria may be due to the fact that opportunistic pathogenic bacteria usually appear in captive fish associated with diseases typical of farm management (Alcántara *et al.*, 2022).

Vibrio sp. (MS34 isolate) was also identified in the culturable microbiota of red grouper although its presence was only observed in one isolate of the 22 identified. It is a Gram-negative bacillus pathogen with potential danger for aquaculture animals and is widely distributed among aquatic environments (Gai *et al.*, 2022). It is possible that the presence of *Vibrio* sp. in the intestinal microbiota of red grouper in captivity is related to the presence of parasites in some individuals reported during handling.

The pathogenicity of *Vibrio ponticus* was evaluated by the lethal dose test in coral trout. The fish were infested with an intramuscular injection of the isolate at different concentrations. Only the test fish challenged with the most concentrated isolate were found to exhibit a cumulative mortality of 100 % indicating that *V. ponticus* was pathogenic to the coral trout. The test fish

La patogenicidad de *Vibrio ponticus* se evaluó mediante la prueba de la dosis letal en la trucha coralina. Los peces fueron infectados con una inyección intramuscular del aislado a diferentes concentraciones. Sólo los peces sometidos a la prueba con el aislado más concentrado mostraron una mortalidad acumulada del 100 %, lo que indica que *V. ponticus* era patógeno para la trucha de coral. Los peces sometidos al desafío con el aislado mostraron signos de necrosis hepática y degeneración vacuolar de las células hepáticas (Gai *et al.*, 2022).

En los peces en cautiverio es normal la presencia de microorganismos porque los sistemas de cultivo no son asépticos. En este estudio, aunque hemos detectado la presencia de bacterias patógenas, ningún animal mostró signos de enfermedades por bacteriosis. Esto indica que sus condiciones fisiológicas y su sistema inmunitario son competentes y que, a pesar de la presencia de estas bacterias patógenas, los peces son capaces de crecer, desarrollarse y reproducirse con éxito. Tal vez la carga bacteriana no sea lo suficientemente alta como para causar enfermedades en estos peces en cautiverio.

Shewanella sp. (aislado MS29) también se encontraba en la microbiota intestinal de *E. morio* aunque sólo en un aislado de los 22 identificados. La mayoría de las especies del género *Shewanella* habitan en entornos acuáticos extremos, sus características distintivas incluyen una diversidad respiratoria sin precedentes y la capacidad de prosperar a bajas temperaturas (Hau y Gralnick., 2007).

Enterococcus sp. (aislados MS3 y MS21) fue uno de los géneros del filo Firmicutes que se identificó en la microbiota cultivable del mero rojo, un microorganismo anaerobio facultativo Gram positivo. Se ha demostrado que esta especie tiene potencial como probiótico en peces, lo que se abordará más adelante (Kim *et al.*, 2012).

También se aisló *Staphylococcus* sp. (MS12 y MS16) del contenido intestinal del mero rojo. El género *Staphylococcus*, que incluye especies como *S. aureus* y *S. epidermidis*, puede encontrarse en diferentes medios acuáticos y en peces, a menudo como parte de su microbiota normal o en infecciones asociadas a heridas o a una mala manipulación (Abedin *et al.*, 2020). Se ha aislado *S. warneri*, una bacteria Gram-positiva, de la epidermis de la piel de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Staphylococcus warneri* se aisló de células epiteliales sanas de la piel de truchas

challenged with isolate displayed the liver necrosis sign and the vacuolar degeneration of liver cells (Gai *et al.*, 2022).

In captivity fish it is normal the presence of microorganisms because culture systems are not aseptic. In our study, although we have detected the presence of pathogenic bacteria, no animal showed signs of bacteriosis diseases. This indicates that their physiological conditions and immune system are competent, and despite the presence of these pathogenic bacteria, the fish are capable of growing, developing and reproducing successfully. Perhaps the bacterial load is not high enough to cause disease in these captive fish.

Shewanella sp. (MS29 isolated) was also in the gut microbiota of *E. morio* although in only one isolate of the 22 identified. Most species of the genus *Shewanella* inhabit extreme aquatic environments, their hallmark features include unparalleled respiratory diversity and the capacity to thrive at low temperatures (Hau and Gralnick., 2007).

Enterococcus sp. (MS3 and MS21 isolates) was one of the genera of the phylum Firmicutes that was identified in the culturable microbiota of red grouper, a Gram-positive facultative anaerobic microorganism. It has been shown that this species has potential as a probiotic in fish, which will be addressed later (Kim *et al.*, 2012).

Staphylococcus sp. (MS12 and MS16) was also isolated from the intestinal contents of red grouper. The genus *Staphylococcus*, which includes species such as *S. aureus* and *S. epidermidis*, can be found in different aquatic environments and in fish, often as part of their normal microbiota or in infections associated with wounds or mishandling (Abedin *et al.*, 2020). *Staphylococcus warneri*, a Gram-positive bacterium, has been isolated from the skin epidermis of rainbow trout (*O. mykiss*). *Staphylococcus warneri* was isolated from healthy hatchery trout skin epithelial cells. This study demonstrated that *S. warneri* have the potential to become indirect pathobionts by enhancing growth and biofilm formation of pathogens such as *Vibrio anguillarum* (Musharrafieh *et al.*, 2014).

Bacillus sp. (MS33) was also isolated from *E. morio* gut microbiota, this is a species that has potential as a probiotic due to its ability to produce antimicrobial substances that are active against many microorganisms (Kuebutornye *et al.*, 2019). Finally, among the Actinobacteria that were isolated from the intestinal

de criadero. Este estudio demostró que *S. warneri* tiene el potencial de convertirse en patógeno indirecto al potenciar el crecimiento y la formación de biopelículas de patógenos como *Vibrio anguillarum* (Musharrafieh *et al.*, 2014).

También se aisló *Bacillus* sp. (MS33) de la microbiota intestinal de *E. morio*, esta es una especie que tiene potencial como probiótico debido a su capacidad para producir sustancias antimicrobianas que son activas contra muchos microorganismos (Kuebutornye *et al.*, 2019). Por último, entre las Actinobacterias que se aislaron del tracto intestinal del mero rojo se encontraba *Micrococcus* sp., una especie que suele ser inofensiva, pero que puede convertirse en un patógeno oportunista. Sobrevive en ambientes oligotróficos durante largos periodos de tiempo. Se ha aislado previamente del intestino de otros peces, e incluso se ha estudiado su potencial como probiótico, estimulante del crecimiento y promotor del sistema inmunitario en la tilapia del Nilo (El-Rhman *et al.*, 2009).

Potencial probiótico

Las bacterias presentes en la microbiota intestinal desempeñan un papel importante en la alimentación y la salud del huésped, de ahí que se atribuya su potencial como probiótico. Los probióticos podrían estimular el crecimiento aportando nutrientes, aumentar las actividades de las enzimas digestivas y la absorción de alimentos, mejorar la respuesta inmunitaria y modular la colonización microbiana (Selim y Reda, 2015; Xiao *et al.*, 2021).

Epinephelus morio en condiciones naturales tiene una dieta amplia compuesta por peces más pequeños, crustáceos y pulpos. Los peces en cautiverio utilizados en este estudio tenían una dieta basada en alimentos semi-húmedos compuestos por calamares, pescado, camarón, harina de pescado, pasta de soya, aceite de hígado de bacalao y premezcla vitamínica, por lo que la microbiota intestinal puede variar. Se ha descrito anteriormente que comparando la microbiota de peces que viven en lagos, arroyos y mares, las mayores diferencias en las comunidades microbianas se obtuvieron por factores relacionados con el hábitat del hospedero (Kim *et al.*, 2021). Aislar bacterias del intestino de *E. morio* con capacidad para degradar proteínas y carbohidratos permitirá diseñar un consorcio con potencial probiótico que pueda ser utilizado en la alimentación de individuos de mero rojo en cautiverio. En este estudio, se centró en evaluar la actividad amilolítica, quitinolítica y proteolítica de los aislados como

tract of the red grouper was *Micrococcus* sp., a species that is generally harmless, but can become an opportunistic pathogen. It survives in oligotrophic environments for long periods of time. It has been previously isolated from the intestine of other fish, and its potential as a probiotic, stimulating growth and as a promoter of the immune system in Nile Tilapia has even been studied (El-Rhman *et al.*, 2009).

Probiotic potential

The bacteria present in the gut microbiota play an important role in the diet and health of the host, hence its potential as a probiotic is attributed. Probiotics could stimulate growth by providing nutrients, increase the activities of digestive enzymes and food absorption, improve the immune response and modulate microbial colonization (Selim and Reda, 2015; Xiao *et al.*, 2021).

Epinephelus morio in natural conditions have a broad diet composed of smaller fish, crustaceans and octopuses. The captive fish used in our study had a diet based on semi-moist food composed of squid, fish, shrimp, fish meal, soybean paste, cod liver oil and vitamin premix so the gut microbiota can vary. It has been previously described that comparing the microbiota of fish that live in lakes, streams and the seas the largest differences in microbial communities were obtained for factors related to the host habitat (Kim *et al.*, 2021). Isolating bacteria from the intestine of *E. morio* with the capacity to degrade protein and carbohydrates will allow us to design a consortium with probiotic potential that can be used in feeding captive red grouper individuals. In our study, we focused on evaluating the amylolytic, chitinolytic and proteolytic activity of the isolates as a potential probiotic that contribute to nutrition and absorption of elements of the diet.

Proteolytic activity in most isolates could be explained by the red grouper carnivorous feeding habits, so it would be expected to find some bacteria with the capacity to degrade proteins.

We have not found chitinolytic activity in any of the isolates, this might be explained by the fact that the samples were taken in the distal part of the intestine and the degradation of chitin is something that is needed in the first instance when ingesting foods with chitinous cuticle, such as crabs. Perhaps in the anterior and middle portion of the intestine would be more likely to find bacteria with this activity, more studies would be necessary to confirm this assumption.

probiótico potencial que contribuye a la nutrición y absorción de elementos de la dieta.

La actividad proteolítica en la mayoría de los aislados podría explicarse por los hábitos alimentarios carnívoros del mero rojo, por lo que cabría esperar encontrar algunas bacterias con capacidad para degradar proteínas. No se encontró actividad quitinolítica en ninguno de los aislados, esto podría explicarse por el hecho de que las muestras se tomaron en la parte distal del intestino y la degradación de la quitina es algo que se necesita en primera instancia cuando se ingieren alimentos con cutícula quitinosa, como los cangrejos. Quizás en la porción anterior y media del intestino sería más probable encontrar bacterias con esta actividad, serían necesarios más estudios para confirmar esta suposición.

Para seleccionar los aislados con potencial probiótico, se analizarán las actividades enzimáticas y se tendrán en cuenta otros factores para la posterior selección. Según las actividades líticas, los aislados que podrían considerarse para el consorcio serían: MS33 (*Bacillus* sp.), MS35 y MS31 *Micrococcus* sp. (por su actividad amilolítica y proteolítica). Varias especies de estos géneros se han descubierto y utilizado como probióticos para mejorar el crecimiento y la inmunidad de las especies acuícolas (Kuebutornye *et al.*, 2019).

Se han estudiado las propiedades probióticas de *Bacillus infantis* aislado del tracto gastrointestinal del pez rohu (*Labeo rohita*). Los resultados indicaron que *B. infantis* posee buenas propiedades probióticas esenciales, con resistencia a los ácidos, las sales biliares y los jugos gástricos, así como una buena capacidad de adherencia a los hidrocarburos, y un efecto altamente antagonista contra los patógenos de los peces que sobreviven en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, puede actuar como probiótico potencial mejorando la inmunidad e inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos nocivos (Dharmaraj *et al.*, 2014).

Se probó el efecto probiótico de *Micrococcus luteus* en la tilapia del Nilo. El mayor crecimiento, conversión alimenticia y eficiencia proteica (ganancia de peso/proteína) y respuesta inmunitaria frente a patógenos se consiguió cuando se utilizó *M. luteus* como probiótico. Los autores concluyeron que *M. luteus* mejoraba los parámetros inmunitarios inespecíficos en la tilapia del Nilo (El-Rhman *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha demostrado que *M. luteus* puede

To select the isolates with probiotic potential, the enzymatic activities will be analyzed and other factors will be considered for the subsequent selection. According to lytic activities, the isolates that could be considered for the consortium would be: MS33 (*Bacillus* sp.), MS35 and MS31 *Micrococcus* sp. (for its amylolytic and proteolytic activity). Several species of these genera have been discovered and used as probiotics to improve the growth and immunity of aquaculture species (Kuebutornye *et al.*, 2019).

The probiotic properties of *Bacillus infantis* isolated from the gastrointestinal tract of rohu labeo (*Labeo rohita*) have been studied. The results indicated that *B. infantis* had good essential probiotics properties, having resistance to acid, bile salt, gastric juice condition, as well as a good capacity for adherence to hydrocarbons, and highly antagonistic effect against fish pathogens which survive in gastrointestinal tract. Therefore, it can act as potential probiotics enhancing the immunity and inhibiting the growth of other harmful microorganisms (Dharmaraj *et al.*, 2014).

The probiotic effect of *Micrococcus luteus* was tested in Nile Tilapia. The highest growth, feed conversion and protein efficiency (weight gain/g protein) and immune response against pathogens was achieved when *M. luteus* was used as a probiotic. Authors concluded that *M. luteus* improved non-specific immune parameters in Nile Tilapia (El-Rhman *et al.*, 2009).

Recently, it has been shown that *Micrococcus luteus* can be considered an emergent opportunistic pathogen in Tilapia from India. Naturally infected fish displayed lethargy, skin discoloration and erosion, detached scales, petechial hemorrhages, congestion and fin rot, and exophthalmia. The post-mortem examination indicated intestinal inflammation, liver congestion, hemorrhages, and distended gallbladder (Suresh *et al.*, 2024). However, studies in other species are needed to confirm this potential.

The MS21 isolate (*Enterococcus* sp.) could also be a candidate for the consortium due to its proteolytic activity. It has been shown the probiotic effect of *Enterococcus faecium* on the immune response of *Paralichthys olivaceus* (bastard halibut) to combat the pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in previous studies. One study revealed that *E. faecium* induced immune-responsive compounds, protecting the marine fish *P. olivaceus* from lactococcosis (Kim *et al.*, 2012).

The MS29 isolate (*Shewanella* sp.) is another species that

considerarse un patógeno oportunista emergente en la tilapia de la India. Los peces infectados de forma natural presentaban letargo, decoloración y erosión de la piel, escamas desprendidas, hemorragias petequiales, congestión y putrefacción de las aletas, y exoftalmia. El examen post mortem indicó inflamación intestinal, congestión hepática, hemorragias y vesícula biliar distendida (Kummari *et al.*, 2024). Sin embargo, se necesitan estudios en otras especies para confirmar este potencial.

El aislado MS21 (*Enterococcus* sp.) también podría ser un candidato para el consorcio debido a su actividad proteolítica. En estudios anteriores se ha demostrado el efecto probiótico de *Enterococcus faecium* sobre la respuesta inmunitaria de *Paralichthys olivaceus* (halibut bastardo) para combatir la patogenicidad de *Lactococcus garvieae*. Un estudio reveló que *Enterococcus faecium* inducía compuestos inmunoresponsivos, protegiendo al pez marino *P. olivaceus* de la lactococosis (Kim *et al.*, 2012).

El aislado MS29 (*Shewanella* sp.) es otra especie que se recomienda como candidata para el consorcio bacteriano por la actividad proteolítica demostrada en este estudio. Se ha demostrado que la especie *Shewanella putrefaciens* tiene características probióticas en varias especies acuícolas. Entre los beneficios que aporta a sus huéspedes figuran una mayor protección contra las infecciones bacterianas, efectos sobre el sistema inmunitario, mayor crecimiento, mejor composición corporal y mejor aprovechamiento de los alimentos. También puede reducir la presencia de patógenos en el intestino, ayuda a sintetizar una mayor cantidad de ácidos grasos beneficiosos y a reducir el número y tamaño de las gotas de lípidos tanto en el hígado como en el intestino (Tapia-Paniagua *et al.*, 2014).

A pesar de la actividad proteolítica de MS34 (*Vibrio* sp.), MS4 (*P. damsela*) y MS16 (*Staphylococcus* sp.) estos aislados no son buenos candidatos para el consorcio bacteriano debido a su patogenicidad. Basándose en los resultados de este estudio, los aislados que se proponen para diseñar el consorcio con potencial probiótico son: MS31 y MS35 (*Micrococcus* sp.), MS33 (*Bacillus* sp.), MS21 (*Enterococcus* sp.) y MS29 (*Shewanella* sp.)

CONCLUSIONES

El uso de técnicas tanto de microbiología tradicional como de secuenciación del gen ARNr 16S permitió identificar la

we recommend as a candidate for the bacterial consortium for the proteolytic activity demonstrated in this study. It has been shown that the species *Shewanella putrefaciens* has probiotic characteristics on several aquaculture species. Among the benefits it provides to its hosts are greater protection against bacterial infections, effects on the immune system, greater growth, better body composition and better use of food. It can also reduce the presence of pathogens in the intestine, helps synthesize a greater amount of beneficial fatty acids and reduce the number and size of lipid droplets in both the liver and the intestine (Tapia-Paniagua *et al.*, 2014).

Despite the proteolytic activity of MS34 (*Vibrio* sp.), MS4 (*Photobacterium damsela*) and MS16 (*Staphylococcus* sp.) these isolates are not good candidates for the bacterial consortium due to its pathogenicity. Based on the findings of this study, the isolates that are proposed to design the consortium with probiotic potential are: MS31 and MS35 (*Micrococcus* sp.), MS33 (*Bacillus* sp.), MS21 (*Enterococcus* sp.) and MS29 (*Shewanella* sp.)

CONCLUSIONS

The use of both traditional microbiology and 16S rRNA gene sequencing techniques allowed us to identify the culturable gut microbiota of *Epinephelus morio* (red grouper). The composition of the red grouper microbiota agrees with the results in other studies performed in marine fish. *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. and *Shewanella* sp. showed lytic activity so it can be proposed as candidates to be used as probiotics. Its use in the diet of red grouper individuals in captivity could help the digestion and absorption of food. Isolates that might be pathogens were not selected as candidates for the bacterial consortium although they showed lytic activities. To validate the probiotic potential of these isolates further studies will be necessary. The use of bacteria isolated from the red grouper's own intestinal tract as probiotics may be beneficial because these bacteria are already adapted to the physiological environment of the digestive system of red grouper, and there is a greater chance of success when incorporated into the diet. This study is the first to report culturable gut microbiota of *Epinephelus morio* and represents a contribution to the knowledge of the microbiota from marine fish and its probiotic potential.

microbiota intestinal cultivable de *Epinephelus morio* (mero rojo). La composición de la microbiota del mero rojo coincide con los resultados de otros estudios realizados en peces marinos. *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp. y *Shewanella* sp. mostraron actividad lítica por lo que pueden proponerse como candidatos a ser utilizados como probióticos. Su uso en la dieta de individuos de mero rojo en cautiverio podría ayudar a la digestión y absorción del alimento. Los aislados que podrían ser patógenos no se seleccionaron como candidatos para el consorcio bacteriano aunque mostraban actividades líticas. Para validar el potencial probiótico de estos aislados serán necesarios más estudios. El uso de bacterias aisladas del propio tracto intestinal del mero rojo como probióticos puede ser beneficioso porque estas bacterias ya están adaptadas al entorno fisiológico del sistema digestivo del mero rojo, y hay más posibilidades de éxito cuando se incorporan a la dieta. Este estudio es el primero en informar sobre la microbiota intestinal cultivable de *Epinephelus morio* y representa una contribución al conocimiento de la microbiota de los peces marinos y su potencial probiótico.

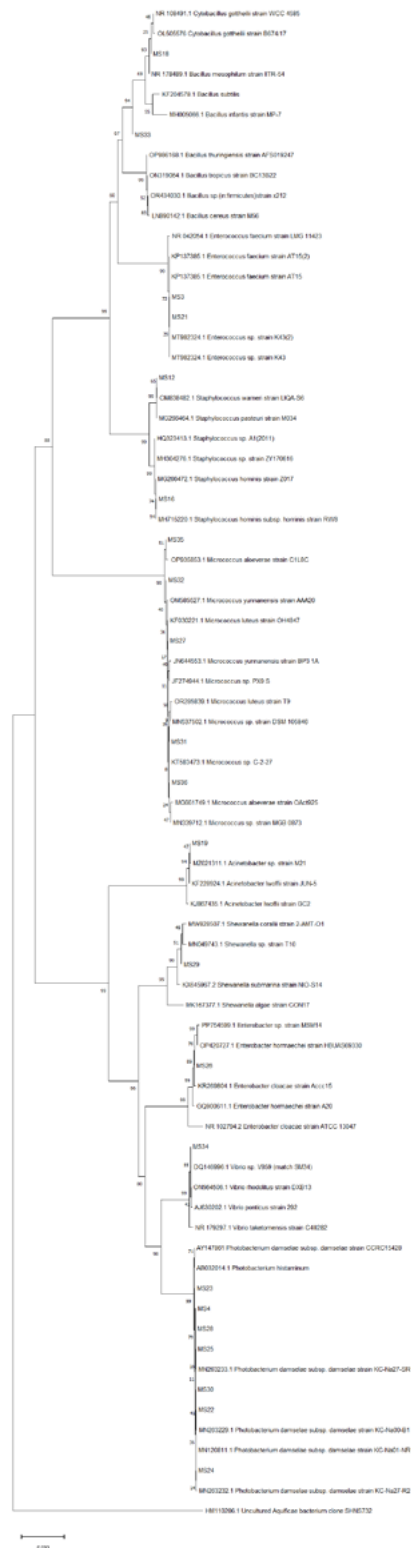
AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (Papiit-It200522) y el proyecto “Biotecnología del mero rojo *Epinephelus morio*” (UNAM-Sepasy). Los autores agradecen a la Secihti su apoyo financiero mediante la beca postdoctoral concedida a la Dra. Grecia Montalvo y al Dr. Manuel Valenzuela Jiménez por su apoyo en la recolección y el mantenimiento de meros.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by UNAM Research and Technological Innovation Projects Support Program (PAPIIT-IT200522) and the project “Biotechnology of the red grouper *Epinephelus morio*” (UNAM-SEPASY). The authors thank SECIHTI for financial support and the postdoctoral scholarship to. Grecia Montalvo and Manuel Valenzuela Jiménez his support to collect and the maintenance of groupers.

ANEXOS/ANNEXES



Anexo 1. Relaciones filogenéticas, basadas en la secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S, de los aislados de la microbiota intestinal del mero rojo y las secuencias de referencia depositadas en GenBank. El árbol filogenético se generó mediante el método Neighbor-Joining con el programa informático MEGA 11. La asignación taxonómica de los aislados se muestra en la [Tabla 1](#).

Annexes1. Phylogenetic relationships, based on 16S rRNA gene nucleotide sequence, between isolates of gut microbiota of the red grouper and reference sequences deposited in GenBank. Phylogenetic tree was generated using the Neighbor-Joining method by the MEGA 11 software. The taxonomic assignment of the isolates is shown in [Table 1](#).

BIBLIOGRAFÍA/LITERATURE CITED

- Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E. and Shalaby, A.M.E. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), pp.175–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020>.
- Abedin, M.Z., Rahman, S., Hasan, R., Shathi, J.H., Jarin, L. and Uz Zaman, S. (2020). Isolation, identification, and antimicrobial profiling of bacteria from aquaculture fishes in pond water of Bangladesh. *American Journal of Pure and Applied Biosciences*, 2(3), pp.39–50. <https://doi.org/10.34104/ajpab.020.039050>.
- Aguilera, E., Yany, G. and Romero, J. (2013). Cultivable intestinal microbiota of yellow-tail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(3), pp.395–403. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue3-fulltext-3>.
- Alcántara-Jauregui, F.M., Valladares-Carranza, B. and Ortega, C. (2022). Enfermedades bacterianas y sus agentes etiológicos identificados en peces de México - Una revisión. *Revista MVZ Córdoba*, 27(2), pp.1–12. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2387>.
- Buruiană, C.T., Profir, A.G. and Vizireanu, C. (2014). Effects of probiotic *Bacillus* species in aquaculture. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI - Food Technology*, 38(2), pp.9–17. Available at: <https://www.gup.ugal.ro/ugaljournals/index.php/food/article/view/1741/1470>
- Butt, R.L. and Volkoff, H. (2019). Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00009>.
- Cabra, T., Rodríguez, C.A. y Villota, C.P. (2014). Capacidad antagonista y quitinolítica de microorganismos aislados de residuos de higuera (*Ricinus communis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), pp. 56–61. Available at: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/328/523>
- Cao, S., Geng, Y., Yu, Z., Deng, L., Gan, W., Wang, K., Ou, Y., Chen, D., Huang, X., Zuo, Z., He, M. and Lai, W. (2018). *Acinetobacter lwoffii*, an emerging pathogen for fish in *Schizothorax* genus in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), pp.1816–1822. <https://doi.org/10.1111/tbed.12957>.
- Dehler, C.E., Secombes, C.J. and Martin, S.A.M. (2017). Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, 7(13877), pp.1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13249-8>.
- Dharmaraj, R. and Rajendren, V. (2014). Probiotic assessment of *Bacillus infantis* isolated from gastrointestinal tract of *Labeo rohita*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(7), pp.1–6. Available at: <https://www.ijrpr.org/research-paper-0714/ijrpr-p3188.pdf> [Accessed 30 Apr. 2025].
- do Vale Pereira, G., da Cunha, D.G., Pedreira Mourino, J.L., Rodiles, A., Jaramillo-Torres, A. and Merrifield, D.L. (2017). Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), pp.1298–1311. <https://doi.org/10.1111/jam.13572>.
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K. and Chikindas, M.L. (2016). Bacteriocins: Not only antibacterial agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(4), pp.177–182. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9223-0>.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C. and Ross, R.P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), pp.783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Gai, C., Liu, J., Zheng, X., Xu, L. and Ye, H. (2022). Identification of *Vibrio ponticus* as a bacterial pathogen of coral trout *Plectropomus leopardus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1089247>.
- Ghanbari, M., Kneifel, W. and Domig, K.J. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448(1), pp.464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(2), pp.95–98.
- Hau, H.H. and Gralnick, J.A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology*, 61, pp.287–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. and Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1), pp.1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>.
- Kim, Y.-R., Kim, E.-Y., Choi, S., Hossain, M.T., Oh, R., Heo, W.-S., Lee, J.M., Cho, Y.C. and Kong, I.-S. (2012). Effect of a Probiotic strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), pp.526–529. <https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08047>.
- Kim, P.S., Shin, N.-R., Lee, J.-B., Kim, M.-S., Whon, T.W., Hyun, D.-W., Yun, J.-H., Jung, M.-J., Kim, J.Y. and Bae, J.-W. (2021). Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01113-x>.
- Kozińska, A., Paździor, E., Pękala, A. and Niemczuk, W. (2014). *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens. *Journal of Veterinary Research*, 58(2), pp.193–199. <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0029>.
- Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D. and Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, pp.820–828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>.
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F. and Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Nature. Scientific Reports*, 6(24340), pp.1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>.
- Llewellyn, M.S., Boutin, S., Hoseinifar, S.H. and Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5, pp.1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>.
- López Nadal, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Sipkema, D., Peggs, D., McGurk, C., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F. and Brugman, S. (2020). Feed, microbiota, and gut immunity: Using the zebrafish model to understand fish health. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00114>.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E. and Lamas, J. (2001). Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 195(1-2), pp.17–21. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00547-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00547-0).
- Merrifield, D.L. and Rodiles, A. (2015). The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: B.H. Beck and E. Peatman, eds., *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier, pp.273–295. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>.
- Musharrafieh, R., Tacchi, L., Trujeque, J., LaPatra, S. and Salinas, I. (2014). *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2), pp.80–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.012>.
- Navarrete, P., Espejo, R.T. and Romero, J. (2008). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, 57(3), pp.550–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9448-x>.

- Navarrete, P., Magne, F., Mardones, P., Riveros, M., Opazo, R., Suau, A., Pochart, P. and Romero, J. (2010). Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1), pp.148–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00769.x>.
- Navarrete, P., Magne, F., Arana, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R. and Romero, J. (2012). PCR-TTGE Analysis of 16S rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS One*, 7(2), p.e31335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031335>.
- Nayak, S.K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), pp.1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>.
- Ou, W., Yu, G., Zhang, Y. and Mai, K. (2021). Recent progress in the understanding of the gut microbiota of marine fishes. *Marine Life Science & Technology*, 3(4), pp.434–448. <https://doi.org/10.1007/s42995-021-00094-y>.
- Perry, W.B., Lindsay, E., Payne, C.J., Brodie, C. and Kazlauskaitė, R. (2020). The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1926), p.20200184. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0184>.
- Reda, R.M., Selim, K.M., El-Sayed, H.M. and El-Hady, M.A. (2017). In vitro selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), pp.692–703. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9314-6>.
- Rivas, A.J., Lemos, M.L. and Osorio, C.R. (2013). *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in Microbiology*, 4, pp.283–289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00283>.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp.406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Selim, K.M. and Reda, R.M. (2015). Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2), pp.496–503. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.004>.
- Serra, C.R., Almeida, E.M., Guerreiro, I., Santos, R., Merrifield, D.L., Tavares, F., Oliveira, A. and Enes, P. (2019a). Selection of carbohydrate-active probiotics from the gut of carnivorous fish fed plant-based diets. *Scientific Reports*, 9(1), pp.1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42716-7>.
- Serra, C.R., Almeida, E.M., Guerreiro, I., Santos, R., Merrifield, D.L., Tavares, F., Oliveira, A. and Enes, P. (2019b). Selection of carbohydrate-active probiotics from the gut of carnivorous fish fed plant-based diets. *Scientific Reports*, 9(1), pp.1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42716-7>.
- Smruga, S., Sandin, S.A. and Azam, F. (2010). Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1), pp.31–42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00879.x>.
- Sun, Y., Yang, H., Ling, Z., Chang, J. and Ye, J. (2009). Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *African Journal of Microbiology Research*, 3, pp.713–720. Available at: https://academicjournals.org/article/article1380369856_Yunzhang.pdf [Accessed 7 May 2025].
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L., Zhang, C.X. and Lin, W.Y. (2011). Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 17(3), pp.733–740. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00837.x>.
- Suresh, K., Pillai, D., Soni, M., Rathlavath, S. and Narshivudu, D. (2024). *Micrococcus luteus*, an emerging opportunistic pathogen in farmed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* in Andhra Pradesh, India. *Aquaculture International*, 33(51). <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01761-4>.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology And Evolution*, 38(7), pp.3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tapia-Paniagua, S.T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto-Álamo, M.J., Jurado, J., Cordero, H., Cerzuela, R., García de la Banda, I., Esteban, M.A., Balebona, M.C. and Moriño, M.A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), pp.209–221. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>.
- Tortora, G., Funke, B.R. y Case, C.L. (2007). Introducción a la microbiología. Buenos Aires: Médica Panamericana, p.959.
- Wang, A.R., Ran, C., Ringø, E. and Zhou, Z.G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), pp.626–640. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>.
- Xiao Joe, J.T., Tseng, Y.-C., Wu, J.-L. and Lu, M.-W. (2021). The alteration of intestinal microbiota profile and immune response in *Epinephelus coioides* during pathogen infection. *Life*, 11(2), p.99. <https://doi.org/10.3390/life11020099>.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R. and Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), pp.635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>.
- Zatán Valdiviezo, A.E., Castillo Chunga, D., Castañeda Vargas, A.E., Feria Zavallos, M.A., Toledo Valdiviezo, O.E., Aguilar Zavaleta, J.L., Cueva Távara, M.D. and Motte, E. (2020). Characterization of the intestinal microbiota in snook (*Centropomus* sp.) and isolation of potential probiotic bacteria. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), p.e16036. <https://doi.org/10.15381/rivp.v31i3.16036>.
- Zhang, B., Yang, H., Cai, G., Nie, Q. and Sun, Y. (2024). The interactions between the host immunity and intestinal microorganisms in fish. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(30), pp.1–14. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12934-1>.

