



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización de la diversidad microbiana asociada al tracto gastrointestinal del *Panaque cochliodon* (Cucha de ojos azules)

Juan David Cano Gil

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2023

Caracterización de la diversidad microbiana asociada al tracto gastrointestinal del *Panaque cochliodon* (Cucha de ojos azules)

Juan David Cano Gil

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Ph.D, Carlos Arturo David Ruales

Codirectoras:

Ph.D, Sandra Clemencia Pardo Carrasco

Ph.D, Luz Adriana Gutiérrez Ramírez

Línea de Investigación:

Biotechnología y producción agropecuaria

Grupo de Investigación:

Producción, Desarrollo y Transformación Agropecuaria (GIPDTA).

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2023

Dedicatoria

*Mi apoyo incondicional, una fuente de inspiración constante y un ejemplo de fortaleza y sacrificio, mi madre Sara Gil de Cano. QEPD
21 de Agosto 2023.*

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Juan David Cano Gil

Fecha 02/08/2023

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis profesores por su constante apoyo en el desarrollo de mi tesis, transmitiendo su valiosa experiencia y conocimiento. Agradezco especialmente a Luz Adriana Gutiérrez Ramírez, quien ha sido una guía académica y una madre durante mis años de investigación y trabajo en la Corporación Universitaria Lasallista. También quiero agradecer a Carlos Arturo David Rúales por su paciencia y apoyo incondicional, así como a Sandra Clemencia Pardo Carrasco por toda su gestión y ayuda en la Universidad Nacional de Colombia.

Quiero agradecer a mis amigos Eliana Betancur, Manuela Arboleda, Valentina Jaramillo, Andrés Marín, Camila Yepes, Daniela Sánchez, Juliana Pazos, Diógenes Echeverri, Manuela Mazo, Cristian Cadena, María Zapata, Melissa Morales y David Builes por su constante apoyo, consejos y por motivarme a seguir adelante.

Quiero agradecer al grupo de las niñas del laboratorio, Carolina Vergara, Daniela Hurtado, Marcela Acosta, Vanessa Gallego y Natalia Cadavid, por compartir conmigo valiosas experiencias académicas y por estar siempre ahí, animándome y brindándome su apoyo.

A mi familia mis papás, mis hermanas, sobrinos y Alaska sin ellos, este logro no sería posible.

Resumen

Caracterización de la diversidad microbiana asociada al tracto gastrointestinal del *Panaque cochliodon* (Cucha de ojos azules)

Panaque cochliodon, conocido en Colombia como cucha de ojos azules, es una especie endémica de las cuencas del Cauca y el Magdalena, y está clasificada como vulnerable (A2d) en el Libro Rojo de los Peces de Agua Dulce de Colombia. Este es el primer reporte para Colombia sobre esta especie en medio natural razón por la cual se escogió para este trabajo, además por tener hábitos xilívoros, es decir, que consume madera como principal fuente de alimento para su nutrición, siendo una especie de gran valor biológico para el ecosistema. Se tiene cierto conocimiento sobre su comportamiento básico, adaptación al cautiverio y otras características relacionadas con su alimentación y reproducción, sin embargo, se desconoce por completo su fisiología digestiva y las posibles relaciones simbióticas de los componentes de su microbiota intestinal.

En este estudio se realizó la primera caracterización de la microbiota asociada al tracto gastrointestinal de *Panaque cochliodon*. Para ello, se capturaron y utilizaron tres ejemplares adultos provenientes del río Magdalena, los cuales fueron transportados y sacrificados siguiendo las normas de bienestar animal. Se realizó la disección del tracto intestinal, obteniendo muestras para el aislamiento microbiológico e identificación molecular de los microorganismos cultivables, con el objetivo de obtener información filogenética. Mediante análisis bioinformáticos, se identificaron varios géneros de interés para la producción agropecuaria y de alimentos, como: *Bacillus paramycoides*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus thuringiensis* y *Lactococcus cremoris*. Posteriormente, se realizó un análisis metagenómico utilizando la extracción de ADN de tres secciones intestinales: anterior, media y posterior. El ADN se amplificó mediante PCR y, finalmente, se secuenció utilizando el gen ADNr 16S bacteriano. Como resultado, se identificaron todas las comunidades bacterianas que forman parte de la microbiota intestinal, con una presencia predominante de Proteobacteria, Actinobacteriota, Firmicutes, Bdellovibrionota,

Planctomycetes, Verrucomicrobiota, Spirochaetota y Cyanobacteria. El análisis metagenómico reveló diferencias funcionales entre las comunidades y la abundancia relativa de la microbiota intestinal.

Palabras clave: *Panaque cochliodon*; cucha de ojos azules; microbiota intestinal; Metagenómica; gen ADNr 16S

.

Abstract

Characterization of the microbial diversity associated with the gastrointestinal tract of the *Panaque cochliodon* (Blue-eyed Panaque)

Panaque cochliodon, known in Colombia as blue-eyed pleco, is an endemic species in the Cauca and Magdalena river basins, classified as vulnerable (A2d) in the Red Book of Freshwater Fish of Colombia. This is the first report for Colombia on this species in its natural habitat, which is why it was chosen for this study. Additionally, due to its xylophagous habits—meaning it primarily consumes wood as a source of nutrition—it holds significant biological value for the ecosystem.

While there is some knowledge about its basic behavior, adaptation to captivity, and other characteristics related to its feeding and reproduction, its digestive physiology and potential symbiotic relationships within its intestinal microbiota remain completely unknown.

This study conducted the first characterization of the microbiota associated with the gastrointestinal tract of *Panaque cochliodon*. Three adult specimens from the Magdalena River were captured, transported, and sacrificed following animal welfare standards. Intestinal dissection was performed, obtaining samples for microbiological isolation and molecular identification of cultivable microorganisms to gather phylogenetic information.

Through bioinformatic analysis, several genera of interest for agricultural and food production were identified, including *Bacillus paramycoides*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus thuringiensis*, and *Lactococcus cremoris*. Subsequently, a metagenomic analysis was conducted using DNA extraction from three intestinal sections: anterior, middle, and posterior. DNA was amplified via PCR and sequenced using the bacterial 16S rRNA gene. As a result, all bacterial communities forming part of the intestinal microbiota were identified, with a predominant presence of Proteobacteria, Actinobacteriota, Firmicutes, Bdellovibrionota, Planctomycetes, Verrucomicrobiota, Spirochaetota, and Cyanobacteria. The metagenomic analysis revealed functional differences between communities and the relative abundance of the intestinal microbiota

Keywords: *Panaque cochliodon*; **blue-eyed pleco**; **intestinal microbiota**; **metagenomics**; **bacterial 16S rRNA**

Contenido

	Pág.
1. Capítulo 1. Aspectos básicos del <i>Panaque cochliodon</i> y generales asociadas al régimen alimenticio y microbioma en peces. Capítulo de revisión.....	3
1.1 Bio-ecología de la especie	3
1.2 Variabilidad en hábitos alimenticios en peces	5
1.3 Tracto gastrointestinal en peces	7
1.4 Microbiota en peces.....	9
2. Capítulo 2. Pruebas microbiológicas y bioquímicas para determinar algunas cepas del tracto intestinal en <i>Panaque cochliodon</i>.....	11
2.1 Introducción	11
2.2 Metodología.....	11
2.2.1 Colección y captura de <i>Panaque cochliodon</i>	11
2.2.2 Disección y aislamiento de intestino.....	12
2.2.3 Análisis microbiológico y purificación de microorganismos.....	13
2.2.4 Análisis pruebas bioquímicas	15
2.2.5 Caracterización molecular de la microbiota cultivable.....	16
▪ Cuantificación del ADN de microorganismos cultivables	17
▪ Amplificación por PCR de los microorganismos cultivables.....	18
▪ Electroforesis de los productos de PCR de los microorganismos cultivables.....	19
▪ Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de los microorganismos cultivables.....	20
2.3 Resultados.....	20
2.3.1 Análisis cultivable.....	20
2.3.2 Pruebas bioquímicas.....	24
2.3.3 Caracterización de aislamientos cultivables con secuencias del gen ADNr 16S	26
▪ Afiliación filogenética de los aislamientos cultivables	29
2.4 Discusión	32
3. Capítulo 3. Caracterización molecular de la microbiota no cultivable en <i>Panaque cochliodon</i>.....	37
3.1 Metodología.....	37
3.1.1 Extracción de ADN de microbiota no cultivable del intestino de <i>P. cochliodon</i>	37
▪ Cuantificación del ADN de microbiota no cultivable del intestino de <i>P. cochliodon</i>	38

▪	Amplificación por PCR de secuencias de microbiota no cultivable del intestino de <i>P. cochliodon</i>	39
▪	Electroforesis de los productos de PCR de microbiota no cultivable del intestino de <i>P. cochliodon</i>	40
▪	Secuenciación de la microbiota no cultivable.....	41
▪	Análisis bioinformático de la microbiota no cultivable.....	41
3.2	Resultados	43
3.2.1	Caracterización de microbiota intestinal no cultivable con el gen ADNr 16S ..	43
▪	Electroforesis de los productos de PCR de la microbiota intestinal no cultivable con el gen ADNr 16S	44
▪	Diagramas de flujo de las secuencias genómicas de la microbiota intestinal no cultivable con el gen ADNr 16S	46
▪	Secuencias del intestino anterior	47
▪	Secuencias el intestino medio.....	49
▪	Secuencias del intestino posterior	51
▪	Mapa de calor para abundancia relativa.	54
3.3	Discusión	56
3.4	Bibliografía	73

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Mapa de ubicación de la zona de captura del <i>Panaque cochliodon</i> Coordenadas: 6°52'39"N 7°42'4"W. Corregimiento Chucurí-Barrancabermeja-Santander.	4
Figura 1-2: Fotografía del tracto gastrointestinal del <i>Panaque cochliodon</i>	7
Figura 2-1: Disección y aislamiento de intestino de <i>Panaque cochliodon</i>	13
Figura 2-2: Recuento en logaritmo de unidades formadoras de colonia (UFC/g) de la microbiota intestinal de <i>Panaque cochliodon</i>	21
Figura 2-3: Caracterización morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar nutritivo, observación de colonia con forma rizoide, borde rizoide y consistencia dura. Bacilo largo, Gram positivo. Observación 100x.....	22
Figura 2-4: Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar BPLS, observación de colonia con forma irregular, borde ondular y consistencia suave. Bacilos Gram negativos. Observación 100x	22
Figura 2-5: Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar nutritivo, observación de colonia con forma irregular, borde lobulado, elevación umbilicada y consistencia mucóide. Célula bacteriana alargada con forma de bastón Gram positivo. Observación 100x.....	23
Figura 2-6: Electroforesis de PCR de bacterias aisladas de la microbiota intestinal de <i>Panaque cochliodon</i> en gel agarosa. Los carriles se organizaron de la siguiente manera: 0, Marcador de Peso Molecular 1000 bp (DNA Ladder II DM2400); 1, <i>Staphylococcus</i> <i>pseudoxylus</i> (S04009); 2, <i>Bacillus nitratireducens</i> (MCCC 1A00732); 3, <i>Pseudomonas</i> <i>alcaligenes</i> (NBRC 14159); 4, <i>Lactococcus cremoris</i> (NBRC 100676); 5, <i>Aeromonas</i> <i>veronii</i> (115/II); 6, <i>Bacillus velezensis</i> (FZB42); 7, <i>Bacillus atrophaeus</i> (NRRL NRS-213); 7, <i>Citrobacter freundii</i> (NBRC 1268); 8, control positivo <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922); 9, <i>Enterobacter mori</i> (YIM Hb-3); 10, <i>Enterobacter sichuanensis</i> (WCHECL1597); 11, <i>Bacillus paramycoïdes</i> (MCCC 1A04098); 12, control positivo <i>Salmonella</i> <i>thyphimurium</i> (ATCC 14028); 13, control sin ADN molde. En el círculo rojo se evidencia la banda clave.....	27
Figura 2-7: Electroforesis de PCR de bacterias aisladas de la microbiota intestinal de <i>Panaque cochliodon</i> . en gel agarosa. Los carriles se organizaron de la siguiente manera: 0, Marcador de Peso Molecular 1000 bp (DNA Ladder II DM2400); 1, <i>Mammaliococcus</i> <i>sciuri</i> (DSM 20345); 2, <i>Leclercia pneumoniae</i> (49125); 3, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BCRC 11601); 4, <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i> (MAW 8436); 5, <i>Shewanella</i>	

xiamenensis (S4); 6, <i>Bacillus thuringiensis</i> (IAM 12077); 7, <i>Staphylococcus pseudoxylosus</i> (S04009); 8, control positivo <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922); 9, <i>Bacillus velezensis</i> (FZB42); 10, <i>Enterobacter sichuanensis</i> (WCHECL1597); 11, control sin ADN molde.	28
Figura 2-8. Árbol filogenético de bacterias aisladas del tracto intestinal de <i>P. cochliodon</i>	31
Figura 3-1: Electroforesis de PCR secciones anterior y medio del intestino de la microbiota no cultivable de <i>Panaque cochliodon</i> . Los carriles con la letra A corresponden al intestino anterior, los carriles con la letra M corresponden al intestino medio y los carriles con la letra P corresponden al intestino posterior, CP corresponde al control positivo <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) y CN corresponde al control negativo sin ADN molde. Además, se incluyeron los carriles de 1kb, que correspondieron al marcador de peso molecular de 15000 pb (1% agarosa tinción en SYBR safe). Las muestras visualizadas presentan diferentes bandas cuyo peso molecular está entre las 1500 pb (amplicón esperado), para las dos figuras.	44
Figura 3-2: Electroforesis de PCR secciones anterior y medio del intestino de la microbiota no cultivable de <i>Panaque cochliodon</i> . Los carriles con la letra A corresponden al intestino anterior, los carriles con la letra M corresponden al intestino medio y los carriles con la letra P corresponden al intestino posterior, CP corresponde al control positivo <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) y CN corresponde al control negativo sin ADN molde. Además, se incluyeron los carriles de 1kb, que correspondieron al marcador de peso molecular de 15000 pb (1% agarosa tinción en SYBR safe). Las muestras visualizadas presentan diferentes bandas cuyo peso molecular está entre las 1500 pb (amplicón esperado), para las dos figuras.	46
Figura 3-3: Diagrama de flujo de las secuencias del BC02 del intestino anterior de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	48
Figura 3-4: Diagrama de flujo de las secuencias del BC03 del intestino anterior de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	48
Figura 3-5: Diagrama de flujo de las secuencias del BC04 del intestino anterior de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	49
Figura 3-6: Diagrama de flujo de las secuencias del BC05 del intestino Medio de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	50
Figura 3-7: Diagrama de flujo de las secuencias del BC06 del intestino Medio de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	50
Figura 3-8: Diagrama de flujo de las secuencias del BC07 del intestino Medio de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	51

Figura 3-9: Diagrama de flujo de las secuencias del BC08 del intestino posterior de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	52
Figura 3-10: Diagrama de flujo de las secuencias del BC09 del intestino posterior de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	52
Figura 3-11: Diagrama de flujo de las secuencias del BC010 del intestino posterior de <i>Panaque cochliodon</i> . Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas	53
Figura 3-12: Composición microbiota intestinal que representa las abundancias relativas de la microbiota intestinal de <i>Panaque cochliodon</i>	54
Figura 3-13: Mapa de calor que represente las abundancias relativas de la microbiota intestinal de <i>Panaque cochliodon</i> . Cada barcode corresponde a un pool específico compuesto por las muestras de intestino.	55

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Valores de concentración y pureza de ADN de microorganismos cultivables.	17
Tabla 2-2: Cultivos bacterianos seleccionados e identificados con el Sistema API 20E.	24
Tabla 2-3: Características bioquímicas de algunas bacterias del género <i>Bacillus</i>	25
Tabla 2-4: Identificaciones de las cepas bacterianas utilizando el software API WEB y el manual del Bergey.	29
Tabla 3-1: Cuantificación ADN de intestino de ejemplares de <i>Panaque cochliodon</i>	38
Tabla 3-2: Barcodes de la microbiota intestinal de <i>Panaque cochliodon</i>	43
Tabla 3-3: Resumen de los microorganismos aislados en la caracterización de la microbiota intestinal de <i>P. cochliodon</i> y otros reportes	61

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura

Abreviatura	Término
UFC	Unidades formadoras de colonia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
ARN	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
IA	Intestino anterior
IM	Intestino medio
IP	Intestino posterior
TGI	Tracto gastrointestinal
ml	Mililitro
mg	Miligramo
μl	Microlitro
ng	Nanogramo
pb	Par de bases
RPM	Revoluciones por minuto
pg	Picogramos
μg	Microgramo
sp	Especie
spp	Especies
AUNAP	Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca
CUL	Corporación Universitaria Lasallista
N	Número de ejemplares
API	índice de perfil analítico
P.	Panaque
TA	Temperatura ambiente
Tm	temperatura de fusión
TAE	Tris-acetato EDTA
D	Dominio
P	Filo
C	Clase
O	Orden
F	Familia
G	Género

Introducción

Panaque cochliodon (cucha de ojos azules) es una especie endémica de la cuenca del Cauca y el Magdalena, reportada como vulnerable (A2d) (Mojica et al., 2012); pero con escaso conocimiento sobre los aspectos referentes a su biología y estudios relacionados con su microbioma y fisiología digestiva (David-Ruales et al., 2021)

Esta especie tiene hábitos xilívoros, es decir, consume madera como principal fuente de alimento para su nutrición, la cual por sus propiedades físicas y químicas tiene escaso valor nutritivo, sin embargo, puede representar una fuente de energía importante para los procesos básicos de mantenimiento de la especie (Nelson J et al., 1999) La microbiota intestinal, ocupa un papel crucial en la digestión e hidrólisis de los alimentos, es por esto que en algunos vertebrados la deficiencia para desdoblar o asimilar la celulosa dependerá de la actividad de microorganismos entéricos para suministrar compuestos de nitrógeno para su mantenimiento energético (McDonald et al., 2015). Estas características en peces comedores de madera plantean retos interesantes relacionados con las interacciones y asociaciones de microorganismos (hongos y bacterias) que puede tener en su intestino y que son fundamentales en su crecimiento y desarrollo y que además son funcionales y de importancia para la conservación de la especie (McDonald et al., 2012). Se conoce además que esta microbiota asociada al intestino, participa en procesos como la ingesta de nutrientes y la modulación metabólica (McCauley et al., 2020), defensa contra patógenos (Navarrete et al., 2009) y estimula el sistema inmunológico del huésped (Vadstein et al., 2013). Entre otras razones, el microbioma de los peces está cobrando importancia gracias a los diferentes estudios que se acercan a la estructura de sus comunidades y que permiten hacer inferencias sobre función, por ejemplo, algunos reportes relacionan dietas con inclusión o no de microorganismos autóctonos (Gutiérrez-Ramírez et al., 2016) para evaluar su efecto sobre el crecimiento, otros con la inclusión de ácidos orgánicos,

buscando modular bacterias patógenas, previniendo enfermedades y evitando el uso de antibióticos (Borges et al., 2021).

Dentro de la microbiota de los peces es comúnmente encontrado y con cierta dominancia los phylum Firmicutes, Fusobacteria y Proteobacteria (Zatán Valdiviezo et al., 2020). Para la familia Loricariidae dentro de la cual está el género Panaque, un estudio en la cuenca amazónica reveló que las muestras intestinales estaban principalmente dominadas por bacterias pertenecientes a los phyla Planctomycetes, Proteobacteria y Firmicutes siendo cada uno responsable aproximadamente del 10% de las secuencias del gen ARNr 16S recuperadas.

En los últimos años, ha habido un aumento en la caracterización de las comunidades microbianas en peces a través de técnicas bioquímicas (Puello-Caballero et al., 2018) y moleculares (McCauley et al., 2020), las cuales permiten identificar género y especie de los microorganismos y los factores que las afectan en peces con valor económico y biológico, por esta razón, aparte de seguir una tendencia mundial en el estudio de la microbiota asociada al tracto intestinal de peces nativos, en este caso de *Panaque cochliodon*, se trata del interés por estudiar una especie endémica, que es vulnerable, que presenta alto valor comercial en el mercado de ornamentales no regulado y que el conocimiento del microbioma de especies con hábitos alimenticios particulares (xilívoros) presenta gran interés para la bioindustria. Para ello, se realizó el aislamiento microbiológico e identificación molecular de los microorganismos cultivables y no cultivables, además, se realizó un análisis metagenómico para examinar la composición bacteriana en diferentes secciones intestinales y revelar diferencias funcionales y la abundancia relativa de la microbiota intestinal. Con esta investigación, se espera mejorar la comprensión de la fisiología digestiva y las interacciones simbióticas que juegan un papel importante e influyen de manera directa sobre la salud, la nutrición, el crecimiento, la reproducción, la dinámica poblacional y la vulnerabilidad de la especie *P. cochliodon*.

1. Capítulo 1. Aspectos básicos del *Panaque cochliodon* y generales asociadas al régimen alimenticio y microbioma en peces. Capítulo de revisión

1.1 Bio-ecología de la especie

Panaque cochliodon es una especie endémica de Colombia, se encuentra distribuida en las cuencas del Magdalena (Figura 1-1), Cauca y Sinú; no se tiene información sobre sus requerimientos nutricionales, manejo de planes de alimentación y aspectos reproductivos; presenta baja captura y sus poblaciones han declinado en los últimos años debido probablemente, a las perturbaciones sobre el hábitat (sobrepesca, minería ilegal entre otros), por lo que se recomienda la protección de su hábitat (McDonald et al., 2015). La (Figura 1-1) indica uno de los sitios de captura de la especie cerca del municipio de Barrancabermeja.

P. cochliodon está adaptada para vivir en ríos de grandes caudales, no se encuentra en ríos pequeños o torrentes; prefiere sitios con acumulación de vegetación sumergida o palizadas de los troncos y substratos duros; sus hábitos xilívoros están constituidos por algas perifíticas (Marden et al., 2017)(Marden et al., 2017). Del género *Panaque* se conoce y se ha evidenciado que la madera se encuentra constantemente en altos porcentajes en el tracto gastrointestinal y dependiendo de las condiciones ambientales, puede cambiar entre estrategias dietéticas xilívoras y detritívoras (Mcdonald et al., 2019). Esto es muy inusual entre los consumidores primarios de madera y proporciona un sistema único para examinar el efecto del cambio dietético en un sistema xilívoro. Para algunos organismos que se alimentan de madera, las comunidades entéricas parecen muy estables, donde los cambios en la dieta tienen un impacto mínimo en la composición de la comunidad

(McCauley et al., 2020); este aspecto, amplía el horizonte de estudio acerca de la fisiología asociada a la nutrición de este tipo de especies con hábitos tan particulares.

Su estructura bucal perfectamente desarrollada para su hábito xilívoro, presenta más de cinco dientes dentarios y premaxilares; las cúspides dentarias y premaxilares son unicúspides, cortas y tienen forma de cucharón o cuchara; a diferencia de los otros miembros del subgénero *Scobinancistrus* que tienen entre tres o cuatro dientes dentarios y premaxilares; (Marden et al., 2017). Al respecto, David-Ruales et al., (2021). han reportado que *P. cochliodon* presenta $14,7 \pm 1,7$ dientes premaxilares y $16,4 \pm 3,1$ dientes del dentario.

Figura 1-1: Mapa de ubicación de la zona de captura del *Panaque cochliodon* Coordenadas: $6^{\circ}52'39''N$ $7^{\circ}42'4''W$. Corregimiento Chucurí-Barrancabermeja-Santander.



Fuente: Elaboración propia

Los adultos pueden alcanzar un máximo de longitud de 283 mm, comparado con los 150 mm de algunas especies del género *Panaquolus* (Lujan et al., 2011). Se reporta que las capturas de esta especie en la zona de influencia de Barrancabermeja, presentan alto parasitismo por *Lernaea cyprinasea*, lo que probablemente pueda estar asociado a factores antrópicos relacionados con degradación de su hábitat (David-Ruales et al., 2021). En cautiverio, los ejemplares presentan alta sensibilidad al anestésico Eugenol®, dosis entre los 25 a 45 mg/L de Eugenol, sirven para alcanzar el tipo de sedación IV en un tiempo promedio entre 2 a 3 minutos y, todos los ejemplares se recuperan de la sedación (tipo V), sin presentar mortalidades, es decir estas concentraciones pueden ser usadas sin ningún tipo de riesgo o efecto deletéreo para la especie (David-Ruales et al., 2022); se estableció además que tienen preferencia por algunos vegetales como el pepino, la zanahoria, pero que también acepta dietas formuladas; su comportamiento en cautiverio es tranquilo, que gusta de estar en refugios, en la madera y que puede tener comportamientos territoriales (David-Ruales et al., 2021).

1.2 Variabilidad en hábitos alimenticios en peces

El comportamiento y la variedad de ítems alimenticios revelan una alta plasticidad que está asociada a intrincadas asociaciones tróficas, lo que ha impulsado la evolución de una gran variedad de adaptaciones alimenticias desarrollando habilidades y comportamientos únicos para obtener su alimento de manera eficiente en su entorno específico (Borges et al., 2021). Una especie omnívora exitosamente establecida presenta estructuras morfológicas diferentes en comparación con aquellos con hábitos carnívoros; la forma de su boca y la longitud de sus intestinos pueden variar en función de su elección alimenticia (Lall & Tibbetts, 2009). Esto significa que, dentro de su dieta potencial, los peces omnívoros pueden mostrar preferencias hacia ciertos tipos de alimentos basados en su disponibilidad y valor nutricional. Por lo tanto, esta plasticidad alimenticia les permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales y sobrevivir en entornos con recursos cambiantes lo que puede resultar en una mayor supervivencia y reproducción (Sibbing, 1988).

Una diferencia clave en el crecimiento de los peces, conforme a sus hábitos alimenticios, se relaciona con la calidad de los ingredientes de las dietas y el cumplimiento de los requerimientos nutricionales. Por ejemplo, la mayoría de los peces herbívoros y omnívoros tienen necesidades proteicas que varían entre el 25% y el 35% en su dieta (Lall & Tibbetts,

2009). Sin embargo, en el caso de las especies carnívoras, estas requieren niveles de proteína más elevados, que van del 40% al 55% de su alimentación (Lall & Tibbetts, 2009). Esta diferencia parece estar vinculada a la limitada utilización de carbohidratos como fuente de energía por parte de los peces carnívoros, los cuales tienen una mejor respuesta nutricional a los componentes nitrogenados alcalinos y neutros, como la glicina, prolina, taurina y valina (Lall & Tibbetts, 2009), de ahí que en cautiverio los peces carnívoros sean tan demandantes en proteína animal de primera calidad y con niveles de inclusión elevados (Sibbing, 1988), entendiendo que el confinamiento o el sistema de producción afectan el manejo alimenticio y sus respuestas medidas a través de los parámetros de crecimiento.

En su hábitat natural, los peces tienen acceso a una amplia variedad de alimentos y recursos, lo que les permite obtener nutrientes de manera equilibrada y natural (Sibbing, 1988). Los peces tienen una notable capacidad para discriminar entre alimentos de alta y baja calidad, mostrando una inclinación hacia la mejor; en el caso de ciertos herbívoros, ya sea en cautiverio o en condiciones naturales, sus opciones alimentarias pueden ser limitadas, lo que los obliga a buscar vegetales alargados y altamente nutritivos de manera estratégica; la necesidad de seleccionar con precisión los alimentos se origina en la complejidad del procesamiento de su dieta (Lall & Tibbetts, 2009). Por otro lado, hay peces herbívoros y detritívoros que se alimentan de plantas acuáticas, algas y materia orgánica en descomposición, estos peces tienen sistemas digestivos adaptados para alimentarse de materia orgánica en descomposición y también son fundamentales para reciclar nutrientes en los ecosistemas acuáticos, descomponiendo la materia orgánica y liberando nutrientes esenciales para otros organismos (Lall & Tibbetts, 2009); como una variación en este grupo de peces, se encuentran los que se alimentan de madera, llamados xilívoros (Nelson J et al., 1999). Estos peces presentan una estrategia alimentaria única, basada en el consumo de madera como fuente principal de nutrientes; estos peces han desarrollado una asombrosa adaptación, centrando su alimentación en la digestión de lignocelulosa como su fuente primaria de nutrientes (Nelson J et al., 1999). A pesar de que la madera es un material de bajo valor nutritivo, los xilívoros han evolucionado para aprovecharla de manera eficiente; para lo cual han desarrollado adaptaciones morfológicas y fisiológicas únicas que les permiten descomponer y extraer los nutrientes necesarios de este material difícil de descomponer; estas adaptaciones a menudo involucran simbiosis con microorganismos, como bacterias y hongos, que producen enzimas capaces de degradar

la celulosa y lignina, principales componentes estructurales de la madera. (Nelson J et al., 1999).

Los peces del género *Panaque* son conocidos por ser xilívoros y tener la capacidad de degradar madera como parte de su dieta; dos especies bien conocidas en esta categoría son *Panaque nigrolineatus* y *Panaque armbrusteri*. (Marden et al., 2017).

1.3 Tracto gastrointestinal en peces

Figura 1-2: Fotografía del tracto gastrointestinal del *Panaque cochliodon*



Fuente propia

Existe una gran diversidad en las formas y función del sistema digestivo en peces (Figura 1-2). Esta variabilidad se relaciona con la dieta y el ambiente, indica aspectos relacionados con la ontogenia que da como resultado modulaciones anatómicas y funcionales (Gerking et al., 1994).

En los peces, se han descrito diferentes estructuras del tracto gastrointestinal (TGI) entre los diversos grupos taxonómicos. En general, el intestino es la estructura donde ocurre la

digestión y la absorción del alimento, además del procesamiento mecánico inicial (Grosell et al., 2010). El tracto gastrointestinal de los peces se puede subdividir en cuatro regiones topográficas: el intestino cefálico, el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (Bledsoe et al., 2016). En la región cefálica, se encuentran subdivisiones morfofuncionales que describen órganos específicos como la boca y la faringe, los cuales tienen como función principal adquirir alimentos y procesarlos mecánicamente (Bledsoe et al., 2016). En el intestino anterior, que está compuesto por el esófago y el estómago, es donde comienza la digestión química de los alimentos.

En algunos peces, la descomposición mecánica de los alimentos puede ocurrir parcial o totalmente en el estómago (Bledsoe et al., 2016). Es importante mencionar que no todos los peces presentan estómago, lo que puede reflejar su hábito alimenticio; por lo tanto, presentan intestinos muy largos, por ejemplo, en los peces del género *Panaque*, normalmente los peces agástricos, presentan intestinos muy largos. El intestino medio representa la mayor proporción de la longitud del intestino y es donde continúa la digestión química y la absorción de los principales nutrientes, como proteínas, péptidos, aminoácidos, azúcares, lípidos, vitaminas entre otros (Marden et al., 2017) El intestino posterior, que comprende la sección final del intestino, incluye el recto y está relacionado con la absorción de iones (Vásquez-Torres, 2004).

Conforme se han descrito las estructuras anatómicas del TGI en peces, los estudios sobre su función hoy en día son acompañados por el papel que cumple la biota acompañante (microbioma), incluso desde el desarrollo temprano. Durante la ontogenia, el microbioma en el intestino de los peces experimenta un desarrollo dinámico, este proceso está regulado por interacciones complejas entre factores bióticos, como el huésped, y factores abióticos, como el ambiente en el que se encuentran (German, 2009)(German, 2009) . Estas interacciones ejercen una influencia significativa en la composición y evolución del microbioma intestinal, lo cual puede tener un impacto relevante en la salud y el desarrollo óptimo de los peces en esta fase vital de su vida (German, 2009) y en las subsiguientes etapas de su desarrollo. La comprensión de estas interacciones y su influencia en el microbioma de los peces es de gran importancia en la acuicultura, ya que permite optimizar las prácticas de crianza y alimentación de larvas y juveniles, lo cual promueve un crecimiento saludable y una mejor resistencia a enfermedades en sus poblaciones de peces (German, 2009)

1.4 Microbiota en peces

En general el intestino en los vertebrados incluyendo los peces, es un ecosistema complejo que incide de manera fundamental en el hospedero; digestión de nutrientes, respuesta inmune, capacidad metabólica, entre otras características son moduladas por el microbioma (Bird et al., 2010; David et al., 2014; Viaud et al., 2013). Se conoce que la estructura y la composición de la microbiota y su influencia está regulada por varios factores, entre ellos la genética del hospedero, el ambiente, la dieta y la filogenia (Fishelson et al., 1985; Scott et al., 2013); además, y entendiendo que los peces representan el grupo más numeroso de los vertebrados, con amplio rango ecológico y con estructuras digestivas particulares (Nelson J et al., 1999; Suyehiro, 1942), es importante que se realicen estudios sobre su microbioma y su relación con el hospedero. Por otro lado, se conoce que la colonización del intestino en peces inicia desde estados tempranos de desarrollo y se establece a lo largo de su vida (Nayak, 2010), al respecto se estima que una cantidad de 10^8 células bacterianas hacen parte del tracto gastrointestinal de los peces, entre las cuales dominan las aerobias y anaerobias facultativas, pero también con la presencia de anaerobias estrictas (Rawls et al., 2004; Romero & Navarrete, 2006)

Datos de secuenciación indican que el 90% de la composición está representada por los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria, y Verrucomicrobia, como los otros filos representativos en el tracto (Givens et al., 2015; Ingerslev et al., 2014; Sullam et al., 2010; Wu et al., 2012) pero se indica que la diversidad aumenta, con el cambio de hábito alimenticio siendo mayor en herbívoros, seguido por omnívoros y con menor diversidad en carnívoros (Liu et al., 2016). Al respecto se ha demostrado en un pez de hábito herbívoro de agua dulce, que la composición y diversidad del microbioma está asociada específicamente a su hábito alimenticio (Fishelson et al., 1985).

Otro factor que influye son las condiciones ambientales, es así como en peces de agua dulce dominan las especies de *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, y *Pseudomonas*, además de anaerobios obligados como *Bacteroides*, *Clostridium*, y *Fusobacterium* (Gómez & Balcázar, 2008). El hábitat también pueden influenciar la estructura del microbioma (Wu et al., 2012); por ejemplo en la especie de pez *Cyprinus carpio*, cultivada en estanques, el microbioma fue dominado por los phylum Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria y Actinobacteria (Ye et al., 2014), a su vez datos de otra granja

de cultivo para la misma especie, indican que el microbioma fue dominado por Fusobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes (Tongtong Li et al., 2015), indicando la influencia del hábitat y determinado que los nichos pueden ofrecer diferentes ítems alimenticios que pueden modificar o alterar la estructura del microbioma. A su vez, se ha reportado para *Ictalurus punctatus* en su ontogenia varios filos bacterianos del tipo Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria y Proteobacteria, con mayor abundancia de las especies *Cetobacterium somerae* y *Plesiomonas shigelloides*; además Bledsoe et al., (2016), indican que al comparar la microbiota ambiental con la intestinal, el intestino de los peces se mantiene como un hábitat de nicho que separa a todas las comunidades bacterianas que están en el agua o en la dieta, pero sugiriendo evidencia que la microbiota del ambiente sirve de inóculo para el intestino en esta especie.

Para el género Panaque, se reportan algunos filos como Fusobacteria, Cyanobacteria y Beta-proteobacteria y algunos ordenes como Flavobacteria y Clostridia; dentro de estos ordenes, se pueden encontrar las especies: *Aeromonas sp*, *Flavobacterium sp*, *Bacteroides sp*, *Clostridium sp*, y *Pseudomonas sp* (Di Maiuta et al., 2013). Para el caso específico de los comedores de madera, con su particular dieta, los estudios del microbioma pueden servir de ejemplo de las relaciones entre la filogenia y la dieta, indicando prevalencia de los filos Proteobacteria, Firmicutes y Planctomycetes (McCauley et al., 2020), a su vez para la especie *P. nigrolineatus* se reportan géneros bacterianos con capacidad de procesar la celulosa (bacterias celulolíticas) incluyendo *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Aeromonas spp* (Watts et al., 2013), entre otras.

Como se puede observar, aún falta información por aclarar, como por ejemplo si existe algún tipo de interacción entre hongos y bacteria que ayuden a degradar un ingrediente como la madera que presenta dificultades para ser transformado; en el caso de *P. cochliodon*, no se tiene ningún tipo de información sobre estos tópicos, entendido que es una especie endémica y que Colombia es el segundo país con mayor diversidad en especies ícticas, trabajos de este tipo se vuelven de suma importancia.

2. Capítulo 2. Pruebas microbiológicas y bioquímicas para determinar algunas cepas del tracto intestinal en *Panaque cochliodon*

2.1 Introducción

Dentro de las técnicas fundamentales para caracterizar la microbiota se encuentran las pruebas microbiológicas básicas, entre ellas, destacan la tinción de Gram, que clasifica bacterias como Gram positivas o Gram negativas según su reacción a colorantes, el cultivo en agares básicos y específicos, los cuales permiten el crecimiento y la identificación de microorganismos en medios sólidos; las técnicas de tinción, que posibilitan la visualización de estructuras internas en células bacterianas. y las pruebas bioquímicas (McCauley et al., 2020), las cuales permiten identificar género y especie de los microorganismo (Puello-Caballero et al., 2018).

La caracterización bioquímica de los aislados microbianos permite analizar la biodiversidad de las comunidades microbianas presentes, así como también, una mejor comprensión de la relación entre los aislados y la microbiota total (Oulas et al., 2015). Teniendo en cuenta que esta especie no tiene estudios previos sobre la microbiota intestinal, se identificaron por pruebas microbiológicas básicas y por pruebas bioquímicas algunos aislados cultivables asociados al intestino de la especie *Panaque cochliodon* de tres ejemplares adultos.

2.2 Metodología

2.2.1 Colección y captura de *Panaque cochliodon*

La captura y obtención de los ejemplares de *Panaque cochliodon* se realizó de acuerdo con los parámetros del (Dec 1376, 2013), que regula la recolección de especímenes de

especies silvestres biológicamente diversas para investigación no comercial . Para ello la Corporación Universitaria Lasallista, cuenta con el permiso de colección de especies silvestres con fines de investigación otorgado por la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP), a través de la Resolución No. 2614 del 28 de diciembre de 2020; adicionalmente se tiene el aval del Comité de Ética y Experimentación con animales de la Corporación Universitaria Lasallista (CUL), dentro del Convenio 267 con la AUNAP, con fecha 24 de septiembre de 2020. Los puntos de muestreo, las artes de pesca y el acercamiento a los pescadores artesanales para la captura de los ejemplares de *P. cochliodon* en el área de influencia del municipio de Barrancabermeja, sobre el río Magdalena, se hicieron con base en el informe técnico No.1 del Convenio 267, entre la AUNAP y la CUL (David-Ruales et al., 2021). Una vez se capturaron los ejemplares (N= 3) (dos machos y una hembra), se procedió con el protocolo de extracción del intestino.

2.2.2 Disección y aislamiento de intestino

Después de la captura, los ejemplares de *P.cochliodon* fueron transportados en condiciones adecuadas (David-Ruales et al., 2021) y llevados al laboratorio de microbiología de la CUL. Todos los ejemplares estaban en perfectas condiciones, sin ningún tipo de heridas por daño mecánico, parasitismo externo o enfermedad aparente, el peso promedio de los ejemplares $324,5 \pm 2,5$ gr. En el laboratorio, el instrumental, los reactivos y demás materiales estaban previamente organizados y listos para llevar a cabo la disección. Luego, los ejemplares en tiempos consecutivos e individualmente se colocaron en un recipiente con 20 litros de capacidad con agua previamente preparada con sobredosis de Eugenol ® (200 mg por litro). Cada ejemplar se dejó en el agua hasta que estuviera completamente inmóvil o sin ningún tipo de reacción, inmediatamente después, se realizó un corte medular para asegurar su muerte completa. Se procedió a limpiar el abdomen con alcohol al 70% para evitar contaminaciones cruzadas y retirar el exceso de agua y de Eugenol ®. Después, se realizó un corte con el bisturí y tijeras desde el ano hasta la región cefálica, para exponer la cavidad abdominal, teniendo cuidado de no perforar el intestino. El intestino completo se retiró y se extendió para identificar las partes anterior, media y posterior (Figura 1-2). De cada parte del intestino, se tomó un gramo de tejido que se utilizó para los medios cultivables; con la ayuda del bisturí y con mucho cuidado a los tejidos muestreados se le retiró el exceso de excremento. A

continuación, se lavó el intestino con alcohol al 96% y se separó en tubos falcon con alcohol al 96% para congelarlo a -80°C . Este procedimiento se hizo con el objetivo de aislar el ADN del intestino para los métodos aplicados a microorganismos no cultivables.

Una vez finalizado el proceso, se realizó la limpieza del laboratorio y todos los residuos se descartaron como riesgo biológico en bolsas rojas para ser congelados y posteriormente eliminados adecuadamente. La Figura 2-1, muestra el ejemplar diseccionado y el intestino separado y pesado.

Figura 2-1: Disección y aislamiento de intestino de *Panque cochliodon*.



Fuente: Elaboración propia

2.2.3 Análisis microbiológico y purificación de microorganismos

Para ello, se seleccionaron cuidadosamente 3 gramos de intestino completo de cada pez, compuesto por intestino anterior, medio y posterior, los cuales se utilizaron como muestra representativa. Inicialmente, las muestras de intestino fueron incubadas en caldo BHI cerebro-corazón durante 2 horas a una temperatura de 30°C , en una incubadora de anaerobiosis para favorecer el crecimiento bacteriano. Durante el periodo de incubación, se controlaron las condiciones de temperatura y anaerobiosis utilizando termómetros digitales y una tirilla impregnada en azul de metileno, la cual cambia de color en presencia de oxígeno, indicando la ausencia de este último. Estas medidas aseguraron un desarrollo óptimo de las bacterias presentes. Al finalizar las 2 horas de incubación, se procedió a

macerar de manera independiente los intestinos, esta técnica consistió en triturar o desintegrar el tejido usando un mortero de porcelana estéril para obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas utilizando una serie de tubos de ensayo, obteniendo así concentraciones en las muestras de 10^{-3} , 10^{-4} , y 10^{-5} . Para el siguiente paso, se llevó a cabo la siembra en superficie en diferentes medios de agar, Agar BPLS (Verde-brillante Rojo fenolLactosa-Sacarosa) (MERCK, 110747); Agar MacCONKEY (Merck, 100205); Agar MRS (de MAN, ROGOSA y SHARPE) (Merck, 110660); Agar nutritivo (Merck, 111471) y Agar M17 (Merck, 115108); estos medios de cultivo proporcionaron las condiciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de diferentes tipos de bacterias presentes en las muestras. Los medios inoculados fueron colocados en incubadoras a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se permitió su crecimiento durante un período de 48 horas.

Para aislar bacterias *Bacillus sp*, se seleccionó la dilución 10^{-2} y se sometió a un calentamiento a 80°C durante 10 minutos. Este proceso de calentamiento tuvo como objetivo eliminar otras bacterias presentes en la muestra, dejando únicamente las pertenecientes al género *Bacillus sp*. Después de este tratamiento, se sembró la dilución en agar nutritivo, que proporcionó los nutrientes necesarios para el crecimiento exclusivo de las bacterias deseadas. Después de completar el período de incubación tanto para *Bacillus sp* como para los diferentes tipos de bacterias, se procedió al recuento de las colonias bacterianas presentes en los diferentes medios de agar. Se seleccionaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , y 10^{-5} en las que se contaron entre 1 y 250 colonias, ya que esta gama permitió obtener un número adecuado de colonias para su posterior análisis, lo que brindó una visualización clara de la distribución de las colonias a lo largo de las diluciones. A continuación, se llevó a cabo la identificación morfológica de las colonias mediante la técnica de tinción de Gram. Esta técnica permitió clasificar las bacterias en grampositivas o gramnegativas, proporcionando información valiosa sobre su estructura celular y composición de la pared bacteriana. Aquellas colonias que presentaron características particulares y diferentes en su tinción de Gram fueron consideradas como aislados individuales. Para asegurar la pureza y preservación de los aislados, se llevaron a cabo procesos de purificación, los cuales consisten en el aislamiento de colonias, por medio de agares selectivos y selección de estas por sus características morfológicas como elevación, color, textura y forma similares para asegurar su pureza. Posteriormente se

realizó técnicas de tinción, como la de Gram, que ayudaron en la identificación. Por último, se hicieron subcultivos repetidos en nuevos medios para garantizar completamente la pureza del aislado. Estos aislados fueron codificados de manera única para su identificación y se conservaron a una temperatura de -80°C en tubos plásticos de fondo cónico de 1.5 ml, utilizando una solución de caldo nutritivo y glicerol como medio de conservación. Después de analizar todos los medios de cultivo selectivos y purificar la microbiota cultivable e identificarlos por microscopia convencional y tinción de Gram, se procedió a crear un cepario para almacenar y criopreservar los aislados microbianos; de manera alterna se creó una base de datos con los registros de todas las particularidades de cada organismo: características morfológicas de las colonias, de los aislados, y como conservarlas sin cambiar las propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas por las que fueron aisladas.

2.2.4 Análisis pruebas bioquímicas

Para la identificación de los bacilos esporulados Gram positivos, se utilizaron baterías bioquímicas convencionales que incluyeron una variedad de pruebas específicas. Los medios de cultivo utilizados incluyeron Agar SIM (Merck Millipore, 105470), Caldo rojo de fenol base (Merck Milipore, 110987), Manitol (Merck Milipore, 443907), Nitrato movilidad (Merck milipore, 14305-500G), Arabinosa (Merck Milipore, 101492), Glucosa (Merck milipore, 117866), Xilosa (Merck, 108689), Gelatina (Merck, 107004), Caldo MR-VP (Merck, 105712), Agar huevo-lecitinasa (Merck, 110857), Agar leche, agar caseína (Merck, 110860) y Agar almidón (Merck, 101252). Estas pruebas y medios se seleccionaron por su capacidad para diferenciar y caracterizar las diferentes especies de bacilos Gram positivos, con una precisión superior al 90%. Durante los procedimientos de cultivo e inoculación, se siguieron estrictamente los protocolos sugeridos por el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Rees et al., 2015), para garantizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

Para la identificación de los bacilos Gram negativos, se utilizó el sistema comercial API 20 E Biomerieux. En primer lugar, se estandarizó el inóculo utilizando el patrón de McFarland, garantizando una concentración adecuada de 1.5×10^8 UFC/mL. Luego, se siguió el protocolo propuesto por Bach, et al (2021). Para obtener cultivos frescos y nuevos, se

utilizaron los medios de cultivo Agar BPLS y Agar MacConkey, incubándolos durante 24 horas. Posteriormente, cada prueba se inoculó según las indicaciones del fabricante y se realizó la correspondiente lectura. Los resultados obtenidos se tradujeron en un perfil numérico que se ingresó en el Software API WEB, proporcionando una identificación de los aislados con una precisión superior al 95%. Estas pruebas y análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista (CUL), donde se disponen de los equipos y recursos necesarios para realizar dichas técnicas de identificación bacteriana.

2.2.5 Caracterización molecular de la microbiota cultivable

▪ Extracción ADN de microorganismos cultivables

El protocolo utilizado para la extracción de ADN en células bacterianas fue estandarizado en el laboratorio de microbiología industrial de la Corporación Universitaria Lasallista (CUL). Se empleó el kit de extracción de ADN (*ALL-IN-ONE MINI-PREPS KIT HANDBOOK*) de *Bio Basic Canada INC*. El procedimiento se efectuó en 17 diferentes aislados de acuerdo con el siguiente protocolo se tomaron las diferentes cepas aisladas del agar nutritivo (Merck, 101257) y codificadas internamente, donde cada cepa había sido incubada a 30°C durante 18 horas. El total de las colonias crecidas en el medio se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, a este total se adicionó 350 μ l de buffer lisis. Se procedió a homogeneizar la muestra sin grumos mediante vórtex. La muestra se incubó a temperatura ambiente (TA) (21 \pm 2°C), durante cinco minutos y luego se centrifugó a 15,000 RPM durante tres minutos a 4°C. Se transfirió el lisado a una columna (EZ 10 DNA COLUMN) y se mantuvo a TA durante un minuto, continuamente centrifugarse a 13,000 RPM. Se añadieron 350 μ l de tampón lisis DRP a la columna de ADN EZ-10 junto con el lisado del microorganismo, conservando la misma TA y el tiempo; se centrifugó nuevamente a 13,000 RPM y se desechó el líquido. La columna de ADN EZ-10 se colocó en el tubo colector y se agregaron 500 μ l de solución CW1, para luego volver a centrifugar a 13,000 RPM, descartando el líquido en el tubo de recogida. Se colocó nuevamente la columna de ADN EZ-10 en el tubo recolector y se agregaron 500 μ l de solución CW2 siguiendo el mismo procedimiento de la solución CW1. Luego, se centrifugó a 13,000 RPM durante un minuto a TA y se descartó el líquido en el tubo de recogida (verificando CW2). Se volvió a colocar

la columna de centrifugación y el ADN EZ-10 en el tubo recolector, centrifugando a 13,000 RPM durante dos minutos a TA. Después, la columna de centrifugación se dejó abierta durante 5 minutos para permitir la evaporación completa del etanol. Se transfirió la columna de centrifugación a un tubo de centrifuga limpio de 1.5 ml, asegurándose de retirar la membrana de la columna de ADN EZ-10. Se centrifugó a 13,000 RPM durante un minuto. Se incorporaron 60 μ l de tampón CE directamente en el centro de la membrana de la columna de ADN EZ-10. Se incubaron durante cinco minutos y luego se centrifugó durante dos minutos a 13,000 RPM para eluir el ADN (se repitió otro ciclo de dos minutos). Por último, la solución en el tubo de centrifuga fue la muestra de ADN obtenida, la cual se utilizó de inmediato para operaciones moleculares y almacenada posteriormente a una temperatura de -80°C .

▪ **Quantificación del ADN de microorganismos cultivables**

Por medio del espectrofotómetro *Nanodrop One (ND-ONE-W THERMO SCIENTIFIC)*, se evaluó la pureza y cantidad del material genético. La medición se realizó calculando la absorbancia a una frecuencia de 260 nm, que es específica para el ADN. Además de la concentración, la calidad del ADN fue un factor determinante en las aplicaciones posteriores, como el protocolo de PCR. Para evaluar la pureza del ADN, se calculó la relación de absorbancia 260/280. Se aceptó como parámetros de pureza del ADN, una relación entre 1.8 y 2.0. Se estableció un valor mínimo de 20 ng/ μ l de ADN para poder continuar con el protocolo de PCR. Si alguna de las 17 muestras presentaba una concentración de ADN mayor de 20 ng/ μ l de ADN se llevaba a una dilución en serie hasta obtener la concentración óptima, en la Tabla 2-1 se observa el equipo Nanodrop One para cuantificación y pureza del ADN.

Tabla 2-1: Valores de concentración y pureza de ADN de microorganismos cultivables.

MUESTRA	NG/ μ G	A260/A280	A260/A230
21	123,5	1.87	2.27
31	47.9	1.82	5.75
11	36.7	1.88	3.19
2	114.7	1.82	3.35

MUESTRA	NG/μG	A260/A280	A260/A230
3	43.4	1.76	6.09
5	88.4	1.84	3.05
9	55	1.82	4.62
13	57.7	1.77	4.5
8	40.6	1.87	5.98
14	43.7	1.88	6.72
25	48.3	1.89	5.68
22	66.8	1.85	2,57
33	55.1	1.81	2.93
32	172.3	1.86	2.1
10	140.8	1.9	2.34
4	94,7	1.83	2.29
1	88.04	1.9	2.07

Fuente: Elaboración propia

▪ Amplificación por PCR de los microorganismos cultivables

En este ensayo se empleó una combinación de cebadores y enzimas termoestables para obtener volúmenes significativos de ADN que luego fueron analizados por secuenciación. El protocolo de amplificación por PCR fue diseñado con el objetivo de lograr una mezcla de reacción final que contenía un total de 20 μl por cada microorganismo analizado. Para comenzar el protocolo, se tomaron 2 μl de ADN con una concentración inicial de 20 ng/μl. Se utilizaron los cebadores (primers) específicos 341 F (5'-CCTACGGGGCGGCAGCAG-3') y 805 R (5'-GACTACACGGGTATTCTAATCC-3'), que corresponden a la región V3 y V4 del gen ADNr 16S. Se añadió 0.2 μl de cada primer a la mezcla, junto con 10 μl de PCR *Máster mix* que contenía la enzima ADN polimerasa y una solución tampón que proporcionó las condiciones óptimas para la reacción. Además, se agregaron 7,6 μl de agua grado molecular estéril. Posteriormente, se realizó la amplificación en un termociclador PCR SimpliAmp (*APPLIED BIOSYSTEMS*) utilizando un programa específico: en primer lugar, se llevó a cabo un proceso de desnaturalización que separó las cadenas de ADN complementarias a una temperatura de 95 °C, obteniendo así hebras simples. A continuación, se procedió al apareamiento de los primers a una temperatura de 58°C, la cual se seleccionó calculando la temperatura de fusión (T_m) basada en el contenido de guaninas y citosinas. Esto permitió que los primers se unieran

específicamente a las secuencias de ADN objetivo. Finalmente, se realizó la extensión de la PCR a una temperatura de 72 °C, que es óptima para la actividad de la ADN polimerasa.

Este proceso de amplificación constó de 40 ciclos. Una vez finalizado el programa de amplificación, se obtuvo los productos de amplificación de ADN que correspondían a las secuencias específicas. El protocolo de amplificación de PCR utilizado en este estudio permitió obtener volúmenes significativos de ADN a partir de las muestras analizadas. La utilización de marcadores específicos y condiciones de reacción óptimas garantizó la amplificación selectiva de las secuencias de interés.

▪ **Electroforesis de los productos de PCR de los microorganismos cultivables**

Para la visualización de las bandas amplificadas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% y al 2.0%, utilizando 1X TAE (Tris-acetato EDTA) como buffer de corrida. El porcentaje de agarosa se seleccionó acorde al rango de tamaño esperado para los amplicones estimados entre 800 y 1000 pb. Para determinar con precisión el tamaño de los fragmentos amplificados, se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb. El gel de agarosa se preparó siguiendo el procedimiento estándar, y las muestras de PCR se cargaron en los pozos del gel junto con el marcador de peso molecular y el GelRed como tinte fluorescente para la visualización del ADN. A continuación, se aplicó una corriente eléctrica de 100 Voltios durante 30 minutos para migrar los fragmentos de ADN a través del gel. Luego del tiempo de corrida, se detuvo la electroforesis y se observaron las bandas en el gel. Cada banda correspondía a los amplicones generados durante la amplificación por PCR. El tamaño de las bandas se comparó visualmente con el marcador de peso molecular para determinar la longitud aproximada de los fragmentos amplificados. Una vez obtenidas las bandas amplificadas, se envió la mezcla de reacción final de PCR al laboratorio SSiGMoL de la Universidad Nacional de Colombia, sede de Bogotá, que brindó el servicio de secuenciación. Esta asistencia permitió obtener información detallada sobre la secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados, lo cual fue fundamental para el análisis posterior de los resultados y la identificación precisa de los microorganismos presentes en las muestras.

▪ **Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas de los microorganismos cultivables**

Las secuencias obtenidas en el estudio fueron procesadas y editadas utilizando el programa BioEdit 7.0 (March & Tillett, 1999). Este software permitió realizar modificaciones y ajustes necesarios en las secuencias para su posterior análisis. Para comparar las secuencias modificadas con las bases de datos moleculares, se utilizó el Centro Nacional de Información Biotecnológica y Genómica del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), se compararon las secuencias para identificar similitudes y homologías entre las series de ADN de los microorganismos aislados y bacterias relacionadas taxonómicamente. Con el objetivo de obtener un resultado más preciso, se utilizaron algoritmos de alineación para ordenar las secuencias obtenidas. Posteriormente, se empleó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega 11) (<https://www.megasoftware.net>), para realizar el alineamiento de las secuencias de consenso. Mega 11 proporcionó una interfaz intuitiva que ayudó a la construcción, visualización y análisis de los árboles filogenéticos. Esto permitió investigar las relaciones evolutivas entre las especies bacterianas y comprender la diversidad biológica basada en las secuencias. Para la construcción de los árboles filogenéticos, se utilizaron los métodos de Neighbor-Joining (NJ), según Tamura K (2020).

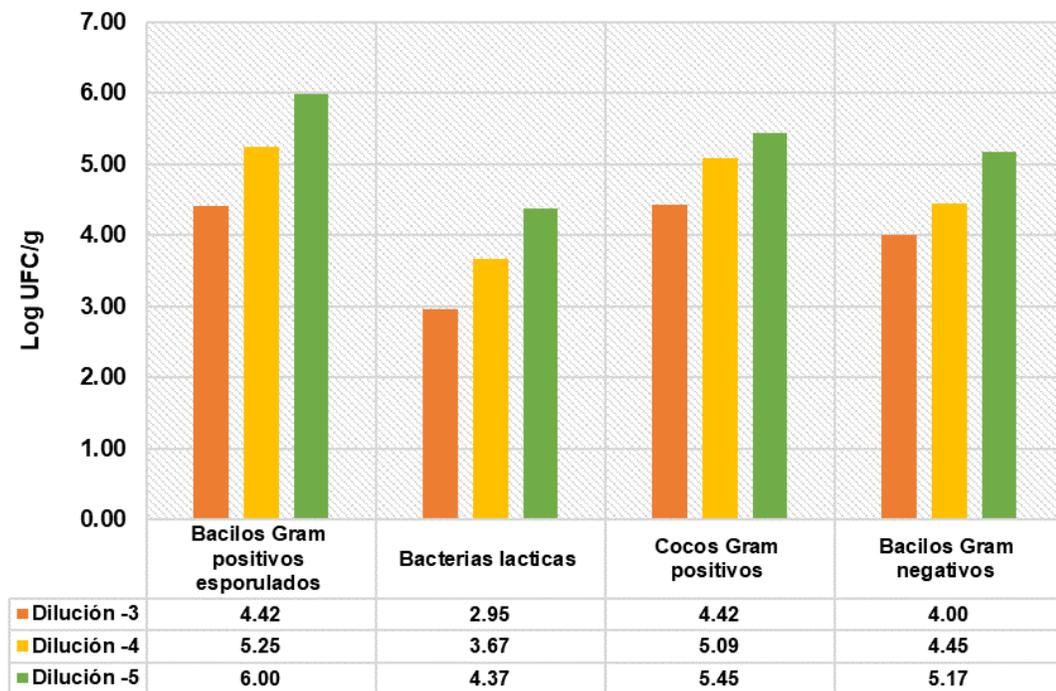
2.3 Resultados

2.3.1 Análisis cultivable

Los recuentos bacterianos del intestino de *P. cochliodon* fueron analizados y se muestran en la Figura 2-2. Se observó una mayor cantidad de bacilos Gram positivos, con un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)/gramo (gr) de $9,9 \times 10^5$, y de cocos Gram positivos, con un recuento de UFC/gr de $2,8 \times 10^5$. En contraste, el recuento de bacterias ácido-lácticas fue menor, con una cantidad de UFC/gr de 2×10^4 . Estos resultados fueron obtenidos para cada una de las diluciones empleadas en el estudio. Se evidenció para los bacilos Gram negativos, un recuento de $1,5 \times 10^6$ UFC/gr, mientras que para los bacilos Gram positivos se registró un recuento de $9,9 \times 10^5$ UFC/gr. Se destaca la

presencia significativa de bacilos Gram positivos y cocos Gram positivos, mientras que las bacterias ácido-lácticas se encontraron en menor cantidad. Estos datos revelan la diversidad, la abundancia y proporcionan información detallada sobre la composición de microorganismos en el intestino de esta especie, información que puede tener implicaciones importantes en su salud y metabolismo. En la Figura 2-2, se indica el recuento en logaritmo de unidades formadoras de colonia (UFC/g), como medida para cuantificar la cantidad de microorganismos cultivables presentes en la muestra de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon*

Figura 2-2: Recuento en logaritmo de unidades formadoras de colonia (UFC/g) de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon*



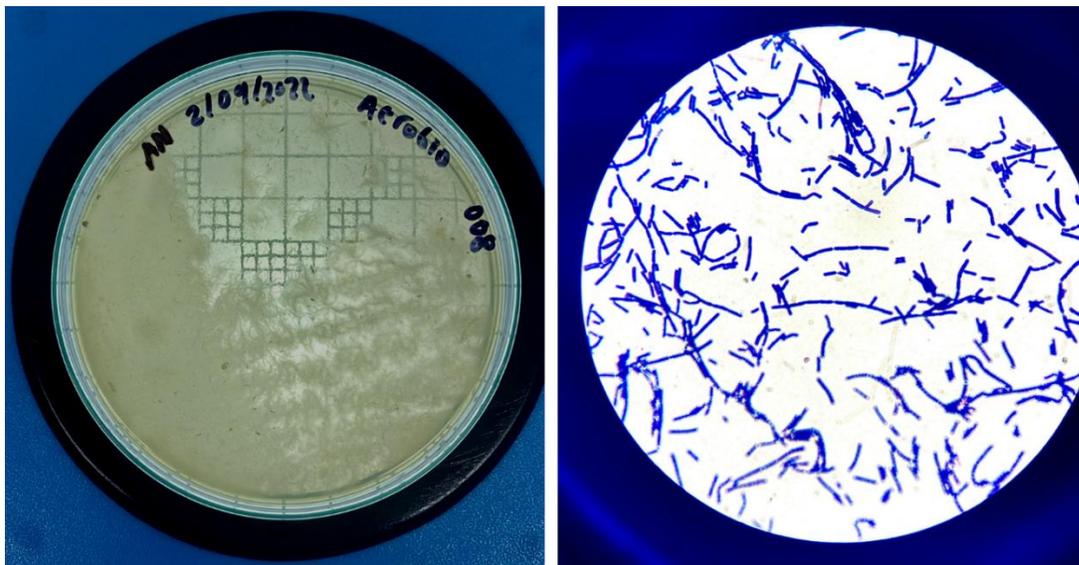
Fuente: Elaboración propia

La observación de las colonias bacterianas reveló la presencia de características morfológicas típicas y significativas, las cuales proporcionaron información para su clasificación. Se visualizaron diversas formas que presentaban variaciones notables. Entre ellas, se identificaron diferentes formas irregulares, onduladas y de bordes, lo que aportaba un aspecto visual distintivo a las diferentes colonias bacterianas. Además, se observó que

la tinción de Gram reveló importantes detalles sobre la composición de la pared celular de las bacterias. Algunas colonias mostraron una tinción Gram positiva, caracterizada por un color púrpura intenso, mientras que otras presentaron una tinción Gram negativa, manifestándose con un color rosado.

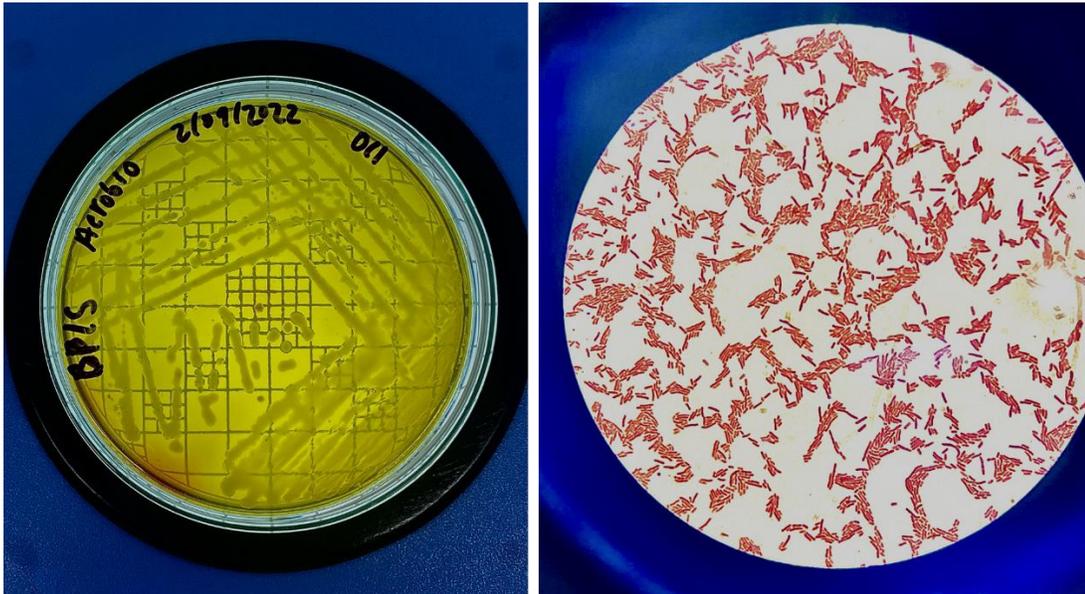
Esta información fue relevante para comprender las diferencias en la estructura y composición de las cepas bacterianas identificadas, las Figura 2-3 , Figura 2-4 y Figura 2-5, muestran estas diferencias y los medios de cultivo usados.

Figura 2-3: Caracterización morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar nutritivo, observación de colonia con forma rizoide, borde rizoide y consistencia dura. Bacilo largo, Gram positivo. Observación 100x



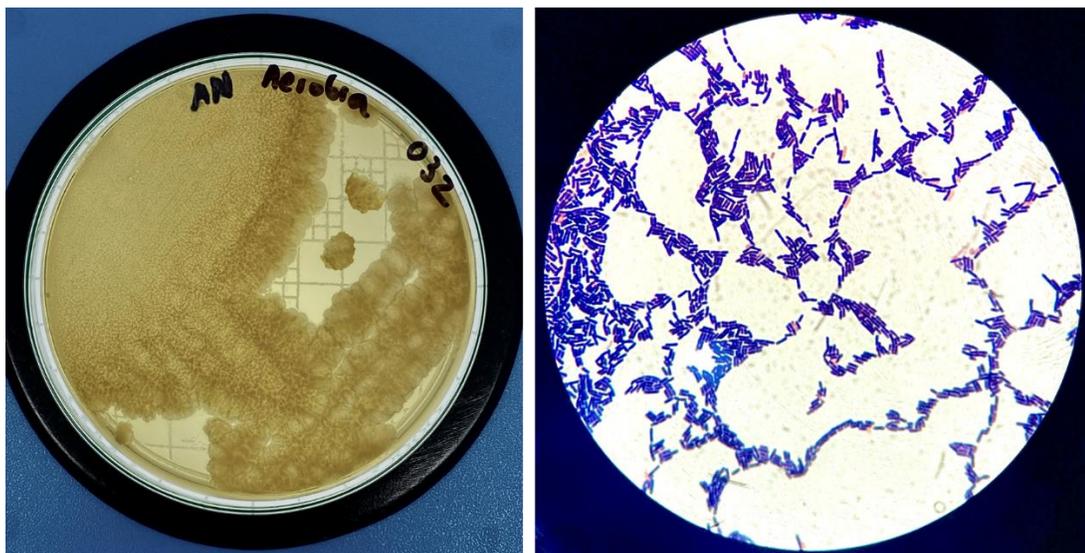
Fuente: Elaboración propia

Figura 2-4: Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar BPLS, observación de colonia con forma irregular, borde ondular y consistencia suave. Bacilos Gram negativos. Observación 100x



Fuente: Elaboración propia

Figura 2-5: Identificación morfológica de la colonia y coloración de célula bacteriana. Medio de cultivo agar nutritivo, observación de colonia con forma irregular, borde lobulado, elevación umbilicada y consistencia mucoide. Célula bacteriana alargada con forma de bastón Gram positivo. Observación 100x



Fuente: Elaboración propia

2.3.2 Pruebas bioquímicas

Para los bacilos Gram negativos el sistema API 20E indicó un orden predominante, las Enterobacterales, con cuatro familias diferentes, Enterobacteriaceae, Erwinae, Morganellaceae y Yersinaceae. Los géneros y especies que se indican en la Tabla 2-2, muestran la codificación correspondiente basada en los registros de aislamiento que detallan las características de la colonia y la identificación mediante la tinción de Gram y las pruebas API.

Tabla 2-2: Cultivos bacterianos seleccionados e identificados con el Sistema API 20E.

Código	Característica de la colonia	Identificación por Gram	Identificación pruebas API
OO3	Colonia redonda, elevación convexa, textura lisa brillante y color amarillento.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Erwinia sp</i>
OO5	Colonia ovalada de pequeño tamaño, elevación plana, textura lisa brillante y color blanco amarillento.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Pantoea sp</i>
O10	Colonias redondas irregulares, con bordes bien definidos y una textura granulada y gran elevación y color amarillento rosado.	Negativo con forma de bastón	<i>Providencia alcalifaciens</i>
O11	Color blanco, redondas irregulares, con bordes bien definidos y una textura granulada y gran elevación.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Providencia stuarti</i>
O21	Color blanco, redondas irregulares, con bordes bien definidos y una textura granulada y gran elevación.	Negativo con forma de colibacilo	<i>Serratia ficaria</i>
O25	Colonias redondas, con bordes definidos y coloración amarilla, naranja y textura lisa.	Negativo con forma de bastón	<i>Citrobacter koseri</i>

Fuente: Elaboración propia

Además de la identificación de los aislados intestinales de *P. cochliodon* que presentaron coloración Gram positiva, se llevó a cabo una evaluación de su actividad enzimática y bioquímica en medios de cultivo, estos resultados se indican en la Tabla 2-3. Se determinó la presencia de cuatro enzimas específicas: catalasa, caseinasa, amilasa y lecitinasa. Se observó que todos los aislados intestinales de *P. cochliodon* evaluados presentaban la enzima catalasa. En cuanto a la caseinasa, enzima que descompone la caseína, se encontró que todos los aislados intestinales de *P. cochliodon* también presentaban esta

actividad enzimática. En relación con la lecitinasa, se observó que tres de los aislados intestinales de *P. cochliodon* mostraban la actividad de esta enzima. Por último, la enzima amilasa, responsable de la descomposición del almidón, se detectó en cuatro de los aislados intestinales de *P. cochliodon*. La actividad enzimática se evidenció mediante la formación de halos alrededor de las colonias bacterianas en los medios de cultivo específicos (Fotografía en Anexo C). Estos halos indicaron la presencia de las enzimas y proporcionaron información sobre la capacidad de las bacterias para utilizar y descomponer diferentes sustratos. La Tabla 2-3 muestra la codificación correspondiente basada en los registros de aislamiento, que detallan las características de la colonia y la identificación mediante la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas.

Tabla 2-3: Características bioquímicas de algunas bacterias del género *Bacillus*.

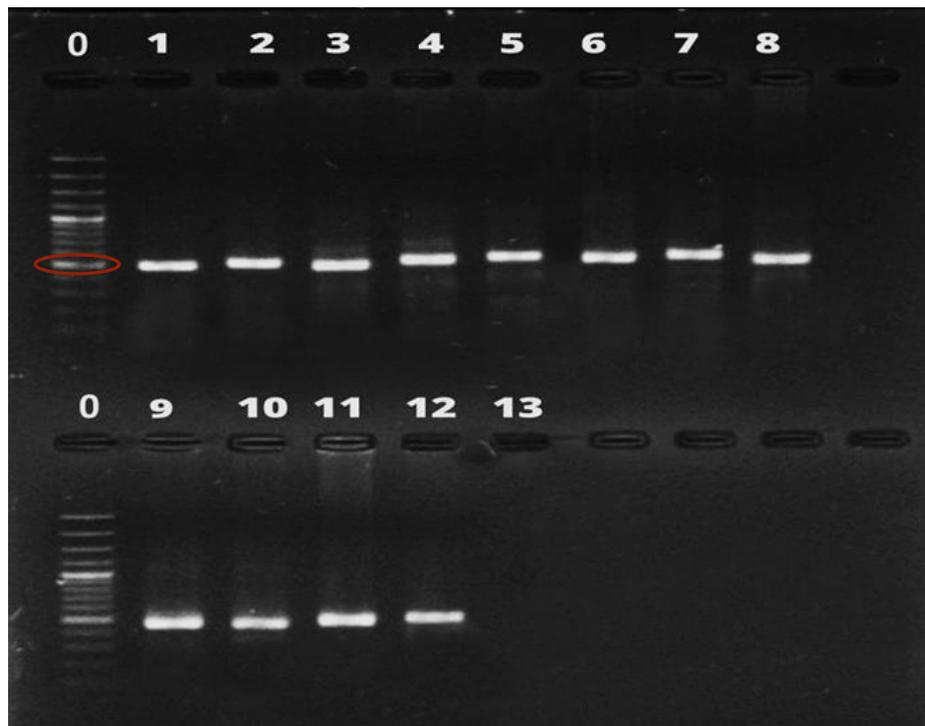
Código	Característica de la colonia	Identificación por Gram	Identificación pruebas bioquímicas
OO4	Colonias opacas y blanquecinas, circulares con bordes lisos y textura rugosa.	Positivo con forma de bastón	<i>B.subtilis</i>
OO8	Forma ramificada, color blanco o crema, tienen bordes irregulares y grandes y forman una capa gelatinosa en el medio de cultivo	Positivo con forma de bastón	<i>B.mycoides</i>
O32	Redonda y compacta, con bordes bien definidos. Colonias lisas y brillantes, con una textura similar a la cera y color blanco o crema.	Positivo con forma de bastón	<i>B.sphaericus</i>
O33	Colonias redondas, con bordes definidos y coloración blanca o cremosa, textura lisa.	Positivo con forma de baston	<i>B.circulans</i>
O13	Redonda con bordes lisos, aspecto opaco, Colonias lisas, color blanco o amarillento.	Positivo con forma de baston	<i>B.coagulans</i>
O14	Color blanco y opaco, redondas o ligeramente irregulares, con bordes bien definidos y una textura suave y gran elevación.	Positivo con forma de baston	<i>B.thurigiensis</i>

Fuente: Elaboración propia

2.3.3 Caracterización de aislamientos cultivables con secuencias del gen ADNr 16S

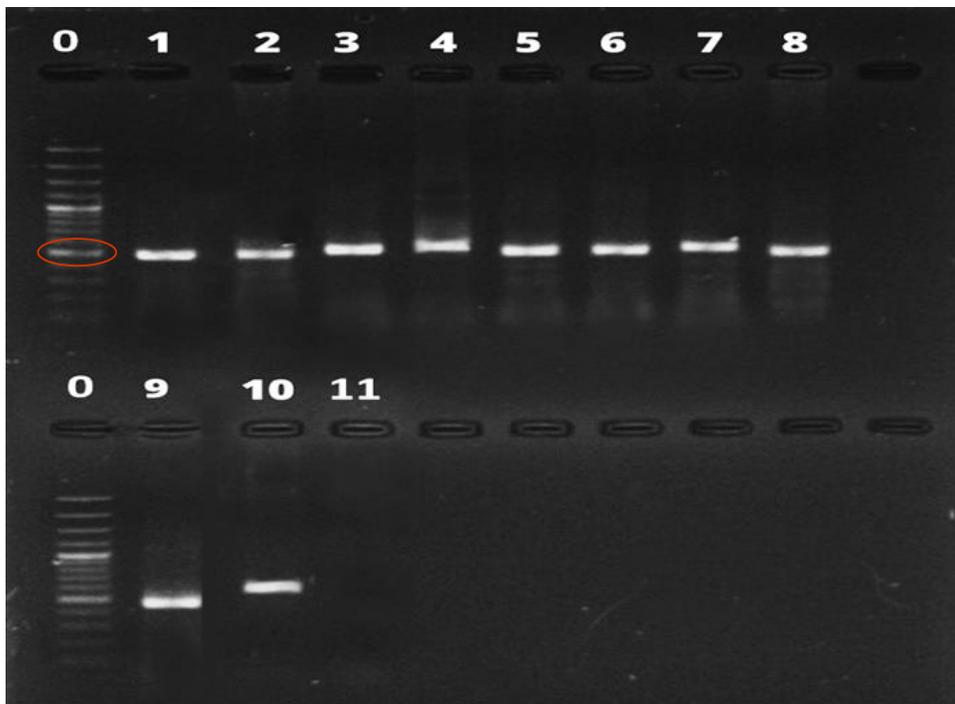
Los resultados revelaron la caracterización de los aislamientos bacterianos mediante la secuenciación del gen ADNr 16S. Se presentaron las afiliaciones filogenéticas y las similitudes de los microorganismos identificados durante el proceso de secuenciación, de esta manera los aislamientos mostraron afinidad filogenética con los phylum Proteobacteria y Firmicutes, dos grupos bacterianos ampliamente distribuidos y con diversidad funcional significativa; además, se identificaron diversas especies bacterianas en los aislamientos obtenidos entre ellas, se encontraron: *Aeromonas veronii*, *Enterobacter mori*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Citrobacter freundii*, *Shewanella xiamenensis*, *Enterobacter sichuanensis*, *Leclercia pneumonae paramycoides*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus nitratireducens*, *Bacillus atrophaeus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus pseudoxylosus*, *Mammaliicoccus sciuri* y *Lactococcus cremoris*. Las Figura 2-6 y Figura 2-7, muestran los perfiles de amplificación de las bacterias aisladas de la microbiota intestinal de *P. Cochliodon* en los geles de electroforesis de los productos de PCR convencional; estas imágenes aseguran la presencia de estas bacterias en las muestras analizadas con diferentes bandas entre 900 y 1000 bp aproximadamente.

Figura 2-6: Electroforesis de PCR de bacterias aisladas de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon* en gel agarosa. Los carriles se organizaron de la siguiente manera: 0, Marcador de Peso Molecular 1000 bp (DNA Ladder II DM2400); 1, *Staphylococcus pseudoxylosus* (S04009); 2, *Bacillus nitratireducens* (MCCC 1A00732); 3, *Pseudomonas alcaligenes* (NBRC 14159); 4, *Lactococcus cremoris* (NBRC 100676); 5, *Aeromonas veronii* (115/II); 6, *Bacillus velezensis* (FZB42); 7, *Bacillus atrophaeus* (NRRL NRS-213); 7, *Citrobacter freundii* (NBRC 1268); 8, control positivo *Escherichia coli* (ATCC 25922); 9, *Enterobacter mori* (YIM Hb-3); 10, *Enterobacter sichuanensis* (WCHECL1597); 11, *Bacillus paramycoides* (MCCC 1A04098); 12, control positivo *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028); 13, control sin ADN molde. En el círculo rojo se evidencia la banda clave.



Fuente: Elaboración propia

Figura 2-7: Electroforesis de PCR de bacterias aisladas de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon*. en gel agarosa. Los carriles se organizaron de la siguiente manera: 0, Marcador de Peso Molecular 1000 bp (DNA Ladder II DM2400); 1, *Mammaliicoccus sciuri* (DSM 20345); 2, *Leclercia pneumoniae* (49125); 3, *Bacillus amyloliquefaciens* (BCRC 11601); 4, *Staphylococcus capitis* subsp. *urealyticus* (MAW 8436); 5, *Shewanella xiamenensis* (S4); 6, *Bacillus thuringiensis* (IAM 12077); 7, *Staphylococcus pseudoxylosus* (S04009); 8, control positivo *Escherichia coli* (ATCC 25922); 9, *Bacillus velezensis* (FZB42); 10, *Enterobacter sichuanensis* (WCHECL1597); 11, control sin ADN molde.



Fuente: Elaboración propia

▪ Afiliación filogenética de los aislamientos cultivables

Los resultados de la Tabla 2-4 revelan que las identificaciones de las cepas bacterianas utilizando el software API WEB y el manual del Bergey, difieren algunas en la filogenia y la similitud genética encontrada en NCBI.

Los aislados que coincidieron tanto en las pruebas bioquímicas como en las pruebas moleculares fueron *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus paramycoides*, con un porcentaje de similitud entre el 90% y 98% respectivamente.

Tabla 2-4: Identificaciones de las cepas bacterianas utilizando el software API WEB y el manual del Bergey.

Código	Identificación pruebas API	Software API WEB y al manual de Bacteriología Bergey	Afiliación filogenética	NCBI similitud genética
OO5	<i>Pantoea sp</i>	95.30%	<i>Enterobacter sichuanensis</i>	98.30%
OO3	<i>Erwinia sp</i>	97.90%	<i>Enterobacter mori</i>	98.90%
O11	<i>Providencia stuarti</i>	98.00%	<i>Leclercia pneumoniae</i>	98.80%
O10	<i>Providencia alcalifaciens</i>	99.70%	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	99.80%
O21	<i>Serratia ficaria</i>	98.00%	<i>Shewanella xiamenensis</i>	99.70%
O25	<i>Citrobacter koseri</i>	98.00%	<i>Aeromonas veronii</i>	99.40%
O32	<i>B.sphaericus</i>	90.00%	<i>Bacillus velezensis</i>	99.20%
OO4	<i>B.subtillis</i>	90.00%	<i>Bacillus nitratireducens</i>	98.90%
O14	<i>B.thuringiensis</i>	98.00%	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.60%
OO8	<i>B.mycoides</i>	90.00%	<i>Bacillus paramycoides</i>	98.40%
O13	<i>B.coagulans</i>	90.00%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98.90%
O33	<i>B.circulans</i>	90.00%	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99.50%

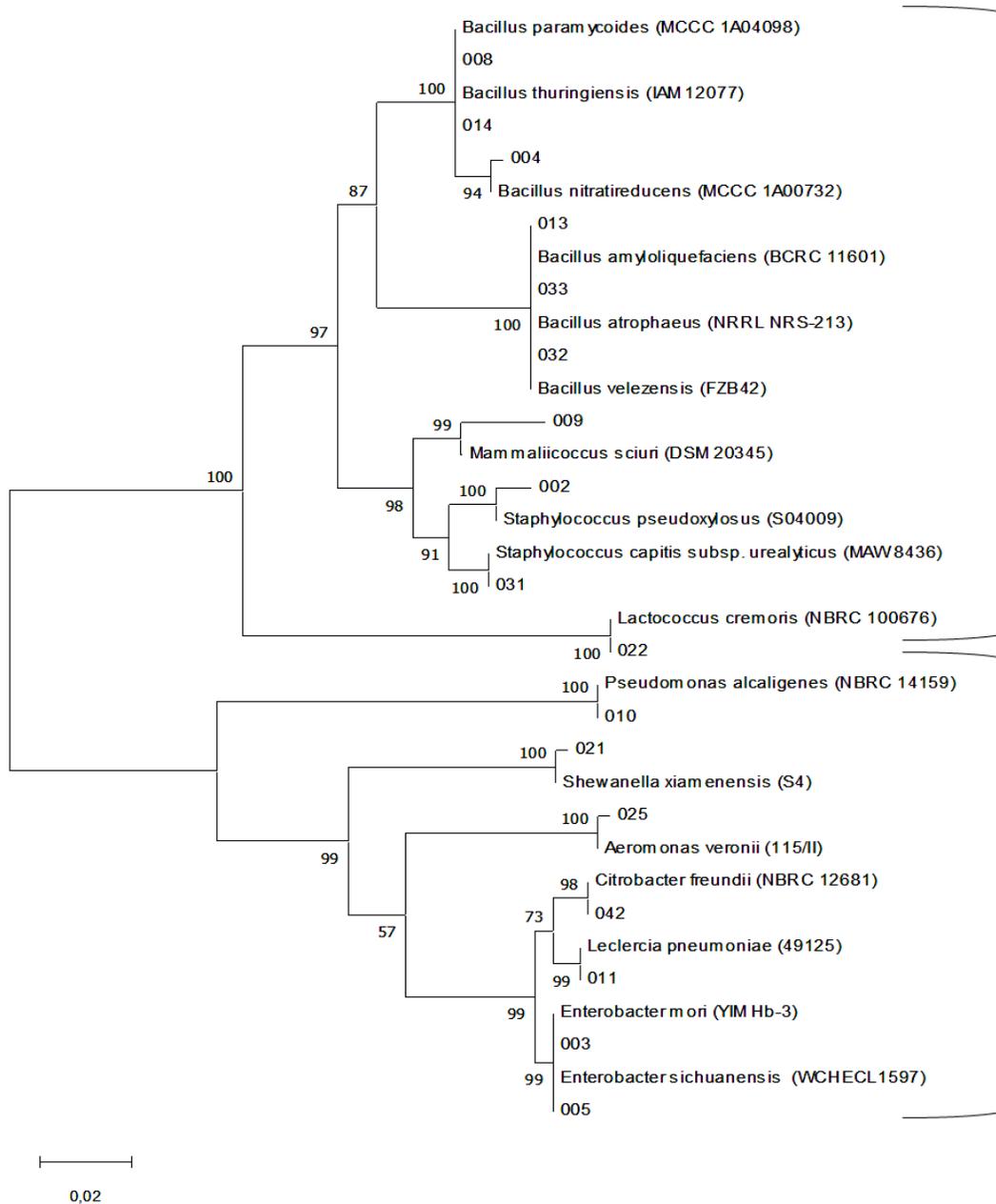
Fuente: Elaboración propia

El árbol filogenético presentado en la Figura 2-8, muestra la estructura óptima obtenida a partir de los datos analizados. El árbol se dibujó a escala 0,02, lo que significó que las longitudes de las ramas representaron las distancias evolutivas en las mismas unidades. Para inferir el árbol filogenético; en total se analizaron 377 posiciones en el conjunto de datos final; los números de acceso al GenBank (identificadores únicos), se indican entre paréntesis, estos números permitieron una fácil referencia y acceso a la información detallada sobre las secuencias y las especies relacionadas.

El clado I del árbol filogenético agrupó diez secuencias relacionadas con tres diferentes familias bacterianas. En primer lugar, en la familia Micrococcaceae, representada por los microorganismos *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus pseudoxylosus* y *Mammaliococcus sciuri*. Estos compartieron una similitud genética en un rango del 96.42% al 99.89%. La siguiente familia en el clado I fue Bacillaceae, que incluyó las especies *B. paramycoides*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. nitratireducens* y *B. atrophaeus*. Estas bacterias estuvieron estrechamente relacionadas y presentaron similitudes genéticas en un rango del 96.12% al 98.99%. Por último, en el clado I se encontró la familia Streptococcaceae, representada por la especie *Lactococcus cremoris*, que compartió una similitud genética de 98.67%.

El clado II del árbol filogenético relacionó siete secuencias pertenecientes a cuatro familias bacterianas diferentes. En primer lugar, se encontró la familia Aeromonadaceae, representada por la especie *Aeromonas veronii*; en segundo lugar, se identificaron bacterias de la familia Enterobacteriaceae, incluyendo los microorganismos *Enterobacter mori*, *Leclercia pneumonaie* y *Citrobacter freundii*. Además, se halló la familia Shewanellaceae, representada por la especie *Shewanella xiamenensis*. Por último, en el clado II se identificó la familia Pseudomonadaceae, con la especie *Pseudomona alcaligenes* (Figura 2-8). Las bacterias en el clado II presentaron una similitud genética en el rango del 96.82% al 99.89%.

Figura 2-8. Árbol filogenético de bacterias aisladas del tracto intestinal de *P.cochliodon*



Fuente: Elaboración propia

2.4 Discusión

El presente estudio proporciona el primer informe sobre las cepas nativas cultivables asociadas al tracto gastrointestinal de *P. cochliodon*. Existen varios factores que pueden afectar la estructura del microbioma en peces: la captura y el confinamiento (A. R. Wang et al., 2018); el entorno en el que los peces habitan, la filogenia, la genética del hospedero y las dietas que consumen (Clements et al., 2014), así como la elección de alimentos y la disponibilidad de nutrientes (Fishelson et al., 1985; Muegge et al., 2011; Scott et al., 2013). Se sabe que los principales grupos de bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal en peces son aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias obligadas (Llewellyn et al., 2014) y, específicamente en peces de agua dulce, predominan bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Bacteroides* tipo A, junto con *Plesiomonas*. Los grupos menos abundantes incluyen *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Bacteroides* tipo B y *Fusarium* (Austin, 2006; Gómez & Balcázar, 2008). En el presente estudio, se identificaron poblaciones del orden Enterobacterales, cuyas características están asociadas a procesos fermentativos de glucosa y otros carbohidratos. Sin embargo, también se ha observado que estas bacterias pueden estar relacionadas con enfermedades debido a su naturaleza oportunista (Türe et al., 2022). Se han reportado hallazgos similares en la especie *Piaractus brachipomus* (Puello-Caballero et al., 2018) y en otras especies de agua dulce, aunque utilizando métodos moleculares para este mismo phylum. Estos estudios incluyen especies como *Oncorhynchus mykiss* (Michl et al., 2017), *Megalogramma amblycephala*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Carassius auratus*, *Ciprinus carpio*, *Hypophthalmichthys nobilis* y *H. molitrix* (Liu et al., 2016), *Oreochromis niloticus* (Zhai et al., 2017), *Ictalurus punctatus* (Bledsoe et al., 2016) y *Danio rerio* (Green et al., 2023)

Teniendo en cuenta el origen de las capturas, se espera que las influencias antropogénicas y ambientales puedan determinar la presencia de estos grupos en *P. cochliodon*, como se ha demostrado en otros estudios (Austin, 2006); (Llewellyn et al., 2014). Además, el hábito alimenticio particular de *P. cochliodon* podría proporcionar información sobre la presencia de estos microorganismos y su importancia en la transformación de la materia vegetal para obtener energía. Se ha descubierto que muchos comedores de madera, como *Panaque nigrolineatus* e *Hypostomus pyrineusi*, utilizan el biofilm asociado a la madera como fuente de microorganismos con actividad celulolítica, formando parte de su dieta

detritívora o xilófaga natural (D. P. German, 2009; D. German & Bittong, 2009; McCauley et al., 2020). Además, estudios con isótopos han demostrado una mayor actividad descomponedora en los organismos asociados al biofilm en comparación con los microorganismos endosimbióticos (Lujan et al., 2011). Estos hallazgos también se han corroborado en otros comedores de madera, como *Panaqolus albomaculatus*, *Panaqolus gnomus*, *Panaqolus nocturnus* y *Panaque bathyphilus*, lo que sugiere un papel más importante del microbioma del ambiente (madera y biofilm) que del microbioma intestinal (McCauley et al., 2020), incluso en peces con diferentes hábitos alimenticios (Kim et al., 2021). Se acepta que la concentración de microorganismos bacterianos en el tracto gastrointestinal de los peces puede superar los 10^8 heterótrofos/gr y 10^5 anaerobios/gr (Kamei et al., 1985; Talwar et al., 2018; Trust & Sparrow, 1974; (A. R. Wang et al., 2018); Yoshimizu & Kimura, 1976); en este estudio, se encontraron valores superiores a 10^5 .

Un phylum importante en peces es Firmicutes, que junto con Proteobacteria y Bacteroidetes, representan más del 90% de la microbiota intestinal (Talwar et al., 2018). En *P. cochlodon*, también se identificó Firmicutes, y se han reportado hallazgos similares en una variedad de peces de agua dulce con diferentes hábitos alimenticios (Izvekova et al., 2007). Dentro de Firmicutes se encuentra el género *Bacillus*, que es Grampositivo, catalasa positivo, forma endosporas y puede ser aeróbico o anaerobio facultativo. *Bacillus sp* es muy común en la naturaleza, incluyendo ambientes acuáticos (Ichimatsu et al., 2000); (Motta et al., 2004) y en el tracto gastrointestinal de los peces (A K Ray et al., 2012). El género *Bacillus sp* incluye especies con características especiales y de interés para la bioindustria, como la producción de diversas enzimas como amilasas, lipasas, proteinasas, celulasas, xilanasas y fitasas, entre otras (A K Ray et al., 2012). También se ha demostrado que algunas especies de *Bacillus* producen fungistáticos y bacteriocinas (Abriouel et al., 2011).

Por otra parte, la presencia de *B. coagulans* en el tracto gastrointestinal de peces ha sido ampliamente documentada en diferentes especies, como *Catla catla*, *Labeo rohita* y *Cirrinhus mrigala*. Estas investigaciones han revelado la actividad de enzimas clave como la amilasa, la proteasa y la celulasa, lo que sugiere que esta bacteria desempeña un papel importante en la digestión y la utilización de nutrientes en estos peces (A. Ray et al., 2010).

Otra especie de *Bacillus sp*, *B. circulans*, también se ha encontrado en el tracto gastrointestinal de peces como *Cyprinus carpio*, *Oreochromis mossambicus* y *Ctenopharyngodon Idella*, mostrando una elevada actividad celulolítica. Esto indica que estas bacterias son capaces de descomponer la celulosa y aprovecharla como fuente de energía (Arun K. Ray et al., 2007); (Saha et al., 2006), lo que podría reforzar su hallazgo e importancia en *P. cochliodon*. En el caso de *Salmo salar*, se ha reportado la presencia de *B. thurigiensis*, que exhibe un amplio espectro de actividad enzimática, lo que podría implicar una capacidad versátil para la utilización de diferentes sustratos (Askarian et al., 2012). Además de su capacidad enzimática, la capacidad de las especies de *Bacillus sp* para formar esporas les confiere una ventaja significativa en diversos hábitats. Estas bacterias han demostrado ser eficientes en la bio-remediación de aguas residuales industriales, contribuyendo a la eliminación de contaminantes y mejorando la calidad del agua (Deng et al., 2020; Wróbel et al., 2023). También se ha destacado su papel en el mantenimiento de la calidad del agua en acuicultura, lo que es crucial para garantizar un entorno óptimo para el crecimiento y bienestar de los peces (Hlordzi et al., 2020). En este sentido, se ha subrayado su potencial en la promoción de una acuicultura sustentable, al brindar soluciones efectivas y amigables con el medio ambiente (Kamilya & Devi, 2022). La aplicación de especies de *Bacillus sp* como probióticos en diferentes modelos animales ha ganado reconocimiento y atención; en peces, estos probióticos han demostrado beneficios significativos, como la mejora del crecimiento y la eficiencia alimenticia, el aumento de la resistencia al estrés, la estimulación del sistema inmunológico y la protección contra enfermedades (Gutiérrez-Ramírez et al., 2016; Tan et al., 2019; Chu et al., 2020; Meidong et al., 2021). Su uso se considera una estrategia prometedora para promover el bienestar general de los peces en la acuicultura, optimizando su rendimiento y reduciendo el impacto de enfermedades y factores estresantes (Carnevali et al., 2017).

Los estudios realizados en microbiota de peces son determinantes para identificar los procesos de absorción de nutrientes en especímenes que, como el *Panaque sp* utilizan fuentes de carbono complejas y diversas, y desde allí alcanzan sus requerimientos nutricionales (Castañeda-Monsalve et al., 2019), estas afirmaciones ratifican la importancia de los hallazgos encontrados en la microbiota de este pez, máxime que constituye el primer reporte para la especie *cochliodon*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, se observaron diferencias en cuanto al género y especie de las cepas bacterianas, al compararlas con los resultados obtenidos en las pruebas moleculares.

Los resultados evidencian que las pruebas moleculares son una alternativa de detección de microorganismos, además que disminuyen el tiempo para la emisión de los resultados de días a horas, aportando una alta sensibilidad y especificidad (Huertas-Caro et al., 2019) sin embargo, las pruebas bioquímicas también aportan ventajas en la identificación del comportamiento fisiológico del microorganismo, especialmente por la capacidad que estas presentan de degradar y metabolizar compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en las baterías bioquímicas.

En los estudios de diversidad del microbioma realizados en esta investigación, se encontró que los grupos más abundantes en el tracto gastro intestinal de *P.cochliodon* pertenecen a los phylum Firmicutes y Proteobacteria, resultados similares a los reportados por varios autores (A. Wang et al., 2017 y Borges et al.,2021).

3. Capítulo 3. Caracterización molecular de la microbiota no cultivable en *Panaque cochliodon*

3.1 Metodología

3.1.1 Extracción de ADN de microbiota no cultivable del intestino de *P. cochliodon*

Para la extracción del ADN de la microbiota intestinal no cultivable, se empleó el kit de extracción DNA BIO BASIC CANADA INC ALL-IN-ONE MINI-PREPS KIT HANDBOOK (TISSUE). El procedimiento se llevó a cabo en las 27 muestras de tejido seleccionadas de la siguiente manera: 9 muestras de intestino anterior, 9 muestras de intestino medio y 9 de intestino posterior, inicialmente, se maceró de manera independiente cada muestra de cada intestino en un crisol de porcelana utilizando nitrógeno líquido. Se tomaron aproximadamente 150 miligramos de intestino y se transfirieron a un tubo plástico de fondo cónico de 2,0 ml. Luego, se adicionó 350 µl de buffer lisis. La muestra se homogeneizó mediante vortex hasta obtener una consistencia uniforme, sin grumos. El tubo se incubó a temperatura ambiente (TA) durante cinco minutos y, posteriormente, se centrifugó a 15.000 RPM durante tres minutos a 4°C. El lisado obtenido se transfirió a una columna EZ 10 DNA y se mantuvo a TA durante un minuto. A continuación, se centrifugó a 13.000 RPM durante un minuto a TA, desechando el líquido resultante. Se procedió a agregar 350 µl de tampón lisis DRP a la columna de ADN EZ-10 y se mantuvo a TA durante un minuto. Luego se centrifugó a 13.000 RPM durante un minuto a TA, el líquido resultante se desechó. La columna de ADN EZ-10 se colocó en el tubo de recolección y se añadieron 500 µl de solución CW1 a la columna. Se mantuvo a TA durante un minuto y luego se centrifugó a 1300 RPM durante un minuto a TA, desechando el líquido en el tubo de recogida. A continuación, se repitió el proceso al colocar nuevamente la columna de ADN EZ-10 en el

tubo de recolección y se agregaron 500 µl de solución CW2 a la columna. Se mantuvo a TA durante un minuto y luego se centrifugó a 13.000 RPM durante un minuto a TA, desechando el líquido resultante en el tubo de recogida (verificar CW2). Para finalizar, la columna de ADN EZ-10 se colocó en el tubo de recolección y se centrifugó a 13.000 RPM durante dos minutos a TA. Se dejó la columna de centrifugación abierta a TA durante cinco minutos para permitir que el etanol se evaporara completamente. Luego se transfirió la columna de centrifugación a un tubo de centrífuga limpio de 1.5 ml, asegurándose de retirar la membrana de la columna de ADN EZ-10. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 RPM durante un minuto. Se añadieron 60 µl de tampón CE directamente en la parte central de la membrana de la columna de ADN EZ-10. Se incubó a TA durante cinco minutos y luego se centrifugó durante dos minutos a 13.000 RPM para eluir el ADN (se repitió otro ciclo de dos minutos). La solución en el tubo de centrífuga contenía la muestra de ADN, la cual pudo utilizarse inmediatamente para análisis moleculares o almacenarse a una temperatura de -80°C para su uso posterior.

▪ **Cuantificación del ADN de microbiota no cultivable del intestino de *P. cochliodon***

Para medir con alta precisión y sensibilidad las concentraciones de ADN, se empleó un fluorómetro (QUBIT 4.0 FLUORÓMETRO INVITROGEN Q33226). Esta metodología ofreció varias ventajas al minimizar los efectos de los contaminantes y el ruido del ADN o ARN degradados presentes en cada muestra. La precisión y sensibilidad del fluorómetro permitieron realizar mediciones confiables, incluso en concentraciones bajas de ADN.

En las 27 muestras de tejido analizadas, se observaron concentraciones mínimas de ADN de 28,8 ng/µl, lo cual indicó que, incluso, la muestra con menor concentración de ADN aún contenía una cantidad suficiente para su posterior análisis; por otro lado, las concentraciones máximas de ADN alcanzaron los 57,7 ng/µl. Estas concentraciones fueron consideradas adecuadas para su uso en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la Tabla 3-1, se presenta la cuantificación del ADN intestinal y los resultados de la visualización de las bandas de PCR de la microbiota intestinal de los ejemplares de *P.cochliodon*.

Tabla 3-1: Cuantificación ADN de intestino de ejemplares de *Panaque cochliodon*

Número de la muestra	Muestra secciones Intestino	ADN Resultado (ng/ul)
1	A	57.9
2	A1	32.8
3	A2	49.9
4	A3	50
5	A4	41.7
6	A5	45.4
7	A6	46.3
8	A7	49.4
9	A8	39.4
10	M	50
11	M1	35.7
12	M2	37.8
13	M3	37.3
14	M4	48.9
15	M5	55
16	M6	52
17	M7	51
18	M8	28.2
19	P	29.4
20	P1	52
21	P2	53
22	P3	55
23	P4	54
24	P5	57
25	P6	57
26	P7	43.7
27	P8	57

Fuente: Elaboración propia

▪ **Amplificación por PCR de secuencias de microbiota no cultivable del intestino de *P. cochliodon***

La amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó como un procedimiento fundamental para replicar de manera precisa y rápida las secuencias específicas de ADN obtenidas de los microorganismos de interés. Se implementó una combinación de cebadores y enzimas termoestables para obtener volúmenes significativos de ADN aptos para su posterior análisis por secuenciación. Para diseñar la amplificación de PCR, se preparó una mezcla de reacción final de 12.5 µl para cada muestra. El protocolo se inició con la adición de 2 µl de ADN como molde. Los cebadores específicos

utilizados para amplificar el gen completo del ADNr 16S fueron 27 F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG – 3') y 1492 R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'). A la mezcla se agregaron 0.25 µl de cada cebador, así como 6,25 µl del PCR *master mix*, que contenía la enzima ADN polimerasa y una solución tampón óptima para la reacción. El volumen final de reacción se completó con 3,75 µl de agua estéril de grado molecular. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación en un termociclador PCR Miniamp (APPLIED BIOSYSTEM). Mediante un programa específico, se realizó una etapa de desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 30 segundos, lo que permitió separar las dos cadenas de ADN complementarias, obteniendo así hebras simples. A continuación, se realizó la etapa de apareamiento de los cebadores a una temperatura de 55 °C durante 40 segundos, la cual fue seleccionada con base al cálculo de la temperatura de fusión (TM) y al contenido de guaninas y citosinas presentes en los cebadores. Esta etapa facilitó la unión específica de los cebadores a las secuencias objetivo del ADN. Finalmente, se llevó a cabo la etapa de extensión a una temperatura de 68 °C durante dos minutos, para asegurar la actividad completa de la ADN polimerasa y la finalización de la síntesis de las cadenas complementarias. La amplificación se realizó a lo largo de 30 ciclos y el programa de PCR se concluyó con una etapa de mantenimiento a 4 °C infinito. De esta manera, se generaron los productos de amplificación de ADN mediante PCR convencional.

- **Electroforesis de los productos de PCR de microbiota no cultivable del intestino de *P. cochliodon***

Para la visualización de las bandas amplificadas de las 27 muestras de ADN, se aplicó el mismo protocolo ejecutado para los productos de PCR de la microbiota cultivable.

Posteriormente, se procedió a la visualización de las bandas de ADN en el gel de agarosa. Para esto, se utilizó un sistema de tinción GelRed como tinte fluorescente que ayudó a resaltar las moléculas de ADN y hacerlas visibles. Esto permitió confirmar la presencia de los amplicones esperados de 1500 pb y verificar la calidad de las amplificaciones obtenidas. Luego, las muestras de la mezcla de reacción final de PCR, que contenían los productos amplificados de ADN, fueron enviadas al laboratorio genómico de One Health de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, donde se llevó a cabo la secuenciación de los nucleótidos de interés presentes en cada muestra.

▪ **Secuenciación de la microbiota no cultivable**

Se seleccionó el gen ADNr 16S debido a su alta conservación y presencia en el ADN bacteriano. Para realizar la secuenciación, se preparó una biblioteca de ADN, la cual consistió en cargar la plataforma de secuenciación del sistema MinION de Oxford Nanopore Technologies; este sistema utiliza nanoporos para dirigir los fragmentos de ADN durante el proceso de secuenciación. En primera instancia, se dividió el ADN amplificado en fragmentos más grandes y se agregaron adaptadores a sus extremos. Los adaptadores contenían secuencias específicas que permitieron el reconocimiento de los nanoporos en el secuenciador. Luego, se cargó la biblioteca de ADN en el secuenciador, permitiendo que los fragmentos de ADN pasaran a través de los nanoporos de forma individual. Cada nanoporo estaba equipado con sensores capaces de detectar cambios en la conductancia eléctrica a medida que el ADN pasaba, la secuenciación se llevó a cabo en tiempo real mientras los fragmentos de ADN atravesaron los nanoporos, y se registraron las señales de conductancia eléctrica generadas por los cambios en la estructura del ADN. Estas señales de conductancia eléctrica se convirtieron en datos digitales, los cuales posteriormente se utilizaron para reconstruir la secuencia original del ADN. Una vez finalizada la secuenciación, se procedió al análisis de los datos obtenidos. Dichos datos fueron procesados y analizados para identificar las secuencias de ADN correspondientes al gen 16S de las bacterias presentes en la muestra. Este análisis implicó la comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos de referencia que contenían información sobre los diferentes genotipos y la composición bacteriana. Gracias a este proceso, fue posible identificar y cuantificar las especies bacterianas presentes en el tracto gastrointestinal, proporcionando información relevante sobre la diversidad y la estructura de la comunidad bacteriana en el *Panaque cochliodon*.

▪ **Análisis bioinformático de la microbiota no cultivable**

Durante el proceso de secuenciación, se generaron archivos en formato FASTQ (<https://learn.gencore.bio.nyu.edu/ngs-file-formats/fastq-format>), ampliamente utilizados en estudios de secuenciación genómica, que contenían información sobre las secuencias de ADN obtenidas. El análisis bioinformático se llevó a cabo en varias etapas para obtener una visión completa de la composición y estructura de la microbiota intestinal. En el primer paso, se realizó el preprocesamiento de datos y la asignación de secuencias de códigos de barras (barcodes), utilizando la herramienta Barcoder Guppy

(<https://dashboard.hpc.unimelb.edu.au/software/guppy>). Esto ayudó a identificar y asignar las secuencias a las muestras correspondientes para un análisis preciso de la microbiota en cada muestra. Posteriormente, se procedió a la concatenación de las lecturas (reads) de ADN, tomando la carpeta correspondiente a cada barcode y uniendo todos los reads en un solo archivo. En el segundo paso, se detectaron y corrigieron errores mediante la herramienta Seqkit (<https://bioinf.shenwei.me/seqkit>). Esta corrección eliminó duplicados en las secuencias obtenidas, evitando la sobre representación y asegurando una representación más precisa de la microbiota intestinal. Para evaluar la calidad de los datos, se utilizó FastQC (<https://pbertinblog.wordpress.com/fastqc>), una herramienta que analizó la distribución de las bases, el contenido de secuencias duplicadas, la presencia de adaptadores y otros ruidos que podrían afectar la interpretación de los resultados. Este análisis proporcionó información importante sobre la calidad de los datos secuenciados. En el tercer paso, se agruparon las secuencias similares y se realizaron filtrados utilizando Nanofilt (<https://pypi.org/project/NanoFilt>). Esta herramienta permitió eliminar lecturas de baja calidad, adaptadores y secuencias cortas no deseadas que pudiesen haber sido generadas durante la secuenciación por nanoporos en la microbiota intestinal. Se establecieron parámetros de calidad para los reads, asegurando la selección de secuencias con un valor óptimo de alrededor de 1600 a 2000 pares de bases. Posteriormente, se verificaron nuevamente los parámetros de calidad utilizando NanoPlot (<https://bio.tools/nanoplot>). Esta herramienta proporcionó una visualización detallada de los datos filtrados, incluyendo gráficos y estadísticas para evaluar la calidad de las lecturas, la distribución de longitudes de secuencia y el contenido de bases. El cuarto paso consistió en la asignación taxonómica de las secuencias genómicas de la microbiota intestinal utilizando Kraken 2 (<https://ccb.jhu.edu/software/kraken2>). Esta herramienta empleó la base de datos ARN ribosómico de Silva (<https://www.arb-silva>) para asignar una identidad taxonómica a las secuencias, basándose en su similitud con las secuencias de referencia en la base de datos. Esto facilitó identificar y cuantificar los diferentes microorganismos presentes en las muestras, proporcionando información detallada sobre la composición taxonómica de la microbiota intestinal y facilitando el análisis comparativo entre muestras o grupos de estudio. En el quinto paso, se llevó a cabo el análisis de diversidad utilizando Pavian (<https://github.com/fbreitwieser/pavian/>), esta herramienta de visualización aportó al análisis y a la representación gráfica los datos obtenidos, incluyendo información taxonómica, filogenética y funcional. Esto proporcionó una interpretación más sencilla y

una identificación más precisa de los patrones de diversidad en la microbiota intestinal. Por último, se realizaron análisis adicionales utilizando el lenguaje de programación estadística R, The R Project for Statistical Computing, (<https://www.r-project.org/>). Estos análisis permitieron comparar las composiciones de la microbiota intestinal del *Panaque cochliodon* entre diferentes muestras o grupos, con el objetivo de identificar diferencias significativas y obtener una mayor comprensión de la estructura y diversidad de la microbiota en este organismo.

3.2 Resultados

3.2.1 Caracterización de microbiota intestinal no cultivable con el gen ADNr 16S

Como resultado de los protocolos de extracción y demás metodológicos, en la Tabla 3-2, se registraron y clasificaron las diferentes secuencias obtenidas a partir de las muestras intestinales de cada individuo, con su correspondiente Barcode, siendo único para cada muestra, garantizando su integridad y trazabilidad y facilitando la interpretación y comparación de los datos.

Tabla 3-2: Barcodes de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon*

<i>Panaques cochliodon</i>	ADN intestinal		Barcodes	
	ID	Pools	BC	
Intestino anterior de 3 ejemplares	A	Pool 1	BC02	
	A1			
	A2			
	A3	Pool 2	BC03	
	A4			
	A5			
	Intestino Medio de 3 ejemplares	A6	Pool 3	BC04
		A7		
A8				
Intestino Medio de 3 ejemplares	M	Pool 4	BC05	
	M1			
	M2			

<i>Panaques cochliodon</i>	ADN intestinal		Barcodes	
	ID	Pools	BC	
	M3	Pool 5	BC06	
	M4			
	M5			
	M6	Pool 6	BC07	
	M7			
	M8			
	Intestino posterior de 3 ejemplares	P	Pool 7	BC08
		P1		
P2				
P3		Pool 8	BC09	
P4				
P5				
		P6	Pool 9	BC10
		P7		
	P8			

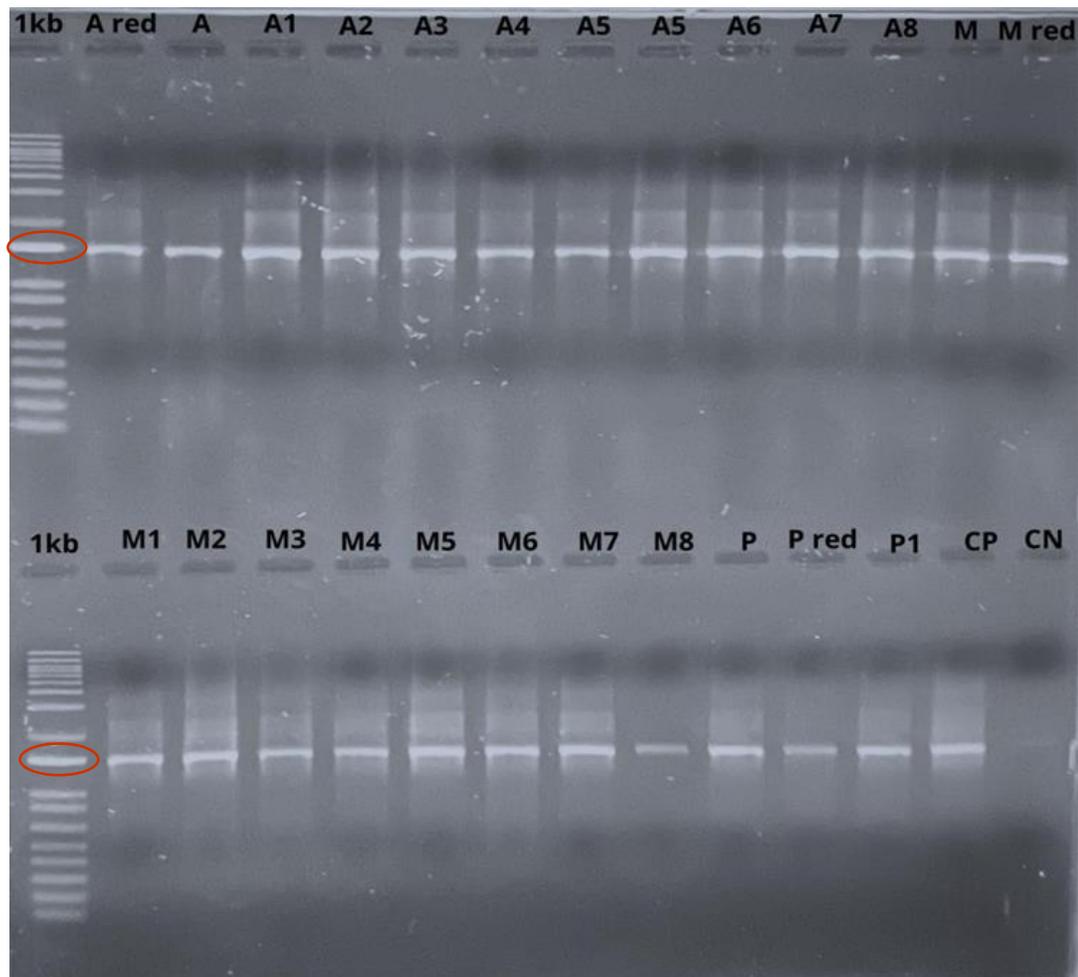
Fuente: Elaboración propia

▪ **Electroforesis de los productos de PCR de la microbiota intestinal no cultivable con el gen ADNr 16S**

En las Figura 3-1 y Figura 3-2 se observan diferentes bandas bien definidas y organizadas de la siguiente forma:

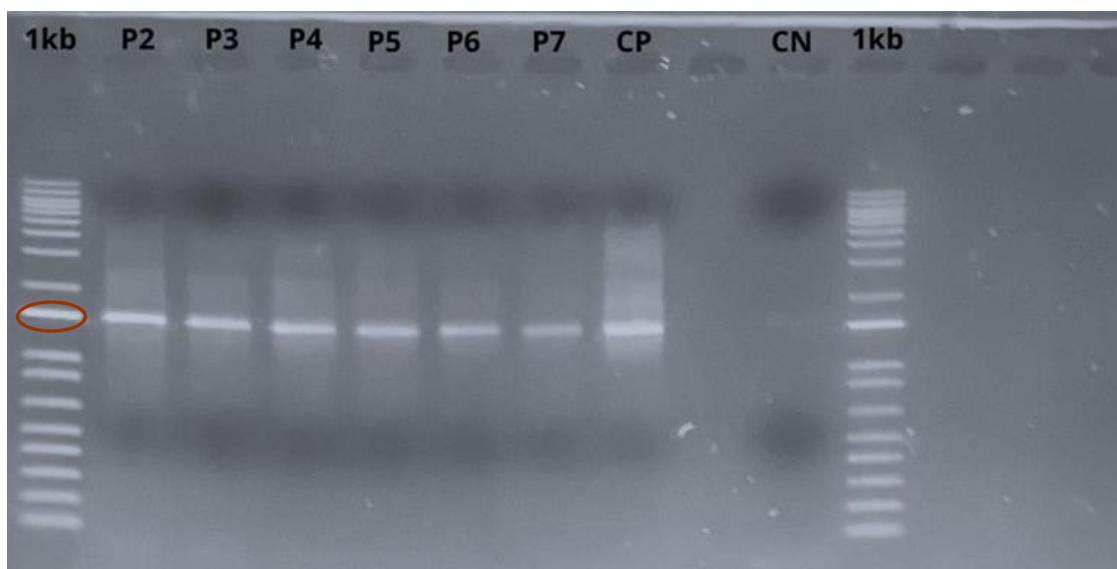
Figura 3-1: Electroforesis de PCR secciones anterior y medio del intestino de la microbiota no cultivable de *Panaque cochliodon*. Los carriles con la letra A corresponden al intestino anterior, los carriles con la letra M corresponden al intestino medio y los carriles con la letra P corresponden al intestino posterior, CP corresponde al control positivo *Escherichia coli* (ATCC 25922) y CN corresponde al control negativo sin ADN molde. Además, se incluyeron los carriles de 1kb, que correspondieron al marcador de peso molecular de 15000 pb (1% agarosa tinción en SYBR safe). Las muestras visualizadas presentan

diferentes bandas cuyo peso molecular está entre las 1500 pb (amplicón esperado), para las dos figuras.



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-2: Electroforesis de PCR secciones anterior y medio del intestino de la microbiota no cultivable de *Panaque cochliodon*. Los carriles con la letra A corresponden al intestino anterior, los carriles con la letra M corresponden al intestino medio y los carriles con la letra P corresponden al intestino posterior, CP corresponde al control positivo *Escherichia coli* (ATCC 25922) y CN corresponde al control negativo sin ADN molde. Además, se incluyeron los carriles de 1kb, que correspondieron al marcador de peso molecular de 15000 pb (1% agarosa tinción en SYBR safe). Las muestras visualizadas presentan diferentes bandas cuyo peso molecular está entre las 1500 pb (amplicón esperado), para las dos figuras.



Fuente: Elaboración propia

- **Diagramas de flujo de las secuencias genómicas de la microbiota intestinal no cultivable con el gen ADNr 16S**

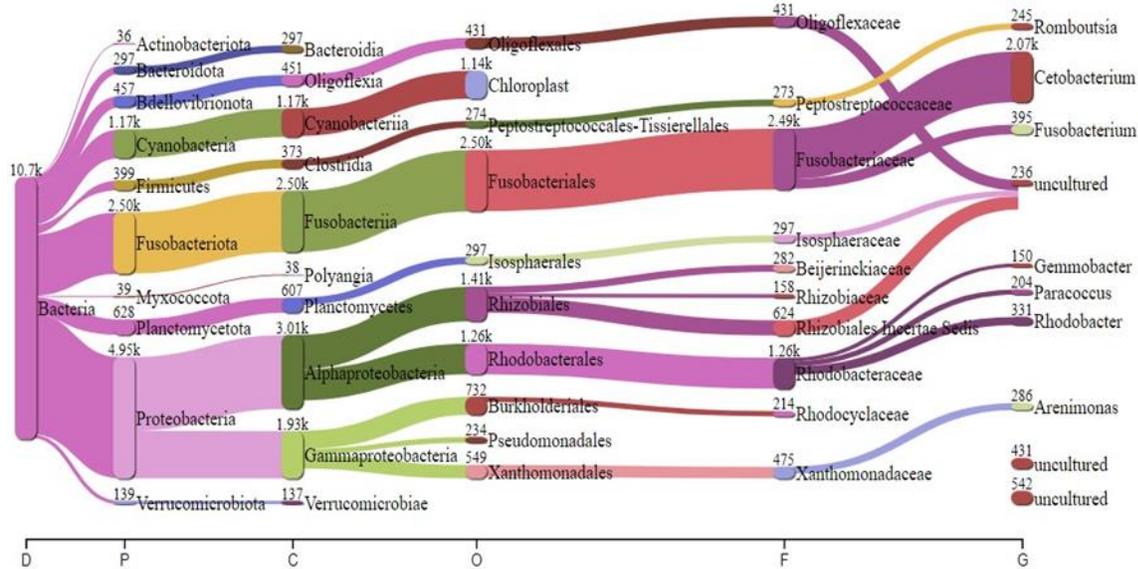
Los resultados obtenidos mediante los diagramas Sankey generados a partir de Kraken 2 brindaron una herramienta invaluable para la interpretación y visualización de los datos. Estos esquemas permitieron representar de manera gráfica y comprensible la información sobre la composición taxonómica de la microbiota intestinal. En los diagramas Sankey, el ancho del flujo de las conexiones entre nodos fue proporcional al número de lecturas asignadas a cada categoría taxonómica. De esta manera, se pudo apreciar visualmente la abundancia relativa de cada grupo taxonómico identificado en las muestras analizadas.

Además, cada nodo en el diagrama Sankey representó un nivel taxonómico específico, este código de rango proporcionó una representación visual rápida de la jerarquía taxonómica de las especies identificadas. Por ejemplo, se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas. Los números sobre cada nodo indicaron el número de coincidencias o similitudes encontradas entre las secuencias, lo que brindó información adicional sobre la abundancia y diversidad de las especies identificadas en cada nivel taxonómico. Para facilitar la interpretación de los diagramas Sankey, se utilizó un código de colores y rango en la parte inferior del diagrama. Las Figura 3-3 a Figura 3-11 indican estos hallazgos.

▪ Secuencias del intestino anterior

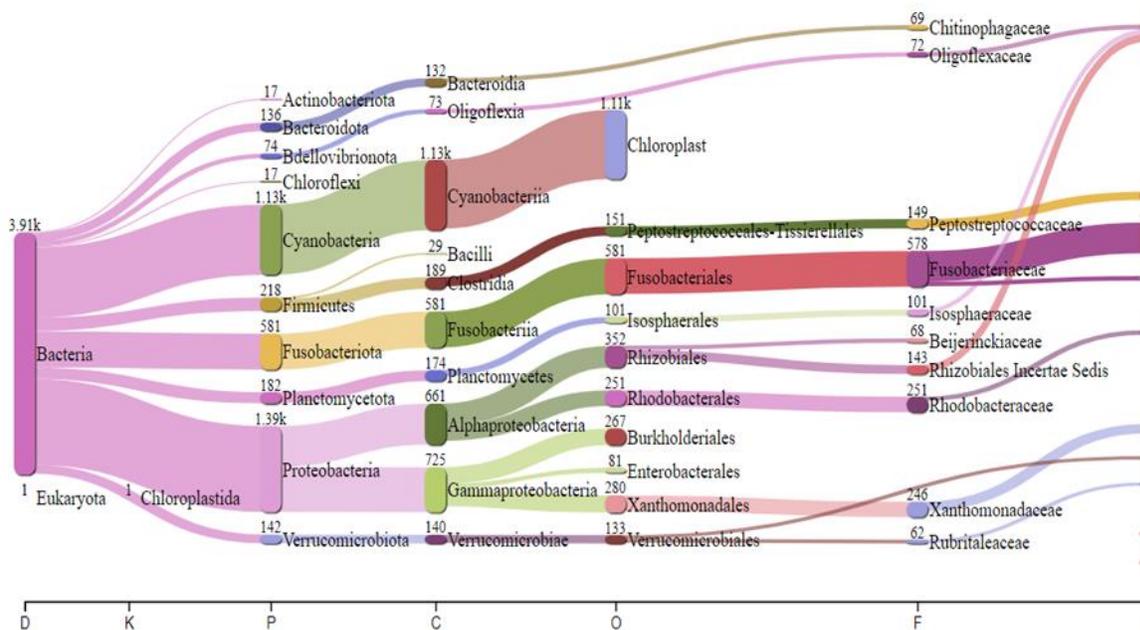
Los diagramas de las Figura 3-3, Figura 3-4 y Figura 3-5, brindaron una representación visual detallada de la diversidad y la abundancia relativa de los phylum presentes en el intestino anterior de los ejemplares de *P. Cochliodon*. Se identificaron los 10 phylum más representativos, que incluyeron Verrucomicrobiota, Proteobacteria, Planctomycetota, Myxococcota, Fusobacteriota, Firmicutes, Cyanobacteria, Bdellovibrionota, Bacteroidota y Actinobacteriota. Se observó que el flujo y el ancho de las conexiones fueron mayores para el phylum Proteobacteria, con una abundancia relativa del 41.51%. En segundo lugar, se encontró Cyanobacteria, con un 24.33%, seguido por Fusobacteriota, con un 16.53%. Por otro lado, los dos phylum con menor abundancia relativa fueron Bdellovibrionota, con un 2.32%, y Planctomycetota, con un 4.16%. Además, se logró determinar la presencia de los géneros: *Arenimonas sp*, *Rhodobacter sp*, *Paracoccus sp* y *Gemmobacter sp*, pertenecientes al phylum Proteobacteria; los géneros *Cetobacterium* y *Fusobacterium* del phylum Fusobacteriota; estos patrones reflejaron el número de similitudes encontradas entre las secuencias analizadas, brindando información de cada grupo taxonómico en el intestino anterior de los ejemplares de *P. cochliodon*.

Figura 3-3: Diagrama de flujo de las secuencias del BC02 del intestino anterior de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas



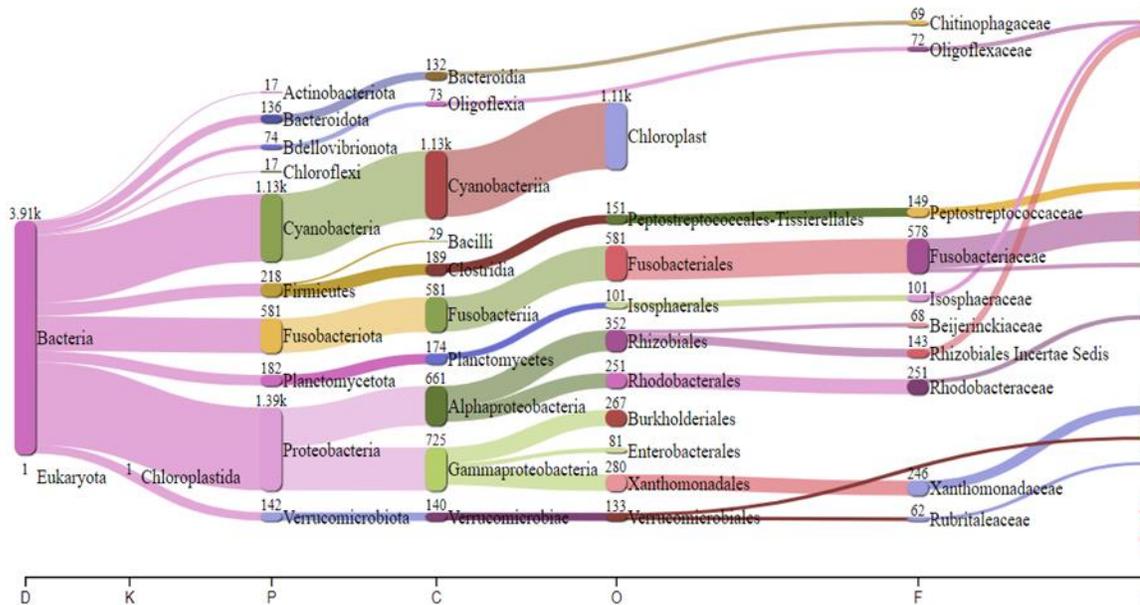
Fuente: Elaboración propia

Figura 3-4: Diagrama de flujo de las secuencias del BC03 del intestino anterior de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-5: Diagrama de flujo de las secuencias del BC04 del intestino anterior de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas

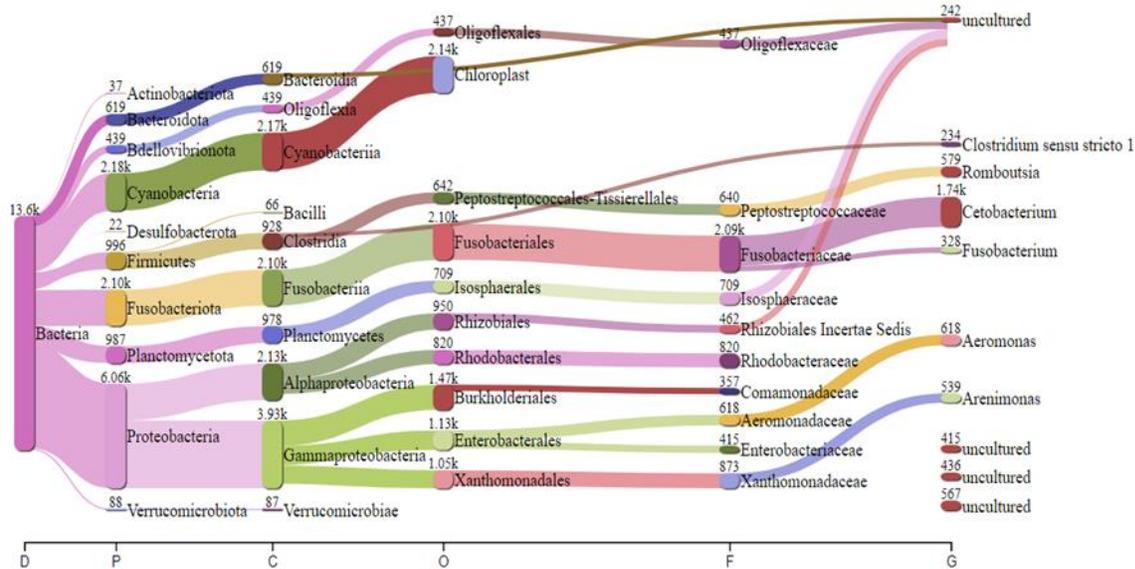


Fuente: Elaboración propia

▪ **Secuencias el intestino medio.**

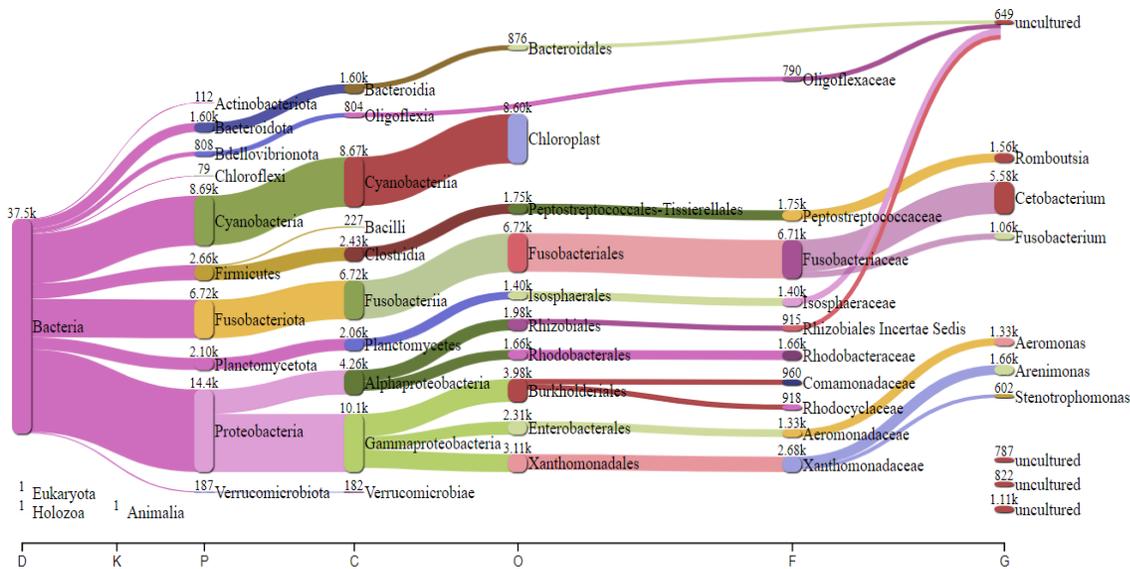
Los diagramas de las Figura 3-6, Figura 3-7 y Figura 3-8 proporcionaron una representación visual detallada de la diversidad y la abundancia relativa de los phylum presentes en el intestino medio de los ejemplares de *Panaque cochliodon*. Se identificaron los 10 phylum más representativos, entre los que se encontraron Verrucomicrobiota, Proteobacteria, Planctomycetota, Fusobacteriota, Firmicutes, Desulfobacterota, Cyanobacteria, Bdellovibrionota, Bacteroidota y Actinobacteriota. Se observó que el flujo y el ancho de las conexiones fueron mayores para el phylum Proteobacteria, lo que indicó una mayor abundancia relativa del 44.60%, los géneros representativos de este phylum fueron: *Arenimonas sp*, *Aeromonas sp*, *Rhodobacter sp* y *Stenotrophomonas sp*. En segundo lugar, se encontró Fusobacteriota, con un 20.04%; seguido por Cyanobacteria, con un 17.014%, Por otro lado, los dos phylum con menor abundancia relativa fueron Bdellovibrionota, con un 1.03%, y Bacteroidota, con un 4.56%. Dentro del phylum Fusobacteriota, se presentaron los géneros *Cetobacterium* y *Fusobacterium*. Dentro del phylum Firmicutes, se destacaron los géneros bacterianos *Clostridium sensu strito 1* y *Rombustia*

Figura 3-6: Diagrama de flujo de las secuencias del BC05 del intestino Medio de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas



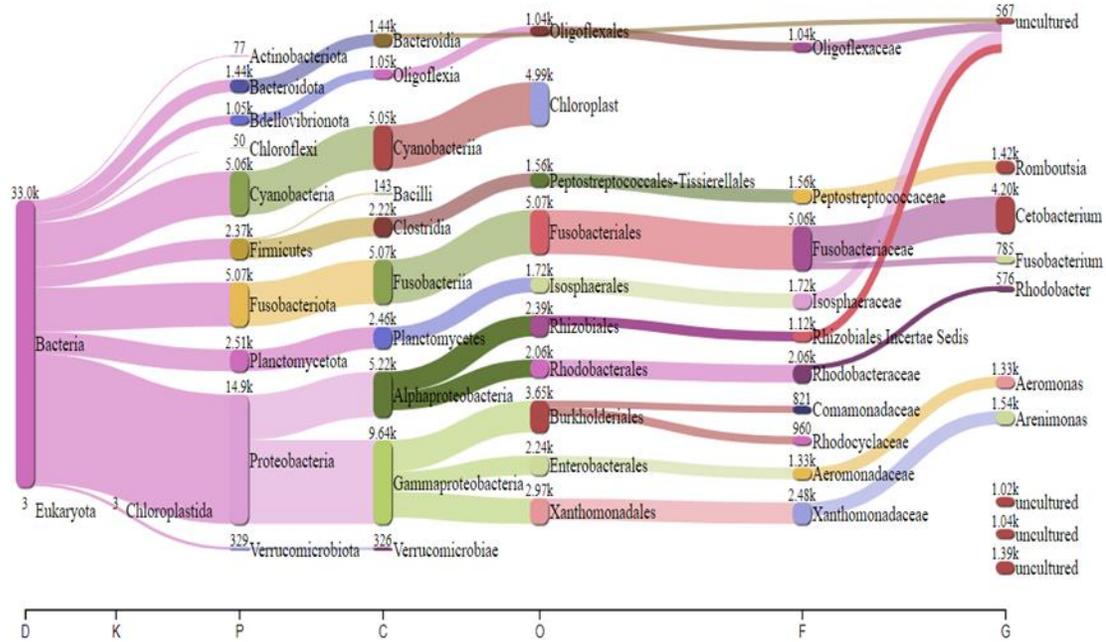
Fuente: Elaboración propia

Figura 3-7: Diagrama de flujo de las secuencias del BC06 del intestino Medio de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-8: Diagrama de flujo de las secuencias del BC07 del intestino Medio de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas

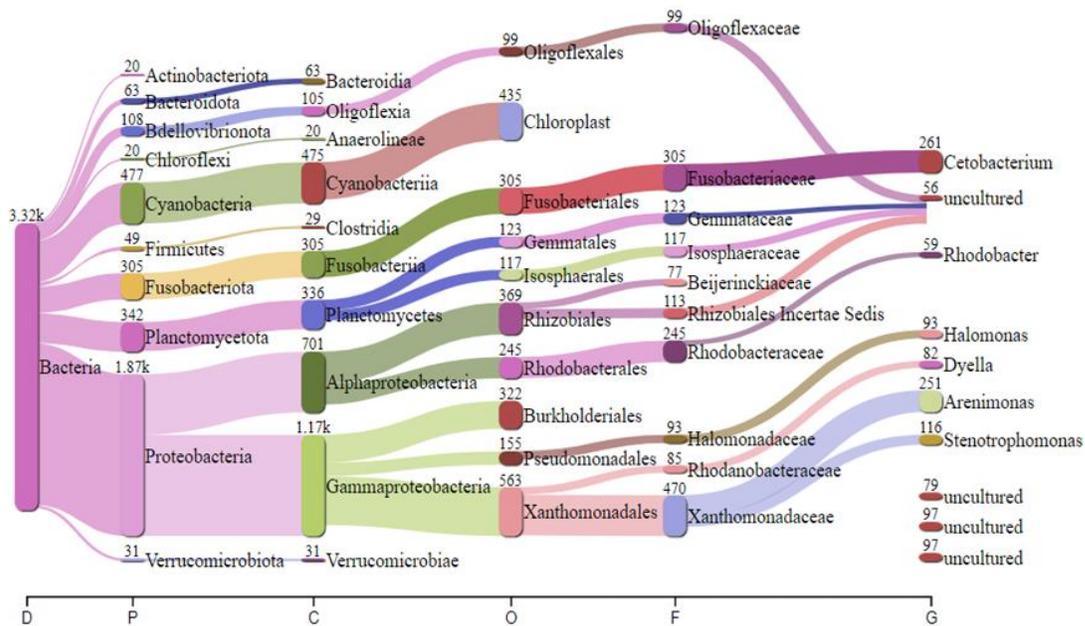


Fuente: Elaboración propia

▪ Secuencias del intestino posterior

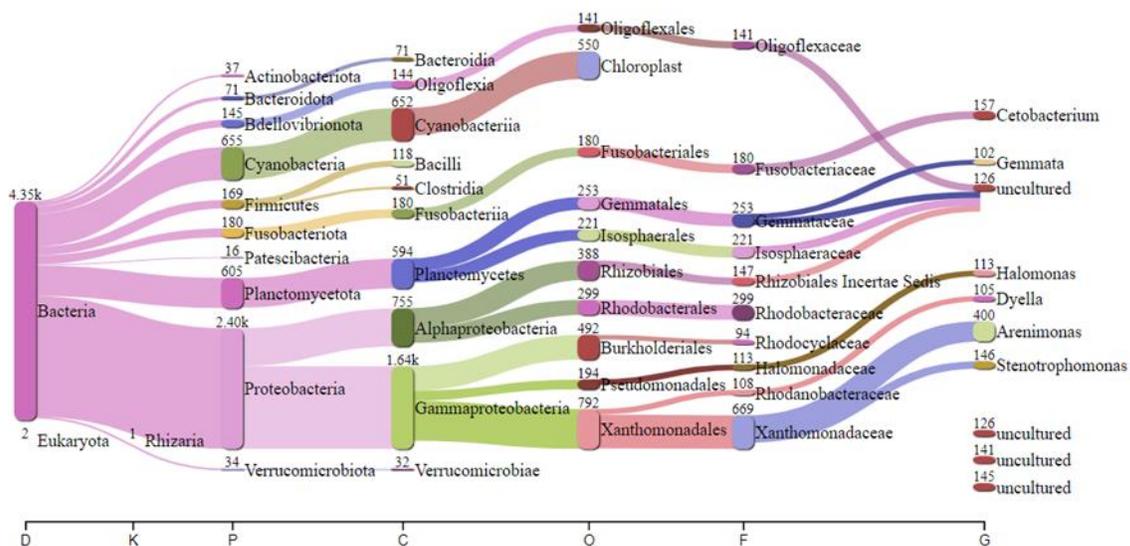
Los diagramas de las Figura 3-9, Figura 3-10, y Figura 3-11 entregaron una representación visual detallada de la diversidad y la abundancia relativa de los phylum presentes en el intestino posterior de los ejemplares de *Panaque cochliodon*. Se identificaron los 10 phylum más representativos, entre los que se encontraban Verrucomicrobiota, Proteobacteria, Planctomycetota, Fusobacteriota, Firmicutes, Cyanobacteria, Chloroflexi, Bdellovibrionota, Bacteroidota y Actinobacteriota. Se observó que el flujo y el ancho de las conexiones fueron mayores para el phylum Proteobacteria, con la mayor abundancia relativa de 56.13%. En segundo lugar, se encontró Cyanobacteria con 12,79%. Seguido por Planctomycetota con 16,31%. Por otro lado, los dos phylum con menor abundancia relativa fueron Bacteroidota 1,90% y Firmicutes, con un 1.48%. de este grupo taxonómico en el intestino posterior. Las familias Isosphaeraceae y Gemmataceae se destacaron dentro del phylum Planctomycetota, Además, el phylum Proteobacteria también presentó un flujo y un ancho identificando géneros como: *Stenotrophomonas sp*, *Arenimonas sp*, *Dyella sp* y *Halomonas sp*.

Figura 3-9: Diagrama de flujo de las secuencias del BC08 del intestino posterior de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas



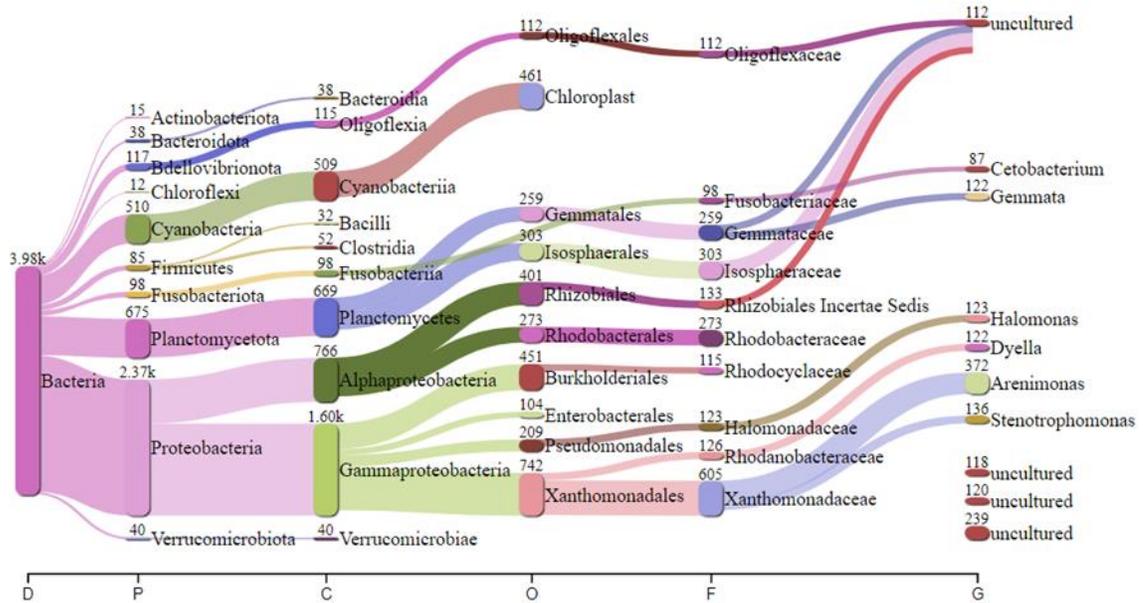
Fuente: Elaboración propia

Figura 3-10: Diagrama de flujo de las secuencias del BC09 del intestino posterior de *Panaque cochliodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas



Fuente: Elaboración propia

Figura 3-11: Diagrama de flujo de las secuencias del BC010 del intestino posterior de *Panaque cochlodon*. Se utilizaron letras para indicar el dominio (D), filo (P), clase (C), orden (O), familia (F) y género (G) de las especies identificadas

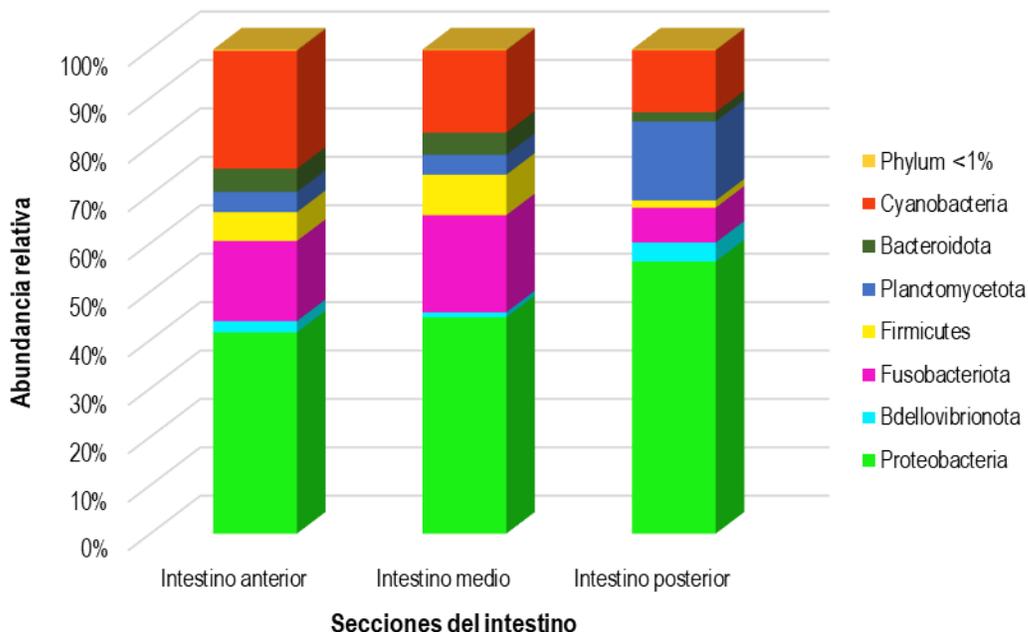


Fuente: Elaboración propia

De manera general, se identificaron 8 phylum en las tres secciones del tracto intestinal, (anterior, media y posterior); de los cuales, 7 phylum representaron el 99,81% de las todas comunidades bacterianas asociadas al intestino de *P. cochlodon*. En la Figura 3-12, se indica la abundancia relativa (%) de los phylum representativos. Se observa claramente las diferencias, por ejemplo, Proteobacteria es el phylum dominante, pero se presentó en mayor proporción en el intestino posterior¹ (IP) con el 56,13%, seguido del intestino medio (IM) con el 43,5%, por último, el menor valor porcentual de este phylum fue en el intestino anterior (IA), con un 41,51%, siendo un 14,62% menor que en el IP. A su vez, el phylum Cyanobacteria fue predominante en el IA con 24,33%, seguido por el IM con 17,014%. Fusobacteria, fue más dominante en el IM con el 20,04%, seguido por el IA con el 16,53%. Por último, Planctomycetota presentó dominancia en el IP con 16,31%, seguido del IA con 4,16% y el IM con 4,1%.

¹Abreviaturas: IA (Intestino anterior), IM (Intestino medio), IP (intestino posterior)

Figura 3-12: Composición microbiota intestinal que representa las abundancias relativas de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon*.



Fuente: Elaboración propia

▪ Mapa de calor para abundancia relativa.

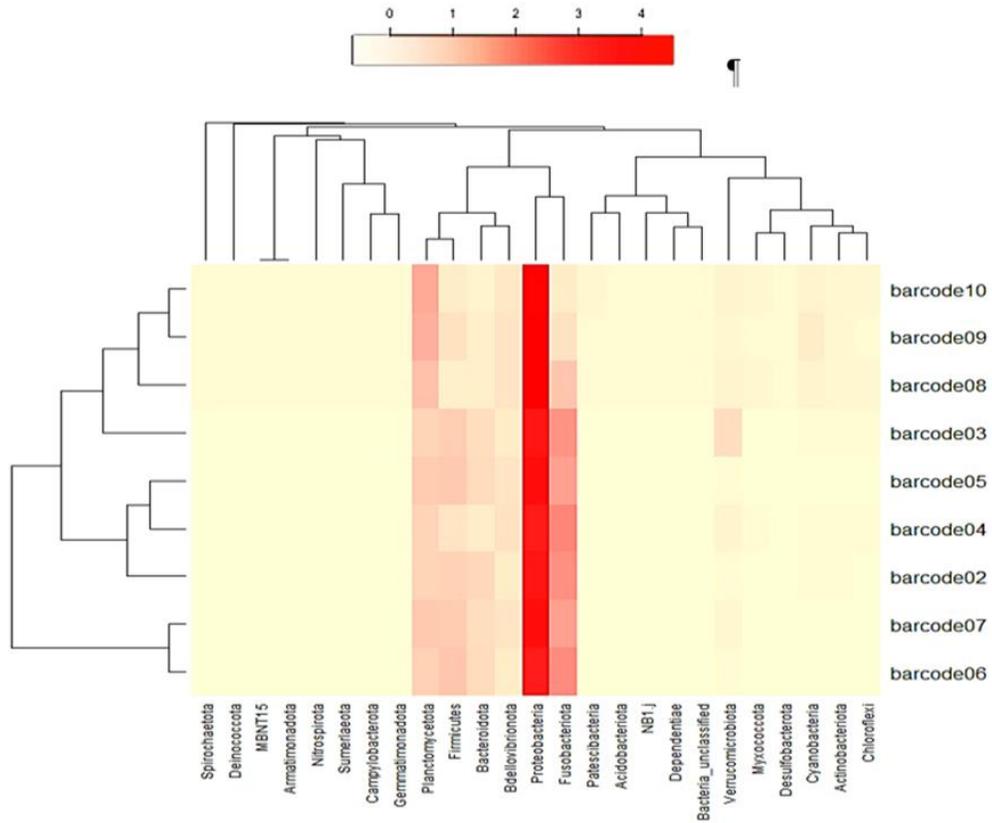
Se generó un mapa de calor detallado (Figura 3-13) que permitió visualizar las abundancias relativas de 25 filós en todas las muestras intestinales de *P. Cochliodon*. La agrupación vertical en dicho mapa se basó en la similitud de los barcodes utilizados para identificar y asignar las muestras correspondientes.

Por otro lado, la agrupación horizontal se realizó en función de la similitud de abundancia de los phylum en la microbiota intestinal total. Los colores utilizados en el mapa de calor representan el porcentaje de abundancia relativa de cada phylum, variando desde 0% hasta un máximo del 40%.

La presencia de un tono rojo intenso indicó que el phylum Proteobacteria tuvo una alta abundancia relativa del 40% en todas las muestras intestinales analizadas. El phylum

Fusobacteria tuvo una abundancia relativa del 20%, mientras que el phylum Plantomycetota tuvo una abundancia relativa del 10%.

Figura 3-13: Mapa de calor que represente las abundancias relativas de la microbiota intestinal de *Panaque cochliodon*. Cada barcode corresponde a un pool específico compuesto por las muestras de intestino.



Fuente: Elaboración propia

3.3 Discusión

Estudios realizados por (McDonald et al., 2019) reportaron varios phylum asociados a la microbiota del *Panaque nigrolineatus* definidos como Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Verrucomicrobia. Así mismo en 2018 y 2019, investigadores como (Puello-Caballero et al., 2018) y (Castañeda-Monsalve et al., 2019) encontraron en peces los mismos phylum previamente citados, además de Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Clostridia y Verrucomicrobia.

En estos phylum existen microorganismos con diferentes afinidades a condiciones oxigénicas y anoxigénicas, los hallazgos encontrados en esta investigación muestran que van desde aerobios y anaerobios facultativos ubicados en el intestino anterior y medio, y hacia el posterior, es posible que coexistan poblaciones de microorganismos anaerobios facultativos y estrictos. Estos resultados se soportan con los encontrados por (Puello-Caballero et al., 2018), quienes afirmaron que las principales bacterias colonizadoras del tracto gastrointestinal de los peces son anaerobias obligadas, aerobias y anaerobias facultativas, que presentan una concentración aproximada de 10^7 a 10^{11} bacterias/g de contenido intestinal

Dentro del phylum Firmicutes están los *Bacillus sp*, genero encontrado en este trabajo con una relevante importancia tecnológica en virtud de su capacidad metabólica y enzimática. En esta última se incluyen funciones tan importantes como la actividad amilasa, proteasa y xilanasas entre otras, que generan efectos favorables en la salud del animal. Autores como (Tiwari et al., 2022), han sugerido que la suplementación con *Bacillus sp* pueden mejorar la dieta de los peces mejorando la tasa de crecimiento, la conversión alimenticia y la eficiencia de la utilización de nutrientes, precisamente por su habilidad para producir enzimas digestivas, que promueven la degradación de los componentes de la dieta y mejoran la absorción en el intestino, resultados similares fueron también reportados por (Rabbee et al., 2019) y (Domínguez-Arrizabalaga, M Villanueva et al., 2020).

Estudios realizados por (Prasath et al., 2021) sostienen que el *Bacillus velezensis*, especie caracterizada en este trabajo, es un agente muy importante de control biológico, altamente efectivo en acuicultura, posee la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos y,

estimular el sistema inmunológico de peces y camarones. Así mismo, otras especies como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus thuringiensis*, también caracterizadas en esta investigación, han demostrado tener ciertas habilidades tecnológicas, por ejemplo (Manuel et al., 2019) y Hlordzi et al., (2020) mencionan que estos microorganismos tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos, con posible aplicación en acuicultura para el reemplazo de uso de antibióticos. .

En el phylum Proteobacteria, están los géneros de bacterias Gram negativas, estos microorganismos probablemente por su capacidad fermentativa, sean de gran utilidad para la generación de metabolitos, producción de enzimas hidrolíticas, y degradación de polisacáridos complejos, que requiere el *P.cochliodon* para su supervivencia, estudios realizados por (O'Sullivan et al., 2020) ratifican la función metabólica de estos microorganismos y su contribución a la mejora integral de la barrera intestinal (Li et al., 2020).

En el análisis de la microbiota del intestinal de *P.cochliodon*, en la presente investigación, el phylum Proteobacteria mostró la mayor abundancia, representando el 41,51% en el intestino anterior, seguido del 44,6% en el intestino medio y por ultimo 56,13% en el intestino posterior, mostrando un incremento al final del tracto intestinal, probablemente el factor determinante para el aumento de esta población, sea la condición anoxigénica que existe en este nicho intestinal.

Otro hallazgo relevante, en esta investigación es la presencia de Cyanobacterias, las cuales se observan que van disminuyendo a medida que va apareciendo una condición anoxigénica, en el intestino. En el intestino anterior, estos microorganismos presentan una abundancia del 24,33%, seguido del 17,14% en el intestino medio y por último 12,79% en el intestino posterior. Probablemente las Cyanobacterias que residen en el intestino van adaptándose a condiciones sin oxígeno mediante la fermentación, que les permite obtener energía y sobrevivir en un ambiente anaeróbico tal cual como los describen en estudios realizados por (McCauley et al., 2020, Medela et al., 2021 y A. Wang et al., 2017).

Las Cyanobacterias, son algas unicelulares y realizan fotosíntesis, producen oxígeno, fijan Nitrógeno y contribuyen la calidad del agua en su entorno acuático (Nguyen Phuc Cam Tu et, 2022). Las cianobacterias constituyen una fuente excelente de aminoácidos, vitaminas, enzimas y ácidos grasos poliinsaturados, por lo que son utilizadas como suplemento

dietario, pueden servir como una fuente de alimento natural para los peces por sus nutrientes esenciales como proteínas unicelulares que son necesarios para el crecimiento y desarrollo (Nguyen Phuc Cam Tu et, 2022). La Cyanobacterias producen metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas que impactan en otras comunidades microbianas (Abdelgayed Younes et, 2023), comportamiento que debería permanecer en el intestino, promoviendo la integridad intestinal del *P.cochliodon*.

Es probable que la fuente de Nitrógeno indispensable en todos los procesos derivados de asimilación de proteína y demás, la constituyan las Cyanobacterias, soportando en gran medida las demandas proteicas en este pez en vista del déficit nutricional que tiene el *P.cochliodon* por su hábito xilívoro.

En un estudio realizado en Japón en el presente año, se determinó por análisis metagenómico del microbioma intestinal de especies de tilapia, el phylum Cyanobacteria con una abundancia del 12%, el alto porcentaje de este phylum en el intestino de tilapias lo correlacionaron por los altos niveles de nutrientes disueltos en el agua que mejoraron el crecimiento de las Cyanobacterias, (Younes et al., 2023), probablemente los procesos biológicos en el *P.cochliodon* también se deba a la abundancia relativa de esta especie en su intestino, la cual soporta parte de sus requerimientos nutricionales, máxime que los porcentajes de Cyanobacterias hallados en esta investigación fueron mas altos que los publicados en el trabajo de (Younes et al., 2023).

En el estudio del microbioma intestinal del *Panaque nigrolineatus* los ejemplares presentaron una proporción mayor de Planctomycetes (35%). Cabe destacar que se ha identificado la presencia de Planctomycetes en diversos entornos, incluyendo los tractos gastro intestinales de peces y termitas (Van Kessel et al., 2011; C. Wang et al., 2013; Abdul Rahman et al., 2015; Mcdonald et al., 2019); comparando estos hallazgos con este estudio, *P. cochliodon* presentó una proporción de Planctomycetes, de 16,31% en el intestino posterior.

Para el pylum Verrucomicrobia, en el presente estudio se identificaron los géneros *Akkermansia sp* y *Luteolibacter sp*. En los estudios realizados por (Mcdonald et al., 2019) en *Panaque nigrolineatus*, se identificaron los géneros *Prostheco bacter sp* y

Chthoniobacter sp dentro del phylum Verrucomicrobia, los cuales a menudo están asociados a plantas y existen como endófitos o miembros de la comunidad rizosférica.

Es posible que esas diferencias en estos grupos de microorganismos encontrados, se deban al lugar de captura el *P.nigrolineatus* del Rio Amazonas y el *P. cochliodon* del Rio Magdalena. Una probable explicación para estos hallazgos es que las condiciones cambian por factores abióticos, tales como la estación del año, la temperatura, las dietas y el entorno en el que se encuentre (Medela et al., 2021), (A. Wang et al., 2017).

Por otro lado, autores como Liu et al., (2016) y Bledsoe et al., (2016) destacan que el intestino medio presenta una mayor proporción de la longitud total del intestino, donde el área de absorción para digestión química y la absorción de nutrientes como proteínas, péptidos, aminoácidos, azúcares, lípidos, y vitaminas es mayor (Lall & Tibbetts, 2009), además, investigaciones como las de (Marden et al., 2017) revelan que el intestino medio contiene una diversidad de phylum bacterianos con una distribución relativa similar en todos ellos, contribuyendo al mantenimiento de un equilibrio microbiano saludable en el intestino. Esta similitud en la composición bacteriana puede explicar los resultados del presente estudio, donde el intestino medio de los tres ejemplares analizados mostró una mayor abundancia relativa de todos los phylum bacterianos en comparación con los segmentos anterior y posterior del intestino, lo que sugiere una posible especialización en esta región para el mantenimiento de la salud intestinal en esta especie.

El estudio actual reveló notables diferencias en el flujo y el tamaño de las conexiones en las secciones del intestino medio de los tres especímenes, siendo notablemente más dominantes en los phylum Proteobacteria y en Planctomycetota. Estos phylum mostraron una mayor abundancia relativa en comparación con las microbiota intestinal anterior y media de los ejemplares, respaldando hallazgos similares de autores como (Liu et al., 2016) que coinciden con la investigación de (McCauley et al., 2020), quienes destacan la existencia de interacciones simbióticas capaces de influir en otras bacterias presentes en la microbiota intestinal. Estas interacciones abarcan desde la competencia por nutrientes hasta la colaboración en la descomposición final de sustratos, como indica el autor Vásquez-Torres, (2004), quien resalta que el intestino posterior, abarcando el recto, está principalmente asociado con la absorción de iones y desempeña un papel esencial en la regulación de la homeostasis hídrica, la absorción de metabolitos y la eliminación eficiente de desechos, particularmente relevante en peces herbívoros y detritívoros. Esta función

crucial en la fisiología intestinal parece estar estrechamente vinculada a la composición y dinámica de la microbiota intestinal, tal como mencionan (McCauley et al., 2020). En el contexto específico de los comedores de madera y su dieta particular, los análisis del microbioma ilustran la relación entre la filogenia y la dieta, subrayando la prevalencia de los filos Proteobacteria, Firmicutes y Planctomycetes. Reforzando estos postulados, el estudio de (Bledsoe et al., 2016) revela una sorprendente adaptación en el intestino anterior de peces herbívoros y detritívoros, enfocada en la digestión de lignocelulosa para obtener sus nutrientes principales. Investigaciones previas, como las de (Nelson et al., 1999), han indicado que estas adaptaciones frecuentemente implican simbiosis con microorganismos, como las Proteobacterias, conocidas por su capacidad para descomponer compuestos complejos como la celulosa y la lignina presentes en la dieta de peces herbívoros, facilitando así la digestión de materiales vegetales de difícil asimilación.

Para terminar, y dar la relevancia que tienen la bioprospección de cepas nativas, autores como Das & Kumar, (2015) sostienen que aislar microorganismos nativos de especies endémicas, constituyen un hallazgo importante por su uso potencial en la agricultura sostenible y agroindustria. En la Tabla 3-3 se evidencia los posibles procesos tecnológicos en los cuales los microorganismos aislados de la microbiota intestinal de *P. cochliodon* podrían llegar a ser potencialmente utilizados en la bioindustria y en la producción animal

Tabla 3-3: Resumen de los microorganismos aislados en la caracterización de la microbiota intestinal de *P. cochliodon* y otros reportes

Código aislados	Afiliación filogenética y Números de acceso al NCBI	Aplicaciones en agroindustria y producción animal
OO4	<i>Bacillus nitratireducens</i> MCCC 1A00732	Se reporta por su capacidad para emplear nitratos como fuente de energía mediante el proceso de desnitrificación (Prasath et al., 2021). Para procedimientos de biorremediación, donde se utiliza para eliminar contaminantes nitrogenados del agua y del suelo (Prasath et al., 2021). Además, se ha observado que puede jugar un papel beneficioso en la estimulación del crecimiento de las plantas, posiblemente mediante la liberación de compuestos bioactivos y el aumento de la disponibilidad de nutrientes (Prasath et al., 2021).
O10	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC 14159	Se ha utilizado ampliamente en biorremediación para abordar la contaminación por petróleo, plaguicidas y otras sustancias químicas (Widnyana et al., 2018). Su destacada capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos es sumamente valiosa en la limpieza de ambientes contaminados y en la síntesis de productos químicos (Widnyana et al., 2018). Además, se ha investigado su potencial para la producción de biocombustibles y biofertilizantes
O32	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Es una especie ampliamente estudiada por su capacidad para suprimir el crecimiento de diversos patógenos microbianos (Rabbee et al., 2019), incluyendo bacterias, hongos y nematodos (Rabbee et al., 2019). Además, se ha investigado el efecto de <i>Bacillus velezensis</i> en el crecimiento y salud del camarón blanco del Pacífico. Los resultados de estos estudios revelaron que este probiótico favoreció el crecimiento, mejoró las respuestas inmunitarias y reguló la microbiota intestinal tanto en camarones <i>L. vannamei</i> como en tilapia y carpa.

Código aislados	Afiliación filogenética y Números de acceso al NCBI	Aplicaciones en agroindustria y producción animal
OO2	<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i> S04009	<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i> ha sido objeto de investigación debido a su papel en la fermentación de alimentos, especialmente en la carne madurada. Se ha descubierto que esta bacteria desempeña un papel crucial en el desarrollo del aroma y el sabor de estos alimentos fermentados. Además, algunas investigaciones han evaluado el potencial de <i>Staphylococcus pseudoxylosus</i> como probiótico (Prasath et al., 2021)
OO8	<i>Bacillus paramycooides</i> MCCC 1A04098	Presenta varias aplicaciones potenciales en la producción del biopolímero (Chung Han Chua et al., 2023). Además, se ha evaluado como probiótico para estimular el crecimiento de peces y como fuente de péptidos antimicrobianos. (Tiwari et al., 2022) Asimismo, se ha demostrado que esta bacteria tiene la capacidad de biodegradar plásticos (Tiwari et al., 2022)
O22	<i>Lactococcus cremoris</i> NBRC 100676	Presenta funciones probióticas significativas (Balaji Prasath et al., 2021). Debido a su relevancia en la producción de productos lácteos (Borges et al., 2021); esta bacteria se ha empleado en la industria biotecnológica para la producción de enzimas y metabolitos de gran interés (Balaji Prasath et al., 2021). Además, ha sido utilizada como organismo modelo en el estudio de la fermentación láctica y la genética microbiana. (Borges et al., 2021)
O14	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077	Las endotoxinas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> sirven como control biológico (Domínguez-Arrizabalaga, M Villanueva et al., 2020), son altamente específicas para ciertos grupos de insectos, como lepidópteros (orugas), dípteros (moscas y mosquitos) y coleópteros (escarabajos). Estas proteínas tienen la capacidad de afectar el sistema digestivo de los insectos, causando daño en las células intestinales y llevándolos a la muerte. La toxicidad de las endotoxinas varía según la cepa de Bt y el tipo de insecto objetivo (Domínguez-Arrizabalaga, M Villanueva et al., 2020)

Código aislados	Afilación filogenética y Números de acceso al NCBI	Aplicaciones en agroindustria y producción animal
O13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BCRC 11601	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> es una bacteria con múltiples aplicaciones industriales (Das & Kumar, 2015), produce una amplia gama de enzimas como amilasas, proteasas y lipasas (Das & Kumar, 2015), Además, esta bacteria tiene la capacidad de sintetizar compuestos antifúngicos y antibacterianos (Das & Kumar, 2015), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> tiene capacidad para promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de hormonas vegetales como las auxinas (Feria Zevallos, M. A., Castañeda et al., 2019). Estas hormonas estimulan el desarrollo de las raíces y favorecen la absorción de nutrientes, contribuyendo al bienestar general de las plantas (Feria Zevallos, M. A., Castañeda et al., 2019)

Conclusiones

Este estudio obtuvo el primer reporte del microbioma intestinal de *Panaque cochliodon*, lo cual podría ser beneficioso para mejorar las condiciones en cautiverio de la especie. El predominio de cyanobacterias en el tracto intestinal podría deberse a sus diferentes preferencias alimentarias para que se mantengan en gran abundancia por el déficit nutricional debido a su hábito xilívoro.

Se logró identificar bacterias de gran relevancia para la acuicultura, tales como *Bacillus velezensis* y *Bacillus paramycoides*, que son empleadas en la producción de peces y camarones. Asimismo, se destacan *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus nitratireducens*, *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas alcaligenes*, microorganismos de amplio uso en la agroindustria. Por último, *Lactococcus cremoris* y *Staphylococcus pseudoxylosum*, ambos reconocidos como probióticos en diversos estudios, amplían el espectro de aplicaciones beneficiosas de los resultados obtenidos en este trabajo.

La presencia predominante de Proteobacterias en el intestino anterior, tal como revelado en el presente trabajo y corroborado por investigaciones previas, respalda la idea de una simbiosis crucial con microorganismos. Este hallazgo subraya la importancia de las interacciones simbióticas en la adaptación de los peces herbívoros, xilívoros y detritívoros en dietas ricas en material vegetal, ilustrando la relevancia de las comunidades microbianas en la capacidad de aprovechar recursos alimenticios específicos en su entorno.

Esta investigación confirma mayor abundancia relativa en los diferentes phylum bacterianos presentes en el intestino medio, cuando comparados con los segmentos anterior y posterior del intestino de esta especie. Este resultado sugiere una especialización potencial en esta región para mantener la salud intestinal en esta especie. En conjunto, estos hallazgos respaldan la noción de que el intestino medio no solo desempeña un papel crucial en la absorción de nutrientes, sino que también alberga una comunidad microbiana diversa y equilibrada, crucial para el mantenimiento de la salud intestinal en estos peces.

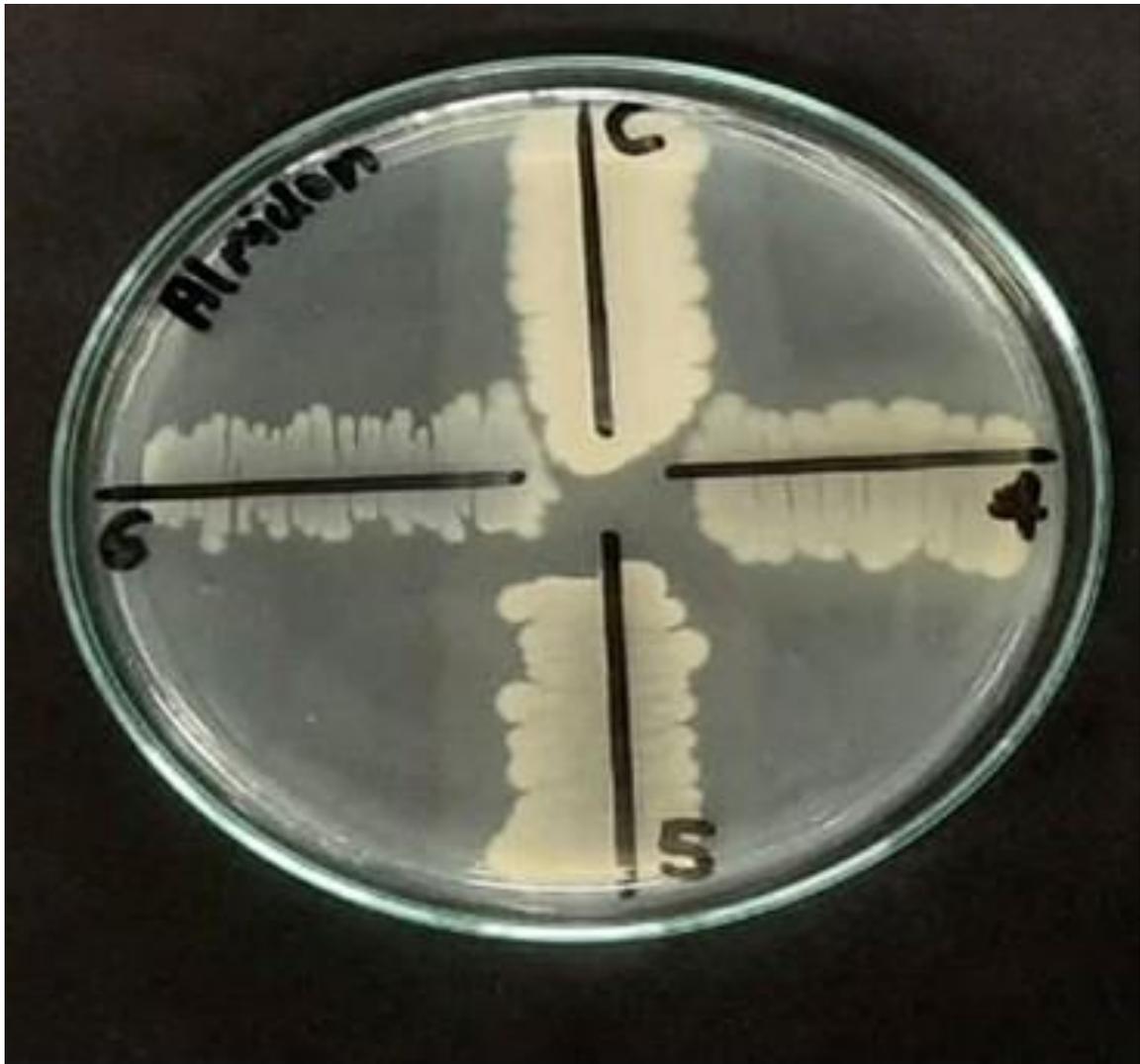
Se identificó en el intestino medio de los ejemplares la dominancia de los phylum Proteobacteria y Planctomycetota que sugiere probablemente interacciones simbióticas en la microbiota intestinal. Además, se destaca la relación entre la dieta y la composición de la microbiota, evidenciando la prevalencia de Proteobacteria, Firmicutes y Planctomycetes en comedores de madera, lo que ofrece una respuesta importante sobre la influencia dieta en la microbiota de estos peces.

El análisis de metagenómica mostro diferencias entre la microbiota del intestino anterior, medio y posterior en adultos de esta especie, lo que indica que los procesos de la microbiota en cada intestino es diferente debido a factores fisiológicos, nutricionales y ambientales que influyen en la composición y diversidad de las bacterias presentes.

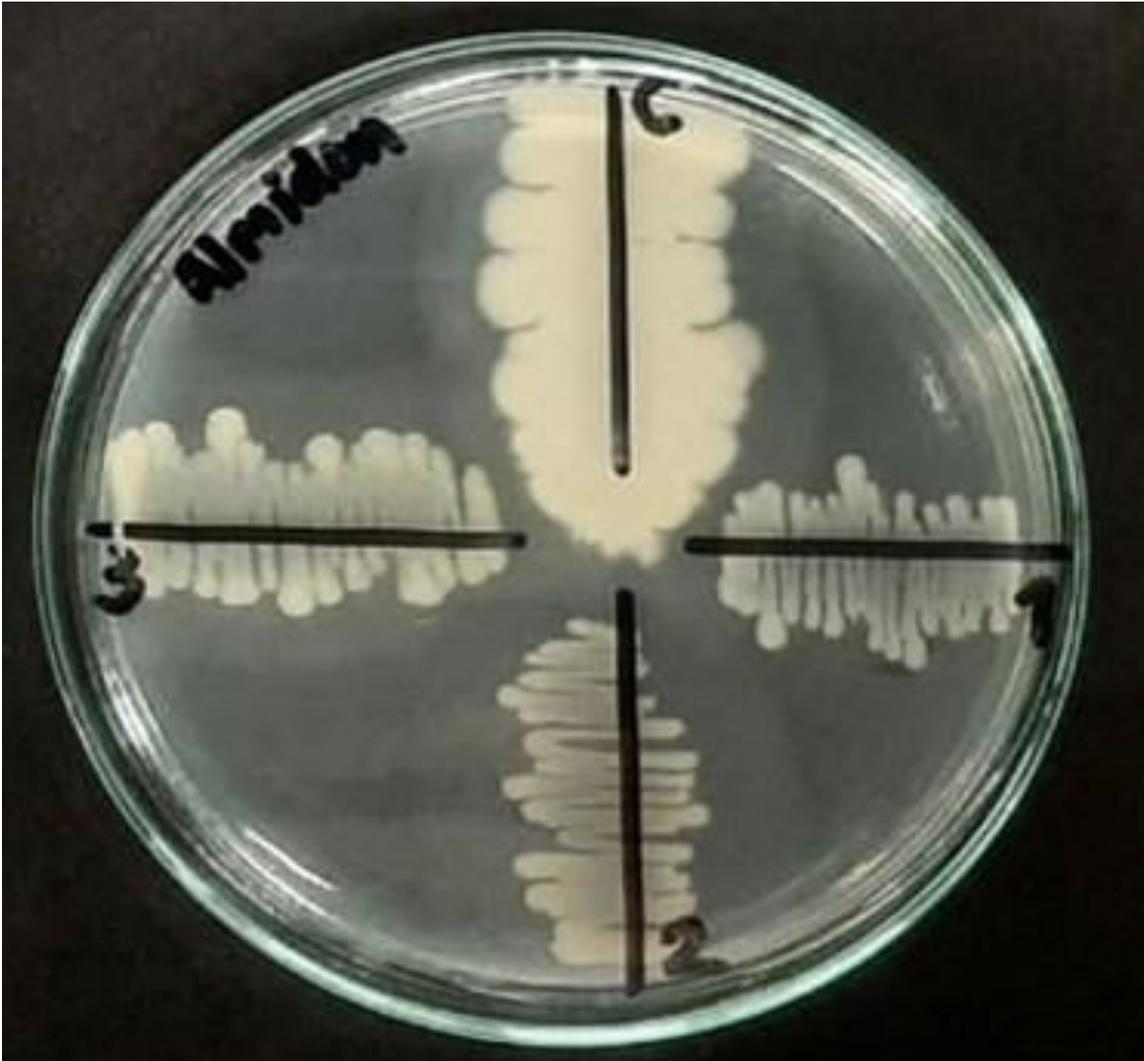
Anexo A: RESOLUCIÓN NÚMERO 2614 DE 28 DE DICIEMBRE DE 2020 “Por medio de la cual se modifica el subtítulo “Especies o recursos pesqueros a investigar” del Artículo Primero de la Resolución 2555 del 18 de diciembre de 2020 “Por medio de la cual se otorga permiso de investigación a la CORPORACIÓN UNIVERSITARIA LASALLISTA”

Anexo B: MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE y DESARROLLO SOSTENIBLE. Decreto 1376 "Por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial"

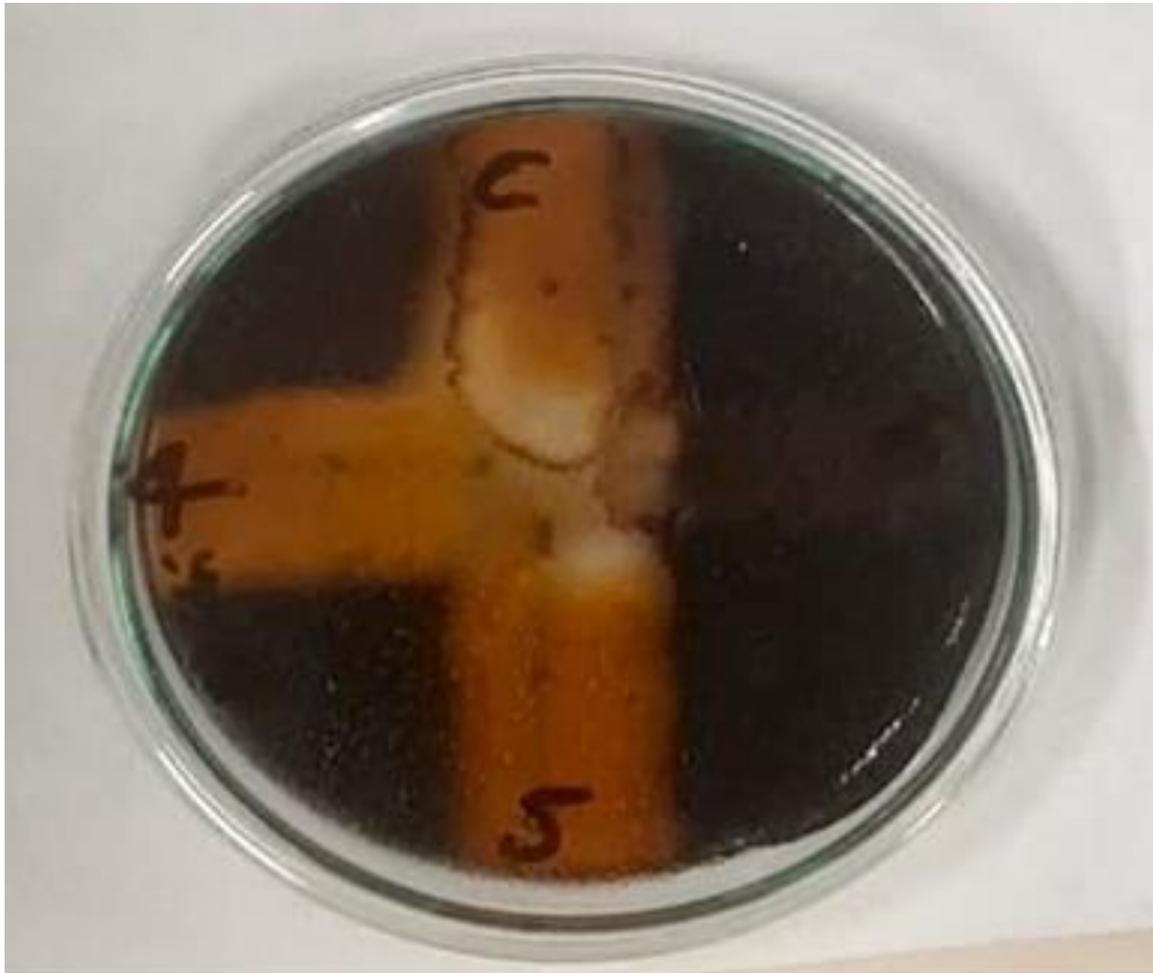
Anexo C: Fotografía del resultado de las pruebas enzimáticas de 6 tipos de colonias aisladas de la microbiota intestinal, evaluación en agar Almidón con un crecimiento después de 48 horas y revelación de agar almidón con el reactivo Lugol.



Fotografía de pruebas enzimáticas



Fotografía de pruebas enzimáticas



Fotografía de pruebas enzimáticas reveladas con lugol



Fotografía de pruebas enzimáticas reveladas con lugol



Fotografía de colonia de *Bacillus velezensis*

3.4 Bibliografía

- Abdul Rahman, N., Parks, D., Willner, D., Engelbrektson, A., Goffredi, S., Warnecke, F., & Hugenholtz, P. (2015). Un estudio molecular de los géneros de termitas de Australia y América del Norte indica que la herencia vertical es la fuerza principal que da forma a los microbiomas intestinales de las termitas. *Microbioma*, 3(1), 1–16. <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-015-0067-8>
- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Askarian, F., Zhou, Z., Olsen, R. E., Sperstad, S., & Ringø, E. (2012). Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*, 326–329, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.016>
- Austin, B. (2006). The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *TheScientificWorldJOURNAL*, 6, 325830. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.181>
- Bird, A. R., Conlon, M. A., Christophersen, C. T., & Topping, D. L. (2010). Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics. *Beneficial Microbes*, 1(4), 423–431. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0041>
- Bledsoe, J. W., Peterson, B. C., Swanson, K. S., & Small, B. C. (2016). Ontogenetic characterization of the intestinal microbiota of channel catfish through 16S rRNA gene sequencing reveals insights on temporal shifts and the influence of environmental microbes. *PLoS ONE*, 11(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166379>
- Borges, N., Keller-Costa, T., Sanches-Fernandes, G. M. M., Louvado, A., Gomes, N. C. M., & Costa, R. (2021). Bacteriome Structure, Function, and Probiotics in Fish Larviculture: The Good, the Bad, and the Gaps. *Annual Review of Animal Biosciences*, 9, 423–452. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-062920-113114>
- Carnevali, O., Maradonna, F., & Gioacchini, G. (2017). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, 472, 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.037>
- Castañeda-Monsalve, V. A., Junca, H., García-Bonilla, E., Montoya-Campuzano, O. I., & Moreno-Herrera, C. X. (2019). Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachypomus*). *Aquaculture*, 512, 734325. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734325>
- Chu, T.-W., Chen, C.-N., & Pan, C.-Y. (2020). Antimicrobial status of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed *Enterococcus avium* originally isolated from goldfish intestine. *Aquaculture Reports*, 17, 100397. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100397>

- Clements, K. D., Angert, E. R., Montgomery, W. L., & Choat, J. H. (2014). Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. *Molecular Ecology*, 23(8), 1891–1898. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.12699>
- Das, M. P., & Kumar, S. (2015). An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotech*, 5(1), 81–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13205-014-0205-1>
- David-Ruales, C. ., Betancur-Gonzales, E. ., & Cano-Gil, J. . (2021). Adaptación al cautiverio y estandarización de una técnica no invasiva (ecografía) para la determinación del género y la evaluación de la madurez gonadal de la especie Panaque cochliodon (Cucha de ojos azules) del río Magdalena. *Rev. Lasallista de Investigación*, 267.
- David-Ruales, Guerra, M. O., Cano, J. D., & Betancur, E. M. (2022). Clove Oil (Eugenol®) as an Anesthetic in the Species Panaque Cochliodon-Steindachner, 1879 (Blue-Eyed Pleco. *Revista Lasallista de Investigacion*, 19(1), 182–194. <https://doi.org/10.22507/rli.v19n1a11>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V, Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Deng, Z., Jiang, Y., Chen, K., Gao, F., & Liu, X. (2020). Petroleum Depletion Property and Microbial Community Shift After Bioremediation Using *Bacillus halotolerans* T-04 and *Bacillus cereus* 1-1. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00353>
- Di Maiuta, N., Schwarzentruher, P., Schenker, M., & Schoelkopf, J. (2013). Microbial population dynamics in the faeces of wood-eating loricariid catfishes. *Letters in Applied Microbiology*, 56(6), 401–407. <https://doi.org/10.1111/lam.12061>
- Domínguez-Arrizabalaga, M Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., & Caballero, P. (2020). Insecticidal activity of bacillus thuringiensis proteins against coleopteran pests. *Toxins*, 12(7). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins12070430>
- Fishelson, L., Montgomery, W. L., & Myrberg, A. (1985). A unique symbiosis in the gut of tropical herbivorous surgeonfish (Acanthuridae: Teleostei) from the Red Sea. *Science*, 229, 49–51.
- Gerking, S. D., Division, A., & Brace, H. (1994). *Feeding Ecology of fish* (A. S. UNIVERSITY (ed.)). Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- German, D. (2009). Inside the guts of wood-eating catfishes: can they digest wood? *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 179, 1011–1023. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:7512400>
- German, D., & Bittong, R. (2009). Digestive enzymes and gastrointestinal fermentation in wood-eating catfishes. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 179, 1025–1042. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0383-z>
- Givens, C., Ransom, B., Bano, N., & Hollibaugh, J. (2015). Comparison of the gut

- microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 518, 209–223. <https://doi.org/10.3354/meps11034>
- Gómez, G. D., & Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>
- Green, G. B. H., Williams, M. B., Chehade, S. B., Flowers, J. T., Morrow, C. D., Lawrence, A. L., Bej, A. K., & Watts, S. A. (2023). Body Metrics and the Gut Microbiome in Response to Macronutrient Limitation in the Zebrafish *Danio rerio*. *Current Developments in Nutrition*, 7(4), 100065. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2023.100065>
- Grosell, M., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (2010). The Multifunctional Gut of Fish. In *Fish Physiology* (1st ed., Vol. 30). Academic Press; 1er edición (5 Octubre 2010).
- Gutiérrez-Ramirez, L. A., David-Ruales, C. A., Montoya-Campuzano, O. I., & Betancur-Gonzalez, E. M. (2016). Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Salud Animal*, 38(2), 112–119. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199204540.003.0007>
- Hlordzi, V., Kuebutornye, F., Afriyie, G., Abarike, E., Lu, Y., & Chi, S. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18(100503). <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503>
- Huertas-Caro, C., Urbano-Cáceres, E., & Torres-Caycedo, M. (2019). CIENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS Y SALUBRISTAS ARTÍCULO DE REVISIÓN Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 513–528. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2352>
- Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishimura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in Fresh Waters of Japan. *Current Microbiology*, 40(4), 217–220. <https://doi.org/10.1007/s002849910044>
- Ingerslev, H.-C., von Gersdorff Jørgensen, L., Lenz Strube, M., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M., & Madsen, L. (2014). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*, 424–425, 24–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>
- Izvekova, G. I., Izvekov, E. I., & Plotnikov, A. O. (2007). Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *Biology Bulletin*, 34(6), 610–618. <https://doi.org/10.1134/S106235900706012X>
- Kamei, Y., Sakata, T., & Kakimoto, D. (1985). Microflora in the alimentary tract of tilapia: Characterization and distribution of anaerobic bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(2), 115–124. <https://doi.org/10.2323/jgam.31.115>
- Kamilya, D., & Devi, W. M. (2022). *Bacillus Probiotics and Bioremediation: An Aquaculture Perspective BT - Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting* (M. T. Islam, M. Rahman, & P. Pandey (eds.);

- pp. 335–347). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_15
- 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., & Bae, J.-W. (2021). Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*, *9*(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01113-x>
- Lall, S. P., & Tibbetts, S. M. (2009). Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, *12*(2), 361–372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.005>
- Li, T, Raza, S. H. A., Yang, B., Sun, Y., Wang, G., Sun, W., Qian, A., Wang, C., Kang, Y., & Shan, X. (2020). *Aeromonas veronii* infection in commercial freshwater fish: A potential threat to public health. *Animals*, *10*(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani10040608>
- Li, Tongtong, Long, M., Gatesoupe, F.-J., Zhang, Q., Li, A., & Gong, X. (2015). Comparative Analysis of the Intestinal Bacterial Communities in Different Species of Carp by Pyrosequencing. *Microbial Ecology*, *69*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0480-8>
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., & Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, *6*(1), 24340. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., & Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>
- Lujan, N. K., German, D. P., & Winemiller, K. O. (2011). Do wood-grazing fishes partition their niche?: Morphological and isotopic evidence for trophic segregation in Neotropical Loricariidae. *Functional Ecology*, *25*(6), 1327–1338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01883.x>
- Manuel, F., Arnaldo, C., Odalis, T., Deysy, C., Mario, C., & Virna, C. (2019). Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *30*(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.15407>
- March, P., & Tillett, D. (1999). *BioEdit Nucleicos*. https://www.nucleics.com/about_nucleics/about_nucleics.html
- Marden, C. L., McDonald, R., Schreier, H. J., & Watts, J. E. M. (2017). Investigation into the fungal diversity within different regions of the gastrointestinal tract of *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. *AIMS Microbiology*, *3*(4), 749–761. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.4.749>
- McCauley, M., German, D. P., Lujan, N. K., & Jackson, C. R. (2020). Gut microbiomes of sympatric Amazonian wood-eating catfishes (Loricariidae) reflect host identity and little role in wood digestion. *Ecology and Evolution*, *10*(14), 7117–7128. <https://doi.org/10.1002/ece3.6413>

- McDonald, R. C., Em, J., & Schreier, H. J. (2019). *Efecto de la dieta sobre el microbioma entérico del bagre carnívoro Panaque nigrolineatus*. 1–15.
- McDonald, R., Schreier, H. J., & Watts, J. E. M. (2012). Phylogenetic Analysis of Microbial Communities in Different Regions of the Gastrointestinal Tract in Panaque nigrolineatus, a Wood-Eating Fish. *PLoS ONE*, 7(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048018>
- McDonald, R., Zhang, F., Watts, J. E. M., & Schreier, H. J. (2015). Nitrogenase diversity and activity in the gastrointestinal tract of the wood-eating catfish Panaque nigrolineatus. *ISME Journal*, 9(12), 2712–2724.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.65>
- Medela, D., Directora, T., Piazzon, C., Upv, H. T., & Mart, S. (2021). *Recopilación bibliográfica y comparativa : la microbiota intestinal de dorada (Sparus aurata)*.
- Meidong, R., Nakao, M., Sakai, K., & Tongpim, S. (2021). Lactobacillus paraplantarum L34b-2 derived from fermented food improves the growth, disease resistance and innate immunity in Pangasius bocourti. *Aquaculture*, 531, 735878.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735878>
- Michl, S. C., Ratten, J.-M., Beyer, M., Hasler, M., LaRoche, J., & Schulz, C. (2017). The malleable gut microbiome of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Diet-dependent shifts of bacterial community structures. *PLOS ONE*, 12(5), e0177735.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177735>
- Dec 1376, 1 (2013).
- Mojica, J., Castellanos, C., Usma, J., & Álvarez-León, R. (2012). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. In *Researchgate.Net*.
- Motta, A. S., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2004). Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon Basin. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 35). scielo .
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., Henrissat, B., Knight, R., & Gordon, J. I. (2011). Diet Drives Convergence in Gut Microbiome Functions Across Mammalian Phylogeny and Within Humans. *Science*, 332(6032), 970–974. <https://doi.org/10.1126/science.1198719>
- Navarrete, P., Espejo, R. T., & Romero, J. (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, 57(3), 550–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9448-x>
- Nayak, S. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Nelson, J., Wubah, D., & Stewart, D. (1999). Wood-eating catfishes of the genus Panaque : gut microflora and cellulolytic enzyme activities. *Journal of Fish Biology*, 54(5), 1069–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00858.x>
- O'Sullivan, J. N., O'Connor, P. M., Rea, M. C., O'Sullivan, O., Walsh, C. J., Healy, B.,

- Mathur, H., Field, D., Hill, C., & Paul Ross, R. (2020). Nisin J, a novel natural nisin variant, is produced by *Staphylococcus capitis* sourced from the human skin microbiota. *Journal of Bacteriology*, *202*(3).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.00639-19>
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., & Iliopoulos, Ioannis. (2015). Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights*, *9*, BBI.S12462.
<https://doi.org/10.4137/BBI.S12462>
- Prasath, B. B., Wang, Y., Su, Y., Zheng, W., Lin, H., & Yang, H. (2021). Coagulant plus bacillus nitratireducens fermentation broth technique provides a rapid algicidal effect of toxic red tide dinoflagellate. *Journal of Marine Science and Engineering*, *9*(4).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jmse9040395>
- Puello-Caballero, P., Liseth, Inés Montoya-Campuzano, O., Alfonso Castañeda-Monsalve, V., & Mary Moreno-Murillo, L. (2018). Characterization of the microbiota present in the intestine of *Piaractus brachypomus* (Cachama blanca). *Revista de Salud Animal*, *40*(2), 2224–4700.
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, *24*(6).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rawls, J. F., Samuel, B. S., & Gordon, J. I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(13), 4596–4601.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>
- Ray, A., Roy, T., Mondal, S., & Ringø, E. (2010). Identification of gut-associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. *Aquaculture Research*, *41*(10), 1462–1469.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02437.x>
- Ray, A K, Ghosh, K., & Ringø, E. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, *18*(5), 465–492.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>
- Ray, Arun K., Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., & Sen, S. K. (2007). Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, *37*(1), 47–53.
<https://doi.org/10.3750/AIP2007.37.1.07>
- Rees, C. E. D., Green, L. H., Goldman, E., & Loessner, M. J. (2015). Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. In *Practical Handbook of Microbiology, Third Edition*. <https://doi.org/10.1201/b17871>
- Romero, J., & Navarrete, P. (2006). 16S rDNA-Based Analysis of Dominant Bacterial Populations Associated with Early Life Stages of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, *51*(4), 422–430. <http://www.jstor.org/stable/25153335>
- Saha, S., Roy, R. N., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2006). Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica*

- (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquaculture Research*, 37(4), 380–388. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01442.x>
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Sibbing, F. A. (1988). Specializations and limitations in the utilization of food resources by the carp, *Cyprinus carpio*: a study of oral food processing. *Environmental Biology of Fishes*, 22(3), 161–178. <https://doi.org/10.1007/BF00005379>
- Sullam, K., Essinger, S., Rosen, G., Kilham, S., & Russell, J. (2010). *Environmental and evolutionary factors that shape gut bacterial communities of fish: A meta-analysis*.
- Suyehiro, Y. (1942). A Study on the digestive system and feeding habits of fish. In *TA - TT - Japanese journal of zoology* [S.l.]. <https://doi.org/LK - https://worldcat.org/title/492797911>
- Talwar, C., Nagar, S., Lal, R., & Negi, R. K. (2018). Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 58(4), 397–414. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0760-y>
- Tan, H. Y., Chen, S.-W., & Hu, S.-Y. (2019). Improvements in the growth performance, immunity, disease resistance, and gut microbiota by the probiotic *Rummeliibacillus stabekisii* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 265–275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.027>
- Tiwari, S., Singh, R., Yadav, J., Gaur, R., Singh, A., Yadav, J. S., Pandey, P. K., Yadav, S. K., Prajapati, J., Helena, P., Dewangan, J., & Jamal, F. (2022). Three-Step Purification and Characterization of Organic Solvent-Tolerant and Alkali-Thermo-Tolerant Xylanase from *Bacillus paramycooides* T4 [MN370035]. *Catalysts*, 12 (7). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/catal12070749>
- Trust, T. J., & Sparrow, R. A. H. (1974). The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 20(9), 1219–1228. <https://doi.org/10.1139/m74-188>
- Türe, M., Cebeci, A., & Özcelep, T. (2022). The first outbreak of citrobacteriosis caused by *Citrobacter gillienii* in reared Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in Türkiye. *Veterinary Research Forum*, 13(3), 323–329. <https://doi.org/10.30466/vrf.2021.137808.3076>
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., De Schryver, P., & Bossier, P. (2013). Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture*, 5(s1), S1–S25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01082.x>
- Van Kessel, M. A. H. J., Dutilh, B. E., Neveling, K., Kwint, M. P., Veltman, J. A., Flik, G., Jetten, M. S. M., Klaren, P. H. M., & Op den Camp, H. J. M. (2011). Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.). *AMB Express*, 1(1), 41. <https://doi.org/10.1186/2191-0855->

1-41

- Vásquez-Torres, W. (2004). *Principios de Nutrición Aplicada al Cultivo de Peces* (1st ed.). Universidad de los Llanos.
- Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D. P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M. J., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Apetoh, L., Chachaty, E., Woerther, P.-L., Eberl, G., Bérard, M., Ecobichon, C., Clermont, D., ... Zitvogel, L. (2013). The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide. *Science*, *342*(6161), 971–976. <https://doi.org/10.1126/science.1240537>
- Wang, A. R., Ran, C., Ringø, E., & Zhou, Z. G. (2018). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, *10*(3), 626–640. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12191>
- Wang, A., Ran, C., Ring, E., & Zhou, Z. (2017). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Aquaculture*, *0*, 1–15.
- Wang, C., Xie, B., Han, L., & Xu, X. (2013). Study of anaerobic ammonium oxidation bacterial community in the aged refuse bioreactor with 16S rRNA gene library technique. *Bioresource Technology*, *145*, 65–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.170>
- Watts, J. E. M., McDonald, R., Daniel, R., & Schreier, H. J. (2013). Examination of a culturable microbial population from the gastrointestinal tract of the wood-eating loriciid catfish panaque nigrolineatus. *Diversity*, *5*(3), 641–656. <https://doi.org/10.3390/d5030641>
- Wróbel, M., Śliwakowski, W., Kowalczyk, P., Kramkowski, K., & Dobrzyński, J. (2023). Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 20, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>
- Wu, S., Wang, G., Angert, E. R., Wang, W., Li, W., & Zou, H. (2012). Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. *PLOS ONE*, *7*(2), e30440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030440>
- Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., & Liu, W.-T. (2014). Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *The ISME Journal*, *8*(3), 541–551. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.181>
- Yoshimizu, M., & Kimura, T. (1976). Study on the Intestinal Microflora of Salmonids. *Fish Pathology*, *10*(2), 243–259. <https://doi.org/10.3147/jstf.10.243>
- Younes, A., Saito, H., Tani, S., Ikeo, R., & Kawai, K. (2023). Metagenomic analysis of gut microbiome from tilapia species across several regions in Japan. *Aquaculture*, *576*(March), 739809. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739809>
- Zatán Valdiviezo, A. E., Castillo Chunga, D., Castañeda Vargas, A. E., Feria Zevallos, M. A., Toledo Valdiviezo, O. E., Aguilar Zavaleta, J. L., Cueva Távara, M. D., & Motte, E. (2020). Caracterización de la microbiota intestinal en robalo (*Centropomus* sp.) y aislamiento de bacterias probióticas potenciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *31*(3), e16036. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16036>

- Zhai, Q., Yu, L., Li, T., Zhu, J., Zhang, C., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2017). Effect of dietary probiotic supplementation on intestinal microbiota and physiological conditions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under waterborne cadmium exposure. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*(4), 501–513.
<https://doi.org/10.1007/s10482-016-0819-x>