



UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

**CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Seriola lalandi*
(Valenciennes, 1833) DE MEDIO SILVESTRE: COMPARACIÓN DE
MÉTODOS TRADICIONALES VERSUS MÉTODOS MOLECULARES DE
IDENTIFICACIÓN.**

Tesis presentada para optar al Grado de Magister en Ciencias de la Acuicultura

***Biólogo Acuicultor* Laura Elizabeth Rubio Valladares**

Director de tesis

Dr. Jaime Romero O.

Santiago, Chile 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) DE MEDIO SILVESTRE: COMPARACIÓN DE MÉTODOS TRADICIONALES VERSUS MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN.

Tesis presentada para optar al Grado de Magister en Ciencias de la Acuicultura

Laura Elizabeth Rubio Valladares

	Calificación	Firma
Director de tesis Jaime Romero Ormazábal Bioquímico, Dr.	
Profesores evaluadores Nelson Díaz Pérez Profesor de Biología, Dr. 6.5
Jurij Wacyk González Ingeniero agrónomo, Dr. 5.5
Sergio Bucarey Vivanco Bioquímico, Dr. 6.0
Profesor evaluador externo Rafael Opazo Salas Médico Veterinario, Dr. 6.2

Santiago, Chile 2016.

AGRADECIMIENTOS

Al programa Beca Presidente de la República - PRONABEC, por facilitarme el apoyo económico y brindarme una gran oportunidad en mi vida, para lograr esta meta.

A mi profesor guía, *Dr. Jaime Romero Ormazábal*, quien me concedió las facilidades para realizar mi investigación, me brindó su apoyo incondicional, además de ser el responsable del financiamiento de este proyecto.

Al *Dr. Gastón Higuera*, por orientarme y apoyarme durante la etapa de investigación.

A los Profesores de la comisión evaluadora y en especial a *Dr. Nelsón Díaz*, *Dr. Jurij Wacyk*, *Dr. Sergio Bucarey* y *Dr. Rafael Opazo*, por todas sus sugerencias y aportes para enriquecer este documento.

A la Sra. Jeannette Pizá y Marjorie Sáez, por su apoyo desmesurado y comprensión para lograr este objetivo.

A Jadier Vásquez, por su incondicional cariño, apoyo y consejos brindados en esta etapa de mi vida

A Edyana Fernández y Daniela Covarrubias, por su amistad y sus buenos ánimos en este periodo de transición.

Y finalmente a todas las personas que hicieron parte de este trabajo...

AGRADEZCO A DIOS INFINITAMENTE POR ACOMPAÑARME, DARME LA PAZ Y FORTALEZA QUE NECESITABA DURANTE ESTA ETAPA LEJOS DE MIS SERES QUERIDOS Y TAMBIÉN POR GUIARME TODOS LOS DIAS DE MI VIDA.

DEDICATORIA

A mis padres Gladys y Julio.

A mis mamitas Mafalda y Celia.

A mis hermanos Fiorella y Carlos

A mi gran amor, mi hijo C. B. S.

*Que siempre me han apoyado
incondicionalmente, aún en la distancia.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	07
a. Desarrollo de la acuicultura y características de <i>Seriola lalandi</i>	07
b. Características de la microbiota en peces	08
c. Identificación de microbiota: métodos tradicionales y moleculares.	08
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
A. Objetivo general	11
B. Objetivos específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Obtención de muestras	12
2. Procesamiento de muestras y aislamiento de microorganismos del contenido fecal de “jurel cola amarilla” (<i>Seriola lalandi</i>) de medio silvestre.	12
2.1. Estrategia 1 (uso de método tradicional de cultivo)	12
2.1.1. Procesamiento y aislamiento de microorganismos	12
2.1.2. Extracción y purificación de ADN	13
2.1.3. Amplificación gen 16SrARN o ITS por PCR, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).	13
a. En bacterias	13
b. En levaduras	14
2.2. Estrategia 2 (Aplicación de los métodos moleculares)	14
2.2.1. Extracción de ADN y purificación.	14
2.2.2. Amplificación de PCR.	15
2.2.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).	15
3. Identificación de géneros mediante comparación de perfiles RFLP	15
RESULTADOS	16
a) Caracterización de la microbiota cultivable de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	16
a.1) Identificación de aislados bacterianos	16
a.2) Identificación de aislados de levaduras	18
b) Determinación de la composición de la microbiota intestinal “jurel cola amarilla” (<i>Seriola lalandi</i>) de medio silvestre, a través de métodos moleculares de identificación independiente de cultivo.	19
c) Comparación del método tradicional (aislados) contra método molecular (directo), a través de la composición microbiana mediante perfiles de RFLP provenientes del contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	21
DISCUSIÓN	24

CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuantificación de levaduras totales en muestras de contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	20
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la microbiota intestinal a nivel de phylum de los aislados bacterianos, provenientes del contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> silvestre.	16
Figura 2. Estructura de microbiota intestinal a nivel de género de los aislados bacterianos, provenientes del contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> silvestre.	17
Figura 3. Perfiles RFLP del 16SrRNA de los aislados bacterianos más abundantes a partir de contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	18
Figura 4. PCR-RFLP de ITS, con enzima de restricción <i>Hae</i> III, de los 15 aislados obtenidos en levaduras provenientes del contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	19
Figura 5. Perfiles RFLP 16SrRNA con enzima de restricción <i>Alu</i> I, obtenidos directamente del contenido intestinal de ocho peces silvestres de <i>Seriola lalandi</i> .	20
Figura 6. Perfiles RFLP de 16SrRNA obtenidos del método tradicional (mayor abundancia) y del método molecular del contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	22
Figura 7. Perfiles RFLP de 16SrRNA obtenidos del método tradicional (menos abundantes) y del método molecular del contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	23

ANEXOS

Anexo 1. Procesamiento de las muestras de contenido intestinal según las estrategias de trabajo en paralelo: método tradicional y método molecular de identificación del “juel cola amarilla” (<i>Seriola lalandi</i>) de medio silvestre.	38
Anexo 2. Protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit para bacterias y levaduras.	39
Anexo 3. Descripción de los microorganismos identificados en el contenido intestinal de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	40
Anexo 4. PCR –ITS para levaduras provenientes del contenido intestinal directo de <i>Seriola lalandi</i> de medio silvestre.	41

RESUMEN

El jurel cola amarilla (*Seriola lalandi*) se viene cultivando en Chile, durante los últimos años, y su expansión se debe a la gran demanda en el mercado internacional. El mayor conocimiento científico - técnico ha sustentado su incremento en producción, convirtiéndose en una prominente especie para el desarrollo acuícola.

Dentro de las áreas de estudio en acuicultura para el aumento en producción, la nutrición ha tenido un rol relevante, que debido a los tipos de dietas, uso de antibióticos, cambia el status sanitario del pez y la composición microbiana intestinal. Estos últimos son microorganismos asociados a la microbiota normal, que otorgan beneficios como proteger al pez de ataque de patógenos y ayudar en la digestión de los ingredientes incorporados en la dieta. Sin embargo, el conocimiento de la microbiota de esta especie es muy limitada, es por eso que el objetivo de este estudio fue caracterizar la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre. Se analizó la composición de la microbiota mediante dos estrategias complementarias en paralelo. La primera se basó en métodos tradicionales de aislamiento de microorganismos mediante cultivo. Como resultado se obtuvo un total de 69 aislados bacterianos y 15 de levaduras. La segunda estrategia se analizó la microbiota a través del DNA obtenido directamente de la muestra del contenido intestinal sin cultivar. La identificación de los componentes microbianos se realizó en ambas estrategias mediante la secuenciación de marcadores 16SrRNA (bacterias) o ITS (levaduras), según corresponda.

Posterior a la secuenciación, se determinaron los perfiles de RFLP de 16SrRNA e ITS para cada aislado, según sea el caso. En paralelo, para la composición de la microbiota se generaron perfiles totales de RFLP de los amplicones derivados del DNA de la muestra. Luego, se compararon los perfiles RFLP de ambos métodos. Del método tradicional se detectó la presencia de 20 géneros bacterianos y 1 género de levaduras. En contraste, la estrategia molecular se evidenció la presencia de 4 géneros bacterianos.

Del análisis de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre, mediante método tradicional se determinó que de los 69 aislados bacterianos, se obtuvo entre los más abundantes con el 20% al género *Leucobacter*, 13% de *Alcaligenes*, 9% de *Psychrobacter*, 9% *Marinobacter*, 7% *Halomonas*, 7% *Staphylococcus* y 6% *Bacillus*. Por otra parte, en levaduras de los 15 aislados, se obtuvo un único género representativo, *Debaryomyces*. Mientras que mediante análisis por método molecular de identificación los géneros más abundantes para los 8 perfiles obtenidos fueron *Marinobacter* con el 50%, *Proteus* con el 12.5%, *Halomonas* y *Staphylococcus* con 12.5%.

Se determinó que los géneros *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y *Proteus* identificados por métodos tradicionales de cultivo, se confirmaron en los perfiles de la microbiota derivados de métodos moleculares. Donde *Marinobacter* presentó el 50% de abundancia relativa mediante método molecular a diferencia del método tradicional donde este género sólo obtuvo el 7% de abundancia relativa.

Palabras clave: 16S rRNA, ITS, microbiota intestinal, *Seriola lalandi*, RFLP.

ABSTRACT

Yellowtail amberjack (*Seriola lalandi*) has been grown in Chile, in recent years, and its expansion is due to the high demand in the international market. The greatest scientific and technical knowledge has underpinned its increased production, becoming a prominent species for aquaculture development.

Among the areas of study in aquaculture for increased production, nutrition has played an important role, which because of the types of diets, antibiotics, changes the health status of the fish and the intestinal microbial composition. The latter are microorganisms associated with the normal microbiota, which provide benefits such as protecting the fish pathogen attack and aid in digestion of the ingredients in the diet. However, knowledge of the microbiota of this species is very limited, which is why the aim of this study was to characterize the intestinal microbiota of wild yellowtail amberjack. The composition of the microbiota is analyzed by two complementary strategies in parallel. The first was based on traditional methods of isolation of microorganisms by cultivation. As a result was obtained a total of 69 bacterial and 15 yeast isolates. The second strategy microbiota was analyzed through DNA sample obtained directly from the intestinal contents uncultivated. Identifying microbial components was performed on both strategies by 16SrRNA sequencing markers (bacteria) or ITS (yeast), as appropriate.

Following sequencing, were determined RFLP profiles of 16SrRNA and ITS for each isolate, as appropriate. In parallel, for the total microbiota composition were generated RFLP profiles of amplicons derived from DNA sample. Later, the RFLP profiles of both methods were compared. From traditional method was detected the presence of 20 bacterial genera and 1 genus of yeasts. In contrast, the molecular strategy evidenced of 4 bacterial genera.

Analysis of intestinal microbiota of wild yellowtail amberjack, using traditional method was determined that of the 69 bacterial isolates was obtained among the most abundant with 20% *Leucobacter* genus, 13% of *Alcaligenes*, 9% *Psychrobacter*, 9% *Marinobacter* and 29% other genus. Moreover, in yeasts of the 15 isolates, was obtained a single representative genus *Debaryomyces*. While by molecular identification method of the most abundant genera for the 8 profiles obtained were *Marinobacter* with 50%, with 12.5% *Proteus*, *Staphylococcus* and *Halomonas* with 12.5%.

It was determined that gender *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* and *Proteus* identified by traditional farming methods, were confirmed in the microbiota profiles derived from molecular methods. *Marinobacter* presented where 50% of relative abundance by molecular method unlike the traditional method where the genre got only 7% of relative abundance.

Keywords: 16S rRNA, ITS, intestinal microbiota, yellowtail amberjack, RFLP.

INTRODUCCION

a. Desarrollo de la acuicultura y características de *Seriola lalandi*

El desarrollo de la acuicultura mundial ha incrementado transformándose en una actividad con mayor crecimiento de la industria alimentaria global, a una tasa media anual de 6,2% en el periodo 2000- 2012. Este fenómeno se relaciona con el incremento de la población mundial y la búsqueda de nuevas fuentes de proteína necesarias a la dieta (FAO, 2012).

La acuicultura en Chile se encuentra representada principalmente por la salmonicultura en cuanto a volumen de exportación y retorno de divisas. Con el 73% de la producción acuícola nacional con respecto a la producción de salmones y con un 23% de producción de *Mytilus chilensis* (Fishstat, 2015).

Sin embargo, los eventos de crisis en esta industria, han propiciado el interés por la diversificación de especies. Entre las especies de interés se encuentra *Seriola lalandi* (Palometa, vidriola, dorado, jurel cola amarilla, jurel de castilla, goldstriped amberjack, yellowtail, himarasa) (Fishbase, 2016), pez carnívoro, que habita en aguas cálidas, distribuyéndose en toda la costa del Pacífico, desde Canadá hasta Chile (Bianchi *et al.*, 1999; Dyer & Westneat, 2010; Nugroho *et al.*, 2001). *Seriola lalandi* tiene un crecimiento relativamente rápido, en comparación a otros peces marinos, logrando un peso comercial de 3 a 5 kg en aproximadamente 18 meses (Nakada, 2008). El filete de “jurel cola amarilla” presenta una textura firme y atractiva para el consumidor, sumado a que presenta un excelente perfil nutricional (21.9% proteínas, 0.3% lípidos, 76.7% humedad) (Unidad de Tecnología pesquera, Universidad de Concepción), haciendo que su expansión productiva se visualice promisoría en el mercado internacional (Australia, Estados Unidos, Japón y Europa). Inclusive un informe de la FAO World Aquaculture (2010), informó que el filete de este pez puede llegar a costar hasta 18 US\$ por kilo al por mayor.

Los métodos empleados para cultivo intensivo de peces provocan en estos organismos problemas derivados del estrés al que se someten, especialmente por altas densidades, lo cual afecta su estado inmunológico propiciando una mayor susceptibilidad de enfermedades bacterianas oportunistas (Escobar *et al.*, 2006). El tratamiento para dichas enfermedades utilizan antibióticos; estrategia de control que puede contribuir a la aparición de cepas microbianas resistentes a esos fármacos (Escobar *et al.*, 2006). En referencia a lo anterior, la manipulación de la microbiota intestinal, se presenta como una alternativa para superar los posibles efectos adversos de los antibióticos (Nayak, 2010).

b. Características de la microbiota en peces

Con la aparición de las superficies epiteliales de los peces y los demás vertebrados son colonizadas por un gran número de microorganismos, que establecen relaciones de convivencia con el hospedero; a este grupo de microorganismos se les denomina microbiota (Spor *et al.*, 2011).

Estos microorganismos mayormente residen en el tracto digestivo, donde influyen en una amplia gama de procesos biológicos generando efectos benéficos al hospedero. Tales como su aporte en la nutrición, complementando procesos de digestión, produciendo sustancias antimicrobianas, modulando el sistema inmune del hospedero, (Gordon, 2005; Rawls *et al.*, 2006; Hovda *et al.*, 2007; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2007). Estas funciones indican la importancia de la microbiota para el hospedero y la composición microbiana es un factor prescindible para adquirir los beneficios que se deriva de ella. De esta forma, conocer la constitución de la microbiota puede ser la base para futuras manipulaciones de esta, con el fin de sacar la mayor utilidad a estos microorganismos.

Como se sabe la microbiota gastrointestinal de los peces está constituida por bacterias y levaduras que residen en el intestino y que pueden alcanzar entre 10^7 hasta 10^{11} bacterias g^{-1} del contenido intestinal (Nayak, 2010), con valores más altos observados en peces herbívoros tropicales (Tsuchiya *et al.*, 2008).

Teniendo como referencia la composición microbiana en peces carnívoros, tenemos que en trucha arcoíris se detectó que *Pseudomonas* representa más del 60% de la comunidad bacteriana (Navarrete *et al.*, 2009). Sin embargo Holben *et al.*, (2002), compararon las comunidades microbianas intestinales de salmón silvestre de Noruega, y del salmón noruego de cultivo, reportando que *Acinetobacter* representó el 55% en el salmón noruego de cultivo; en cambio en el salmón escoces, *Mycoplasma* presentó una dominancia del 81%. A diferencia de los salmones provenientes del medio natural en donde, el género *Mycoplasma* representó el 96% del total. Esto abre un espacio para estudiar la microbiota de *Seriola*, previamente reportada por Aguilera *et al.*, (2013), quienes se centraron en ejemplares de cultivos, no obstante, la composición de ejemplares silvestres no ha sido reportada.

c. Identificación de microbiota: métodos tradicionales y moleculares.

Los avances en los métodos de cultivo de microorganismos permiten aumentar la fracción de la comunidad que puede ser cultivada (Pond *et al.*, 2006). En la actualidad se dispone de una amplia gama de medios de cultivo comerciales para el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, constituidos por componentes mezclados con anterioridad, precisando el agregado de agua y su esterilización. En el estudio de microbiota intestinal los medios más utilizados son: Agar triptona de Soya agar (TSA), Yeast Extract-Peptide-Dextrose (YEPD), entre otros (Spanggaard *et al.*, 2000; Pond *et al.*, 2006; Navarrete *et al.*, 2009). De manera continua se elaboran y revisan medios de cultivo para ser utilizados en el aislamiento y la identificación de microorganismos que son de interés para los investigadores en los campos de la alimentación, acuicultura, ambientes acuáticos y microbiología clínica (Tortora *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios en peces han utilizado estos métodos

tradicionales sólo para investigar la microbiota intestinal (González *et al.*, 1999; Sugita *et al.*, 1997). En referencia a esto Navarrete *et al.*, (2010), indican que la cultivabilidad de bacterias de la trucha arco iris en medio TSA es del 18% en promedio. Sin embargo, Navarrete *et al.*, (2009), indicaron que en *S. salar*, las bacterias cultivables son aproximadamente <1% de las bacterias totales. Aun así el medio TSA, se ha utilizado ampliamente para estudiar la microbiota intestinal de los peces (Spanggaard *et al.*, 2000). Por otro lado, a través de la obtención de aislados bacterianos se pueden generar perfiles de restricción genómicos que son comparables y permiten la identificación de géneros en perfiles de restricción genómicos de bacterias totales (Navarrete *et al.*, 2010).

Existe un número creciente de estudios dentro del análisis de la microbiota en peces, combinando métodos tradicionales de cultivo y métodos moleculares de identificación (Jensen *et al.*, 2002; Asfie *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2004), debido a que los enfoques moleculares abren nuevas fronteras en la comprensión de la microbiota intestinal (Jensen *et al.*, 2003). Estos métodos moleculares, permiten detectar e identificar microorganismos directamente en el sistema sin cultivarlos ni aislarlos, ya que analizan su ADN (Rantsiu *et al.*, 2010). Dichos métodos moleculares han sido eficaces para el estudio de la comunidad bacteriana gastrointestinal de los peces (Jensen *et al.*, 2004; Hovda *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

Por tal razón las nuevas técnicas moleculares independientes de cultivo utilizan principalmente al gen 16SrRNA para detectar bacterias, y el espaciador transcrito interno (ITS) para describir levaduras, como parte de la microbiota. Entre estos métodos independientes de cultivo o moleculares tenemos a: PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), PCR cuantitativo (q-PCR), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); estos métodos, se han convertido en herramientas de gran utilidad al momento de caracterizar comunidades bacterianas complejas como las presentes en el tracto intestinal de peces (Vaughan *et al.*, 2000; Holben *et al.*, 2002; González & Saiz, 2005; Kim *et al.*, 2007).

La estrategia molecular de identificación de microorganismos mediante secuenciación del 16S rRNA o ITS incluyen tres etapas: a) amplificación de los genes a partir de la muestra; b) determinación de la secuencia nucleotídica de los amplicones, y c) análisis de las secuencias. Una vez determinada las secuencias de los nucleótidos y establecidas las comparaciones con bacterias o levaduras tipo, se obtendrá el grado de similitud entre las secuencias de los 16S rRNA o ITS lo que indicaría su relación evolutiva. En este contexto, un rango de similitud nucleotídica mayor a 95% es aceptado para la identificación de géneros microbianos (Drancourt *et al.*, 2000).

Se han empleado una serie métodos que han contribuido al conocimiento de la microbiota de muchos ecosistemas de interés, entre ellos se destaca los Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), estos RFLP-PCR del gen 16S rRNA, fueron utilizados para investigar las comunidades bacterianas en el intestino de los peces tales como el salmón, trucha arco iris, tilapia y carpa (Holben *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2004). Esta técnica de RFLP, es una alternativa para la identificación microbiana de manera rápida para su utilización en la industria (Carvalho, 2005). Amplificando fragmentos específicos del genoma bacteriano por PCR para luego digerirlos con enzimas de restricción de corte

frecuente (*Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Cfo* I) y así generar perfiles de digestión (Ochoa & Vásquez-Juárez, 2004). Estas enzimas de restricción son una herramienta útil en biología molecular, ya que cortan sitios específicos en una molécula de ADN. Por ejemplo la enzima *Hae* III, rompe el ADN en una secuencia de cuatro pares de nucleótidos en la posición GGCC, cortando entre el segundo y el tercer nucleótido (G y C). A diferencia de la enzima *Alu* I que reconoce la secuencia AGTC y corta G y T (Rosa & Gabor, 2006; Guamán, 2009). Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las distintas especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis (Ratón, 2004). Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para identificar bacterias y levaduras aisladas de diversos organismos y ambientes (Heras-Vásquez *et al.*, 2003; Tapia-Rusell *et al.*, 2006).

Teniendo como referencia lo expuesto anteriormente, es necesario conocer la composición de la microbiota intestinal del “jurel de cola amarilla” *Seriola lalandi*, de esta manera se contribuiría con la indentificación de microorganismos presentes y sus posibles aportes a la nutrición y salud del pez, cuya información es actualmente muy limitada. Este estudio es una alternativa para conocer la composición de la microbiota como un paso en la exploración de la identificación de poblaciones microbianas más abundantes o relevantes para los procesos mencionados; además que el conocimiento de esta microbiota podría ayudar al manejo adecuado de ésta, de modo de convertirla en una herramienta de utilidad, empleándola como estrategia con el fin de mejorar las condiciones nutricionales y sanitarias del pez.

HIPÓTESIS

En la caracterización de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre, los métodos moleculares de identificación confirman la presencia de los géneros microbianos recuperados por métodos tradicionales de cultivo.

OBJETIVOS

A. Objetivo general

Caracterizar la microbiota intestinal en *Seriola lalandi* de medio silvestre y comparar los métodos tradicionales de cultivo versus métodos moleculares de identificación.

B. Objetivos específicos

1. Describir la composición de la microbiota intestinal en “jurel cola amarilla” *Seriola lalandi* de medio silvestre, a través de métodos tradicionales de cultivo.
2. Describir la composición de la microbiota intestinal en “jurel cola amarilla” *Seriola lalandi* de medio silvestre, a través de métodos moleculares.
3. Comparar cualitativamente los métodos tradicionales versus los métodos moleculares de identificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Obtención de las muestras

Se obtuvieron muestras del contenido intestinal de ocho peces de la especie *Seriola lalandi* de medio silvestre en fase adulta proveniente de medio silvestre. Dichas muestras fueron extraídas mediante “stripping” el cual consistió en realizar suaves masajes en la zona ventral del pez.

Luego las muestras del contenido intestinal se colocaron en recipientes estériles para su preservación en frío (4°C) en cajas de tecnopor con el fin de mantener la cadena de frío, para posteriormente ser analizadas en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

2) Procesamiento de muestras, aislamiento e identificación de microorganismos del contenido intestinal de “jurel cola amarilla” (*Seriola lalandi*) de medio silvestre.

Las muestras obtenidas se analizaron mediante dos estrategias en paralelo consistente en utilizar métodos tradicionales de cultivo y métodos moleculares de identificación (anexo 1).

2.1. Estrategia 1 (uso del método tradicional de cultivo)

2.1.1. Procesamiento y Aislado de microorganismos

El análisis del contenido microbiano cultivable se realizó a través de cultivos en medio sólido Trypticase Agar Soja. Esto se realizó mediante diluciones seriadas de los homogenizados del contenido intestinal en solución fosfato salino (PBS 1X) estéril.

Posteriormente, se sembró en medio Trypticase Agar Soja (TSA, Merck®, que favorece el crecimiento de una diversidad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos) (Chapin & Lauderdale, 2003); Para el cultivo de levaduras se utilizó extracto de levadura-peptona-dextrosa (YEPD Merck®, que facilita al crecimiento de levaduras) (Murray *et al.*, 2003). Dichas placas se incubaron por 3 días a $17 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones aeróbicas.

Se aislaron las colonias bacterianas obtenidas con morfología distintas en placas de agar TSA o YEPD según corresponda. Se repitió el aislamiento hasta obtener colonias puras en dichas placas.

Para el recuento de colonias bacterianas en placas se determinó el total de microorganismos cultivados en función a las unidades formadoras de colonias UFC/ml utilizando un contador de colonias Stuart® colony counter (modelo SC6PLUS, Reino Unido).

Luego se seleccionaron colonias con morfotipos distinto. Dichas colonias fueron utilizadas para la extracción de ADN.

Todos los aislados obtenidos se almacenaron en criotubos de 2µL a -80°C.

2.1.2. Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para bacterias, se realizó tratamiento previo con lisozima (20 µg/µL), hasta purificar el DNA. Mientras que para levaduras se utilizó líticasa (20 µg/µL), como tratamiento previo. Dicho protocolo se siguió hasta purificar el ADN genómico (Anexo 2).

2.1.3. Amplificación del gen 16SrARN o ITS por PCR, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

a) En bacterias

El ADN genómico extraído de los aislados bacterianos se utilizó como templado para amplificar el gen 16SrARN mediante PCR usando partidores universales del gen (Frank *et al.*, 2008), según lo descrito por Romero & Navarrete (2006). Dicha amplificación se realizó en un termociclador ESCO (modelo: Swift™ MaxPro, Singapur).

La secuencia de los partidores universales se menciona a continuación:

341 F: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'

788 R: 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA A-3'

Los amplicones se digirieron con enzima de restricción *Alu I* (Invitrogen), según indicaciones del fabricante. Con el fin de obtener perfiles RFLP (Romero *et al.*, 2002).

b) En levaduras

Se realizó el mismo procedimiento que para bacterias, con la diferencia que se utilizaron partidores universales para ITS (González *et al.*, 2003). Los cuales se mencionan la secuencia a continuación:

ITS1: 5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3'

ITS4: 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3'

Para la obtención de RFLP, se digirieron los amplicones con la enzima *Hae* III (Romero *et al.*, 2002).

Con el fin de visualizar los perfiles de corte (tanto para bacterias como para levaduras), se realizó corrida electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE) al 8%, a 150 Volt por 45 minutos. Posteriormente se realizó tinción con Nitrato de plata (Romero & Navarrete, 2006). Proporcionando perfiles RFLP para cada género identificado dentro del set de aislados obtenido.

Por otra parte, los amplicones obtenidos de los aislados fueron secuenciados en Macrogen Maryland, USA. Las secuencias del gen 16S rDNA se compararon con la base de datos disponible en Ribosomal Database Project II (Cole *et al.*, 2007) (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp). Las secuencias obtenidas del ITS fueron comparados con las disponibles en GenBank usando el software BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Las secuencias obtenidas a partir de los aislados, se alinearon para comprobar su porcentaje de identidad utilizando software BIOEDIT, (Hall, 1999 y 2011). Para considerar que un aislado pertenece a un género bacteriano, se consideró una identidad sobre el 95% (Fernández *et al.*, 2010). Se seleccionaron las bacterias y levaduras representativas de distintos géneros para análisis posteriores.

2.2. Estrategia 2 (aplicación de métodos moleculares).

2.2.1. Extracción de ADN y purificación

Los homogeneizados de los contenidos intestinales se pesaron y se resuspendieron en Buffer fosfato salino (PBS)

La extracción de ADN total del contenido intestinal de los peces se realizó mediante el Kit PowerSoil®DNA Isolation (MO BIO, Inc. Carlsbad, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Previamente se adicionó Lisozima y

Liticasa (SIGMA) a una concentración de 20µg/µL a 37°C por 60 minutos, y posteriormente con Proteinaza K (Invitogen) a 0.1 mg/mL a 37°C por 60 min.

2.2.2. Amplificación de PCR

La integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La concentración de ADN se determinó utilizando el equipo Qubit 3.0 (Life technologies). El ADN total de cada muestra fue utilizado como templado para la amplificación de una fracción de la región hipervariable V3-V5 del gen 16S ARNr bacteriano, utilizando los partidores descritos por Muyzer *et al.* (1993) 341 F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' y 788 R 5'-GGACTACCAGGGTATCTAA-3.

En levaduras, la amplificación del ADN purificado se utilizó la zona ITS, con los partidores universales ITS1 e ITS4, descrito previamente (González *et al.*, 2003).

2.2.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La digestión de los amplicones se realizó mediante el uso de enzimas de restricción *Alu I* y *Hae III*, para bacteria y levadura respectivamente. Los fragmentos digeridos se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 8%, a 150 Volt por 45 minutos. Posteriormente se realizó la tinción con Nitrato de plata (Romero & Navarrete, 2006). Proporcionando perfiles totales de RFLP.

3) Identificación de géneros mediante comparación de perfiles RFLP

Para la identificación, se realizó una comparación de los perfiles de RFLP obtenidos en el paso 2.1.3 (gen 16S rRNA e ITS) y los perfiles totales de RFLP obtenidos en el punto 2.2.3 (estrategia 2).

La comparación se comprobó mediante búsqueda de secuencias nucleotídicas en el programa Bioedit. Para levaduras se buscó la secuencia GGCC en el bioedit. Y para bacterias se buscó la secuencia AGTC. Ambas secuencias indicaron los tamaños de los fragmentos vistos en los perfiles de RFLP.

RESULTADOS

a) Caracterización de la microbiota cultivable de *Seriola lalandi* de medio silvestre.

El recuento promedio para levaduras fue de 0.24×10^4 UFCg⁻¹ y para bacterias fue de $2,3 \times 10^4$ UFC g⁻¹, respectivamente. Se obtuvieron un total de 84 aislados entre bacterias y levaduras (medio TSA y YEPD). De los cuales 69 aislados correspondieron a bacterias y 15 aislados a levaduras. Dichos aislados se identificaron en base a sus secuencias del gen ribosomal y espaciador transcrito interno (Anexo 3). A su vez se obtuvieron los perfiles de RFLP del 16SrRNA o ITS, según corresponda, para la identificación de cada aislado y así ser comparados posteriormente con el método molecular independiente de cultivo.

a.1) Identificación de aislados bacterianos

Entre los aislados bacterianos obtenidos, se destacaron los phylum Proteobacteria, y Actinobacteria (Figura 1), ya que en conjunto comprenden más del 80% del total de aislados obtenidos. En este análisis de la microbiota intestinal se reveló la presencia de 20 géneros bacterianos, siendo *Leucobacter*, *Alcaligenes*, *Psychrobacter* y *Marinobacter* como los más predominantes, representando un 51% del total de la comunidad bacteriana aislada en *Seriola lalandi* (Figura 2, anexo 3).

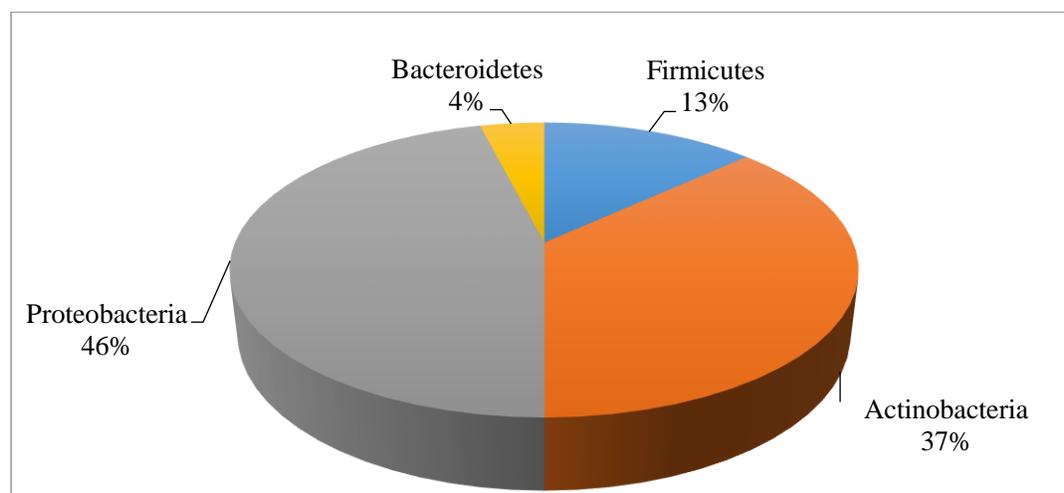


Figura 1. Estructura de la microbiota intestinal a nivel de phylum de los aislados bacterianos, provenientes del contenido intestinal de *Seriola lalandi* silvestre.

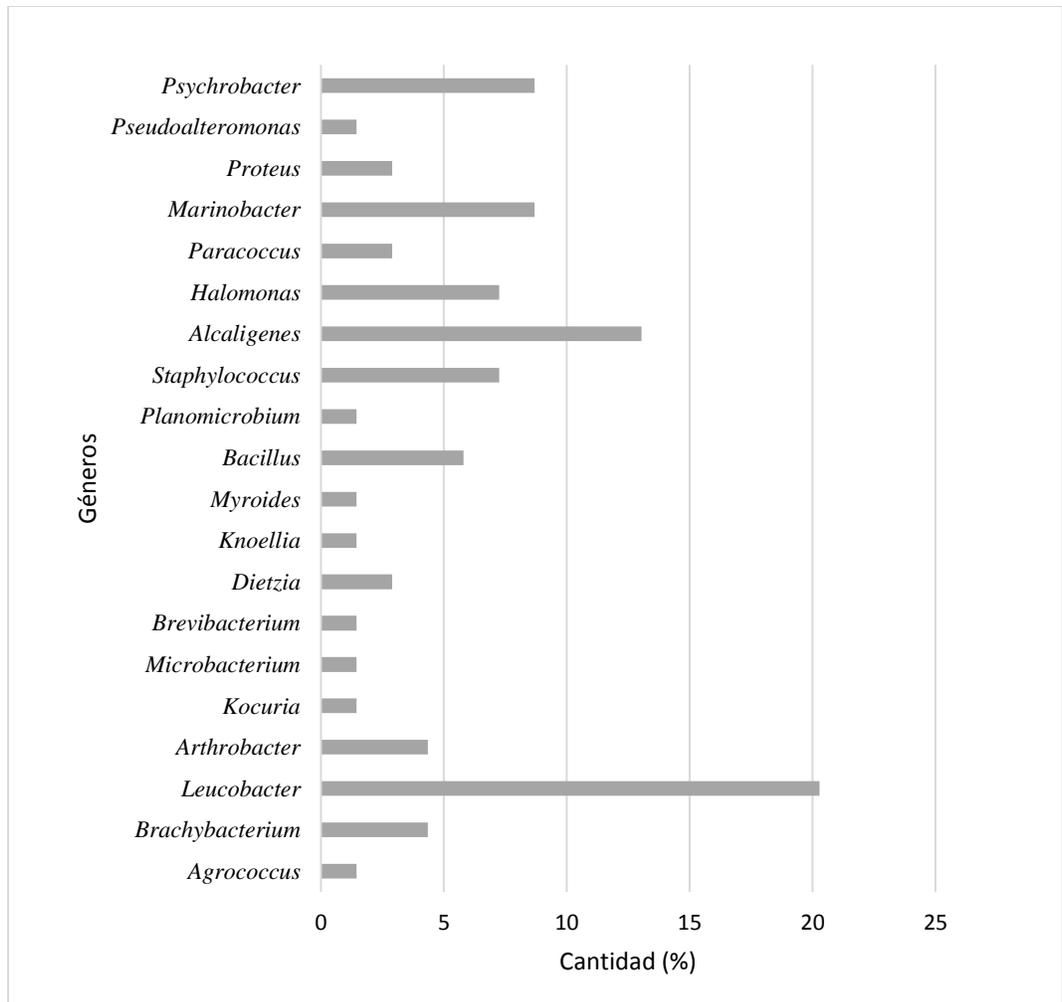


Figura 2. Estructura de microbiota intestinal a nivel de género de los aislados bacterianos, provenientes del contenido intestinal de *Seriola lalandi* silvestre.

Se obtuvieron los perfiles PCR-RFLP de los aislados del contenido intestinal de *Seriola lalandi*, mediante digestión con enzima *Alu* I. Los perfiles de los géneros más abundantes se muestran en la figura 3. Estos perfiles fueron diferentes para cada uno de los aislados, lo que permitió asociar un perfil único para cada uno de los géneros encontrados.

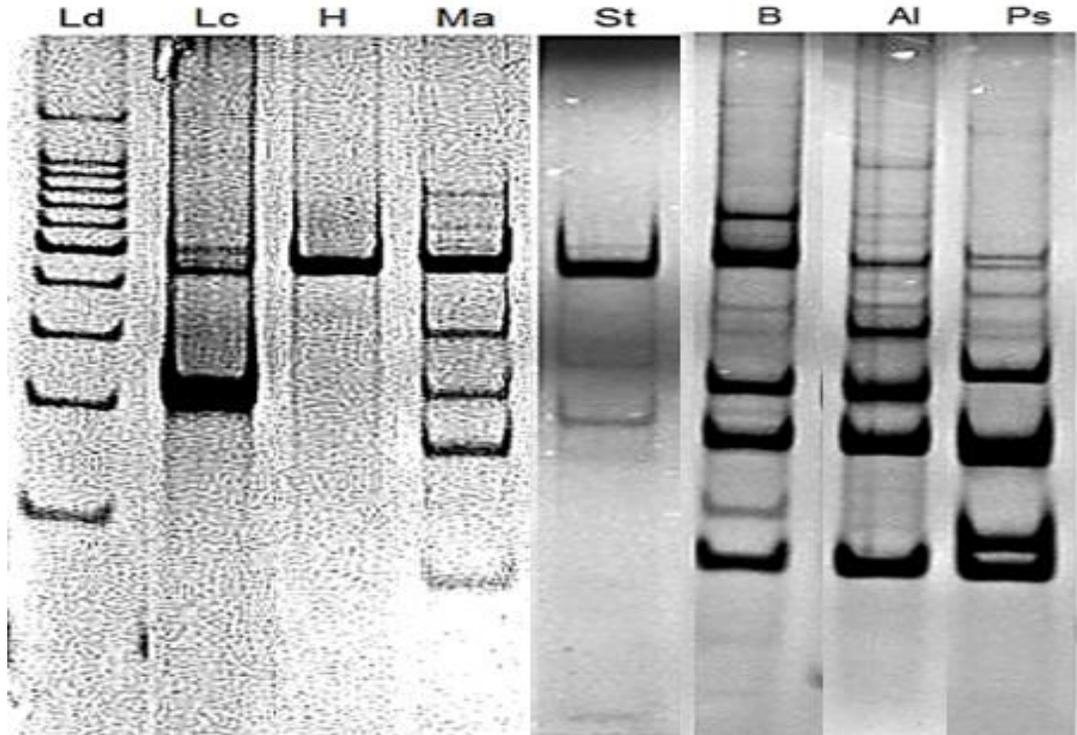


Figura 3. Perfiles RFLP del 16SrRNA de los aislados bacterianos más abundantes a partir de contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre. Cada carril muestra el perfil único de cada aislado bacteriano. La nomenclatura se estableció de la siguiente manera: Lc: *Leucobacter*; Al: *Alcaligenes*; B: *Bacillus*; H: *Halomonas*; Ma: *Marinobacter*; Ps: *Psychrobacter*; St: *Staphylococcus*; Ld: Marcador de tamaño (1100 pb).

a.2) Identificación de aislados de levaduras

Los aislados obtenidos en medio YEPD se secuenciaron utilizando el espaciador transcrito interno (ITS). El resultado fue que la totalidad de las levaduras analizadas pertenecieron al género *Debaryomyces*, del phylum Ascomycota (Anexo 4). Resaltando a este género como el único representante de las levaduras encontradas mediante el método tradicional de cultivo en *Seriola lalandi* de medio silvestre.

Posteriormente se generaron los perfiles RFLP-ITS para cada uno de los aislados utilizando la enzima de restricción *Hae* III. Los perfiles resultantes fueron indistinguibles entre sí para la totalidad de los aislados de levadura (Figura 4).

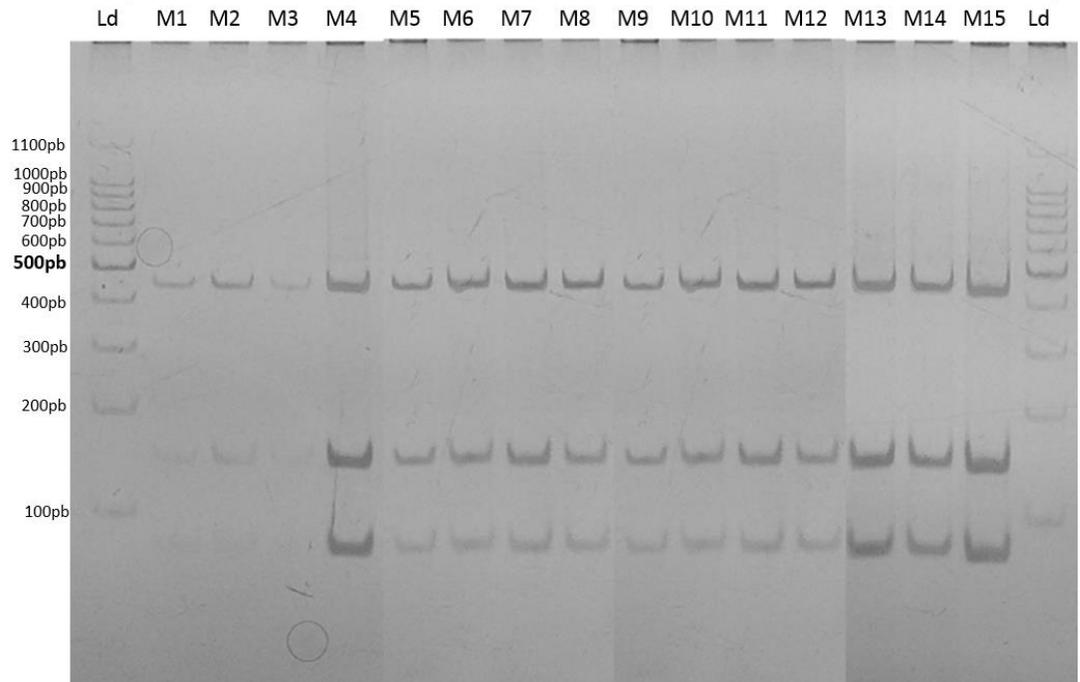


Figura 4. Perfiles PCR-RFLP de ITS, con enzima de restricción *Hae* III, de los 15 aislados obtenidos en levaduras provenientes del contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre. Carriles M1 al M15 indican en nombre de cada uno de los aislados de levadura, *Ld*: Marcador de tamaño (1100pb).

b) Determinación de la composición de la microbiota intestinal en “jurel cola amarilla” (*Seriola lalandi*) de medio silvestre, a través de métodos moleculares de identificación independiente de cultivo.

El análisis de la composición microbiana obtenido directamente de las muestras del contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre, mediante PCR-RFLP 16S rRNA o ITS y electroforesis en gel de poliacrilamida generaron ocho perfiles que se observan en la figura 5. Los perfiles presentaron entre 1 a 6 bandas, de los cuales las muestras sl1, sl2, sl4 y sl6 se observaron bandas más notorias que el resto. Sin embargo, se evidenció patrones de migración similares para sl3, sl5, sl7 y sl8 y para sl2 y sl4 (*Alu* I) lo que podría indicar que corresponderían a las mismas secuencias, y por tanto, a los mismos componentes bacterianos. A diferencia del sl6 donde se evidenció una sola banda muy nítida a la altura de los 500pb. Mientras que en sl1 presenta un perfil diferente al resto de los perfiles de las muestras de contenido intestinal de *Seriola lalandi* silvestre.

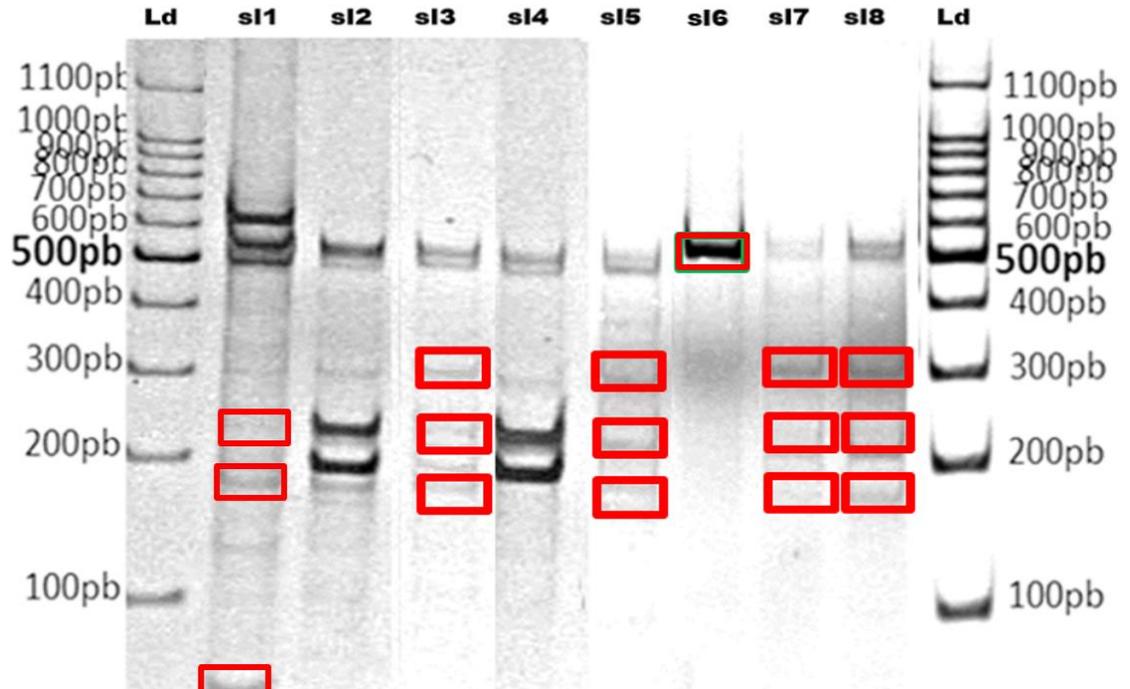


Figura 5. Perfiles RFLP 16SrRNA con enzima de restricción *Alu* I, obtenidos directamente del contenido intestinal de ocho peces silvestres de *Seriola lalandi*. Los carriles sl1 a sl8 indican el nombre de la muestra analizada. *Ld*: marcador de tamaño (1100 bp)

Con respecto al análisis de las levaduras totales provenientes del contenido intestinal de *Seriola lalandi* silvestre, mediante extracción directa de ADN, se lograron obtener amplicones con bandas muy tenues, que no se lograron digerir (Anexo 4), y por lo tanto no se obtuvieron perfiles RFLP totales. Sin embargo se recurrió a cuantificarlas (Cuadro 1), encontrándose un nivel de 5×10^3 levaduras por gramo, detectadas sólo en algunas muestras.

Cuadro 1. Cuantificación mediante qPCR de levaduras totales en muestras de contenido intestinal de *Seriola lalandi*

Muestra	Cantidad (Lev/mL)
sl3	$5,01 \times 10^3$
sl4	$5,06 \times 10^3$
sl6	$4,63 \times 10^3$
sl7	$4,87 \times 10^3$

c) Comparación del método tradicional (aislados) contra método molecular (directo), a través de la composición microbiana mediante perfiles de RFLP provenientes del contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre.

Los perfiles PCR-RFLP obtenidos de los aislados y de la extracción de ADN directa de las muestras de contenido intestinal, se compararon en base a la similitud de los tamaños de las bandas presentes. La comparación se realizó primero mediante los perfiles totales y los aislados con géneros más abundantes (Figura 6) y luego se compararon los mismos perfiles totales con los perfiles de los aislados con géneros menos abundantes (Figura 7).

En los perfiles bacterianos de la microbiota intestinal obtenidos por extracción directa de ADN, se evidenció que los perfiles sl3, sl5, sl7 y sl8 presentaron similares patrones de migración en donde se podría encontrar al género *Marinobacter* con el 50% de abundancia relativa entre los 8 perfiles totales. Mientras que en el perfil sl6 se podría encontrar a *Staphylococcus* y *Halomonas*, con el 12.5% ya que ambos géneros presentan similitud en la ubicación de la banda a los 500pb (Figura 6).

Sin embargo entre los géneros menos abundantes de los aislados, se logró evidenciar la posible presencia del género *Proteus* con el 12.5% en el perfil sl1 proveniente del contenido intestinal directo (Figura 7).

Cabe mencionar que los perfiles sl2 y sl4 no presentaron similitud con ningún perfil de los géneros identificados mediante aislados (Figura 6 y 7).

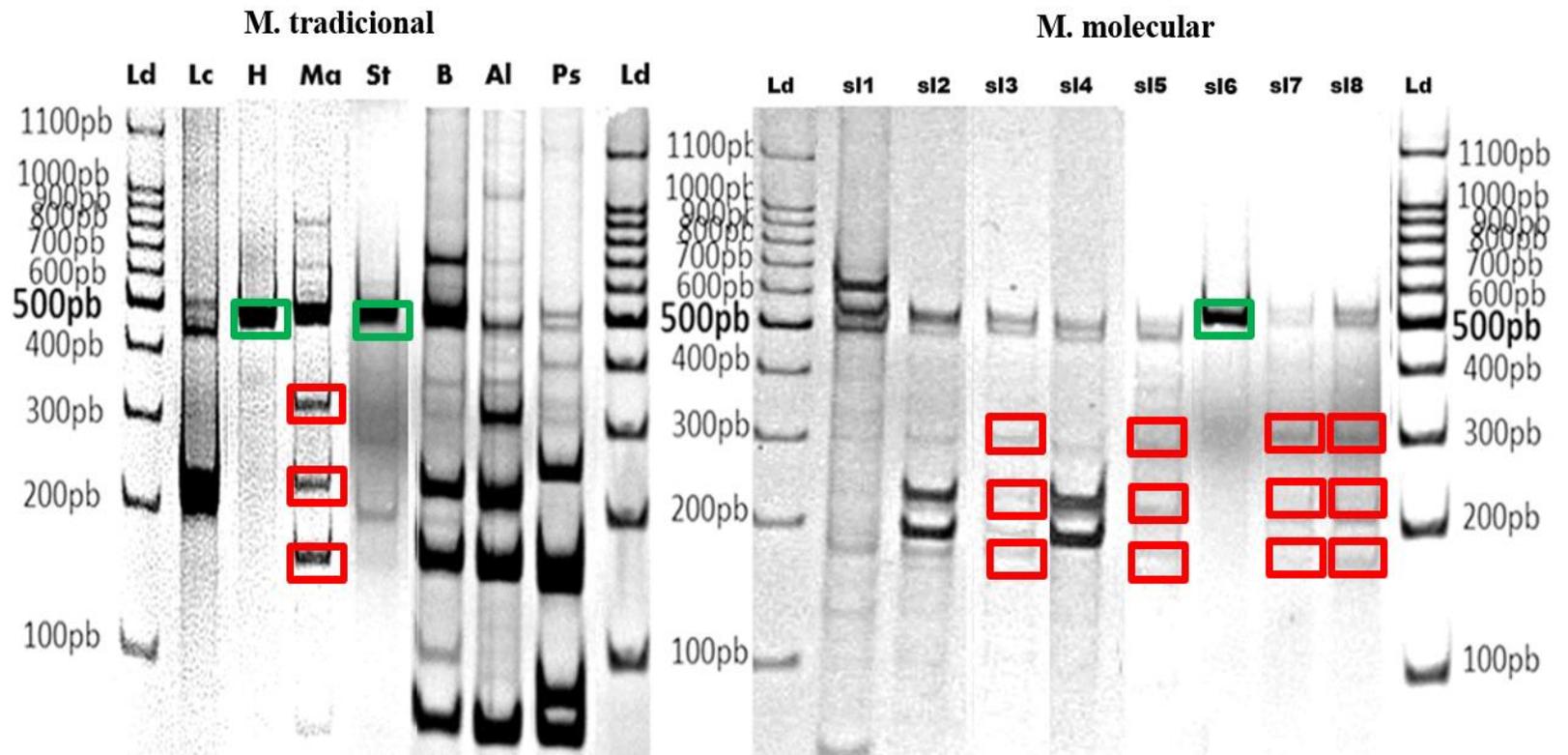


Figura 6. Perfiles RFLP de 16SrRNA obtenidos del método tradicional (mayor abundancia relativa) y del método molecular del contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre. Lc: *Leucobacter*; Al: *Alcaligenes*; B: *Bacillus*; H: *Halomonas*; Ma: *Marinobacter*; Ps: *Psychrobacter*, St: *Staphylococcus*. Los carriles sl1 a sl8 indican el nombre de la muestra analizada. Ld: Marcador de tamaño (1100 bp).

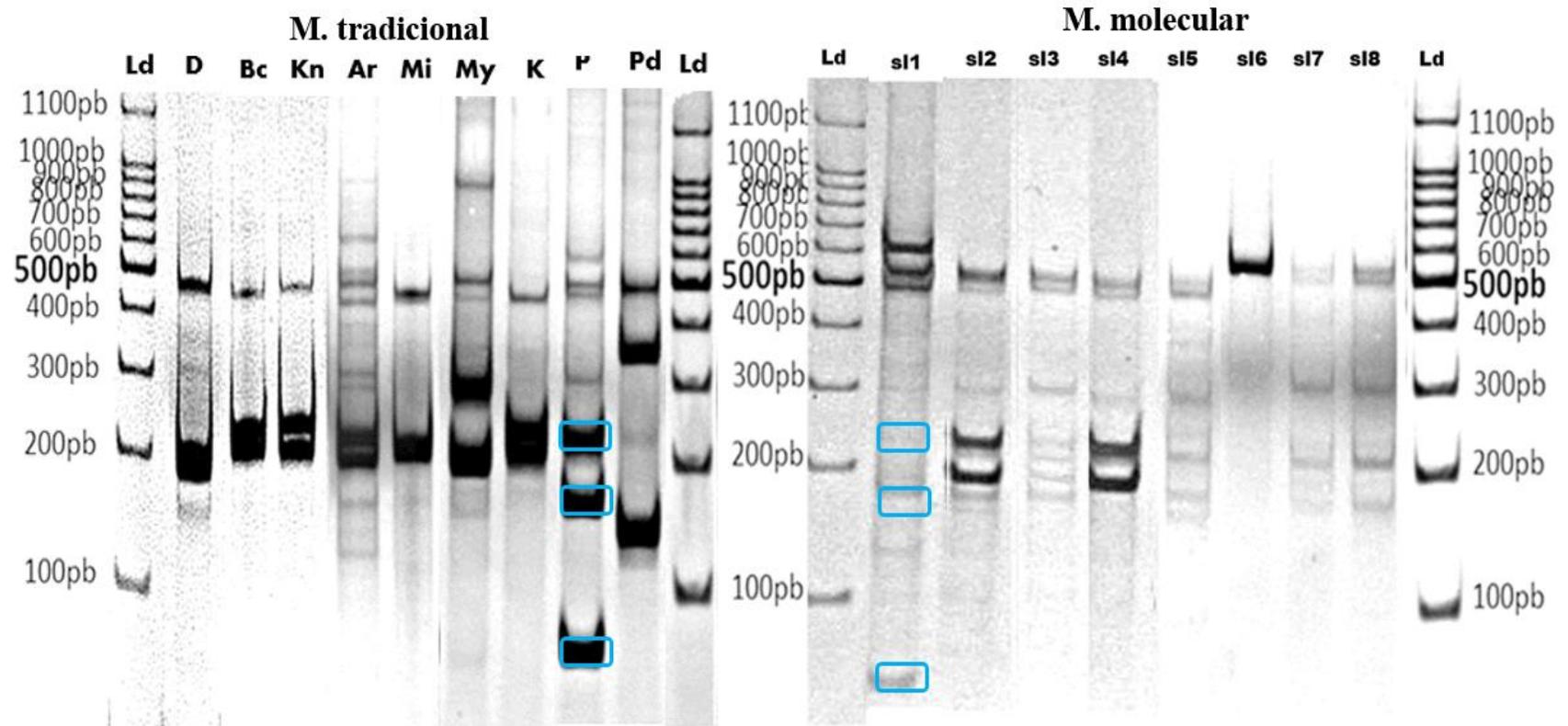


Figura 7. Perfiles RFLP de 16SrRNA obtenidos del método tradicional (menos abundantes) y del método molecular del contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre. D: *Dietzia*; Bc: *Brachyacterium*; Kn: *Knoellia*; Ar: *Arthrobacter*; Mi: *Microbacterium*; My: *Myroides*, K: *Kocuria*; P: *Proteus*; Pd: *Pseudoalteromonas*... Los carriles sl1 a sl8 indican el nombre de la muestra analizada. Ld: Marcador de tamaño (1100 bp).

DISCUSIÓN

En la actualidad existe una progresiva atención en función a la composición de la microbiota intestinal en los peces, debido a la contribución de la microbiota en los procesos como nutrición y defensa del huésped (Nayak, 2010; Romero & Navarrete, 2012). A pesar de la proyección de *Seriola lalandi* como especie de interés comercial, a la fecha las investigaciones realizadas en microbiota intestinal son muy incipientes, por lo cual, la presente investigación es el primer estudio sobre la composición microbiana intestinal en su condición silvestre.

En los últimos años se ha investigado sobre la diversidad de la microbiota intestinal en peces utilizando métodos tradicionales y moleculares para identificar a los microorganismos que la componen (Huber *et al.*, 2004; Pond *et al.*, 2006; Ringø *et al.*, 2006a, b; Merrifield *et al.*, 2009). En esta investigación se empleó la base de datos del NCBI para identificar levaduras y el Ribosomal Data Project II y su función Seqmatch para la identificación bacteriana, debido a que es una de la principales bases de datos de secuencias de DNA ribosomal utilizadas en la taxonomía de microorganismos (Wang *et al.*, 2007). En este trabajo la identificación taxonómica se realizó hasta el nivel de género dado que en taxonomía la especie bacteriana es definida como el conjunto de cepas que comparten una similitud del aproximada de 70%, en experimentos de reasociación DNA-DNA, y para que sea definida una secuencia a nivel de especie debe presentar una identidad $\geq 97\%$ o entre sus genes 16S rRNA (Turnbaugh & Gordon, 2009). La identificación a nivel de género es más certera en base a la comparación del 16S rRNA ya que, en general, existe un consenso que indica que los niveles de identidad de las secuencias de 16S rRNA para definir género, es cercana al 95% (Roeselers *et al.*, 2011).

En esta investigación se observó que todos los aislados pudieron ser asignados a un género previamente descrito. Dentro de los géneros más abundantes, se procedió a examinar la diversidad microbiana mediante el análisis de 16SrRNA o ITS, en los cuales se mostró gran poder de resolución para diferenciar aislados. En el caso de los ITS se presentaron perfiles similares, por lo cual, se presume que esos aislados son similares genéticamente, incluso podrían corresponder a la misma cepa (Jensen *et al.*, 2003).

En el trabajo realizado por Aguilera *et al.*, (2013) en *Seriola lalandi* proveniente de acuicultura, el recuento promedio de bacterias cultivables fue de 9.5×10^3 UFC g^{-1} del contenido intestinal. Por otro lado en otra especie de *S. quinqueradiata* existe un reporte de recuento de carga microbiana de 5.9×10^4 UFC g^{-1} de contenido intestinal (Sakata *et al.*, 1978). En referencia a lo expuesto por los autores cabe decir que en este trabajo de investigación los datos de recuento promedio de microorganismos totales en *Seriola lalandi* silvestre fueron de 2.3×10^4 UFC g^{-1} de los contenidos intestinales, lo que indica que estos resultados son coincidentes con el recuento reportado por los autores de acuerdo a la estrategia tradicional. En general, el valor obtenido de carga microbiana de la microbiota intestinal en *Seriola lalandi* silvestre se encuentra en el rango reportado, pero su cultivabilidad sería baja si se consideran los valores de recuento total.

Diversos estudios indican que la alimentación influye en la composición de la microbiota intestinal en de los peces (Ringø *et al.*, 2006b). Corroborando con esto, Uchii *et al.* (2006)

mencionan que entre todos los factores ambientales que influyen en la composición de la microbiota intestinal, la alimentación es un factor muy importante. Por otro lado Dhanasiri *et al.* (2011), indica que la alimentación artificial reduce significativamente la diversidad de la microbiota intestinal en peces de cultivo en comparación a la microbiota de los peces silvestres, observando que los peces silvestres alimentados con dietas artificiales presentaban un incremento en bacterias de las familias *Clostridiaceae* y *Vibrionaceae*, en desmedro de las bacterias que estaban presentes inicialmente que pertenecían a las familias *Ignavibacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae* y que finalmente desaparecían producto de la dieta. De esta forma, se reduce en más del 60% la diversidad de la microbiota intestinal con respecto a peces silvestres recién capturados, indicando que la alimentación artificial conlleva a la pérdida de diferentes especies bacterianas. Similares resultados obtuvieron Aguilera *et al.*, (2013), informaron que en *Seriola lalandi* de cultivo en sistema cerrado identificaron a *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Staphylococcus* como los géneros predominantes en los peces en la etapa de 50 g, mientras que *Microbacterium* y *Francisella* fueron los géneros predominante en la etapa 370 g., además indicaron que dependiendo del tamaño del huésped, los géneros *Bacillus* y *Vibrio* fueron los únicos géneros compartidos. La información anteriormente mencionada, concuerda con esta investigación, ya que un pez en medio silvestre presenta mayor diversidad microbiana como es el caso de *Seriola lalandi* de medio silvestre, que mediante método tradicional, la microbiota de este pez se compone de 20 géneros bacterianos y 1 género de levadura, de los cuales los más abundantes son *Leucobacter*, *Alcaligenes*, *Psychrobacter*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* y en levaduras *Debaryomyces* como género más abundante de este estudio.

Otro factor que posiblemente influya en la composición microbiana es el componente genético, puesto que existen evidencias que hospederos de una misma familia (genética) que comparten asociaciones con ciertos grupos de bacterias, lo que sugiere que la composición microbiana se encuentra influenciada de alguna manera por el hospedero (Navarrete *et al.*, 2012). Esto indicaría que el hospedador selectivamente da forma a su comunidad bacteriana, además, de que los factores genéticos del huésped pueden compensar las influencias ambientales en la determinación de la colonización microbiana de las superficies intestinales (Bevins & Salzman, 2011). Esto es importante porque los peces de cultivo provienen de un limitado stock genético a los reproductores disponibles. En cambio, los peces silvestres podrían presentar mayor diversidad genética. Sin embargo, el efecto genético no fue cuantificado en esta investigación. Aun así los perfiles moleculares resultaron similares, lo que puede deberse a que el factor ambiente juega un rol importante en la conformación de la microbiota en estos peces.

Las Proteobacterias son el phylum dominante en la microbiota intestinal de peces marinos tales como *O. mykiss* (Spanggard, 2000), *S. senegalensis* (Martin-Antonio *et al.*, 2007; Tapia-Paniagua *et al.*, 2010), *S. maximus* (Xing *et al.*, 2013); *S. salar* (Navarrete *et al.*, 2008). Esto sugiere que los microorganismos pertenecientes a este grupo bacteriano se encuentran muy bien adaptados a las condiciones del intestino de este grupo peces, o de su medio acuático circundante. La mayoría de peces carnívoros marinos presentan a las Proteobacterias como el principal phylum componente de la microbiota intestinal (Sullam *et al.*, 2012) y de acuerdo a Neulinger *et al.* (2008), y Rawls *et al.* (2004; 2006), este grupo parece cumplir un rol importante en la nutrición animal. Por lo que Smriga *et al.* (2010) indican que dicho grupo bacteriano podría contribuir al proceso digestivo, proporcionando

una variada cantidad de enzimas, tal como fue observado en *Paracanthurus hepatus*. Por tal motivo Aguilera *et al.* (2013), en sus experimentos de alimentación, observaron que una reducción de Proteobacterias de clase gamma en la microbiota intestinal podría ser causa de bajo crecimiento en cultivo de sistema cerrado en juveniles de *Seriola lalandi*. En esta investigación el phylum Proteobacteria se constituyó como el más abundante dentro de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla silvestre con un 46% de abundancia relativa.

Dentro de las Proteobacterias se pueden encontrar a géneros muy importantes como *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Psychrobacter*, que son los que más predominan como parte de la microbiota en peces de acuicultura marina (Tapia-Paniagua *et al.*, 2010), sin embargo, en esta investigación no se logró aislar *Vibrio* ni *Pseudomonas*, pero si se logró aislar e identificar a *Alcaligenes* (13%), *Marinobacter* (9%), *Psychrobacter* (9%), *Halomonas* (7%), *Paracoccus* (3%), *Proteus* (3%) y *Pseudoalteromonas* (1%) mediante método tradicional. No obstante la bibliografía señala que algunos géneros del phylum proteobacterias pueden contribuir a la mejora en la utilización de alimento y también a ayudar en el mejor desarrollo del metabolismo nutritivo de los peces como *Epinephelus coioides* y que su ausencia podría provocar a un descenso en el crecimiento (Sun *et al.*, 2009; 2011). Por otro lado *Psychrobacter* es un género que denota connotada presencia en el intestino de algunos peces de medio silvestre (Ringø *et al.*, 2006a, b; Sun *et al.*, 2009); presentando una vasta actividad enzimática incluyendo proteasa, amilasa, celulasa, fitasa y quitinasa (Askarian *et al.*, 2012), además se encuentra vinculada a efectos fisiológicos positivos relacionados con el crecimiento y la salud de los hospederos (Sun *et al.*, 2009; 2011). Sun *et al.* (2009), realizó un estudio de microbiota en *E. coioides* de crecimiento lento y rápido, encontraron que *Psychrobacter* fue el único género presente y predominante en peces de crecimiento rápido. Esto puede deberse a que su presencia en el gastrointestinal mejora el proceso de digestibilidad y la utilización de nutrientes que provienen de los alimentos (Yang *et al.*, 2011). MacFarlane & Cummings (1991), señalan que las bacterias que secretan proteasas logran contribuir en a la digestión enlace peptídico de las proteínas en monómeros y aminoácidos libres, influyendo beneficiosamente en el estado nutricional de los hospederos. Por otra parte Yang *et al.*, (2011), señalan que la administración de *Psychrobacter*. En la dieta de *E. coioides* puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas beneficiando así a la incorporación de bacterias potencialmente beneficiosas en el intestino. Casualmente, *Psychrobacter* es reportado en nuestra investigación con una abundancia relativa del 9% mediante método tradicional. Se podría asumir que la presencia del género *Psychrobacter* como parte de la microbiota intestinal del jurel cola amarilla silvestre podría ser utilizado como posible candidato de estudio como probiótico para los peces de la misma especie pero en cautiverio.

El phylum Actinobacteria ocupó el segundo lugar con un 39% de representatividad en el contenido intestinal de *Seriola lalandi* silvestre. Si bien, algunas Actinobacterias exhiben diversas propiedades fisiológicas y metabólicas, tales como la producción de enzimas extracelulares que tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, estas son poco utilizados como probióticos en acuicultura (Manivasagan *et al.*, 2013). Dentro de este phylum se identificaron a 9 géneros bacterianos obtenidos mediante método tradicional, de los cuales *Leucobacter* presentaba una abundancia del 20% a diferencia de otros géneros que no fueron tan abundantes como *Brachy bacterium* (4%), *Arthrobacter* (4%), *Dietzia*

(3%), *Agrococcus* (1%), *Kocuria* (1%), *Microbacterium* (1%), *Brevibacterium* (1%), *Knoellia* (1%), respectivamente .

En muchas investigaciones realizadas en peces provenientes de acuicultura el phylum Firmicutes ocupa el segundo lugar en términos de abundancia (Sugita *et al.*, 2002; Tapia-Paniagua *et al.*, 2010; Kim & Kim, 2013). Lo contrario sucede en peces de medio silvestre (Kim & Kim, 2013). La gran abundancia de Firmicutes en peces podría indicar que juegan un papel importante en la interacción con el hospedero. Sin embargo en este trabajo de investigación este phylum Firmicutes ocupó el tercer lugar en términos de abundancia como parte de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvestre, obteniéndose un 14% de abundancia relativa.

Entre los géneros más representativos para Firmicutes se pueden encontrar a *Bacillus* y *Staphylococcus* (Kim & Kim, 2013). En nuestra investigación de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* silvestre utilizando método tradicional se encontraron a *Staphylococcus* (7%), *Bacillus* (6%) y *Planomicrobium* (1%) como los géneros pertenecientes al phylum Firmicutes.

El género *Bacillus* es frecuentemente aislado de la microbiota intestinal en muchas especies marinas (Hovda *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010). Al género *Bacillus*, se le atribuye diversas funciones en los hospederos, porque producen enzimas hidrolíticas (Ray *et al.*, 2012). Y en algunos casos *Bacillus* fue utilizado como probióticos, ya que sus exoenzimas liberadas permitirían mejorar la digestibilidad de los nutrientes y así contribuir en el crecimiento de los peces (Ye *et al.*, 2011). En referencia esto Cha *et al.* (2013), indican que las cepas de *B. sppy B. subtilis* logran mejorar el crecimiento (en peso) de *Oreochromis niloticus* (Aly *et al.*, 2008) y *Acipenser nudiiventris* (Jafaryan *et al.*, 2008). Además, de que estas bacterias generan diferentes propiedades beneficiosas en el hospedero como el aumento en la actividad del estallido respiratorio en *Labeo rohita* (Kumar *et al.*, 2008) y mejora la actividad de la lisozima en *Cyprinus carpio* (Wang *et al.*, 2010) y *O. mykiss* (Merrifield *et al.*, 2010a, b).

La presencia de *Staphylococcus* presenta una amplia actividad enzimática (proteasa, amilasa celulasa, fitasa), logrando desempeñar un vasto rol en los hospederos (Ringø *et al.*, 1995; Askarian *et al.*, 2012). En una investigación Spanggaard *et al.* (2000) observaron que la microbiota intestinal de trucha arco iris se constituía por el mismo grupo de bacterias presentes en su sistema de cultivo (agua y alimento). De acuerdo a lo anterior, la influencia del ambiente sobre la composición de la microbiota intestinal es un tema por resolver, ya que el efecto de éste podría ser mayor o menor según la etapa de desarrollo del pez, incluida la maduración de su sistema digestivo e inmune.

Diversos estudios se ha observado que las bacterias probióticas aisladas de un determinado hospedador o de su ambiente son mucho más beneficiosas que las bacterias aisladas de otras fuentes (Mills *et al.*, 2011). Lo anterior se debe en gran parte a que existe una especificidad en la colonización por parte del complejo cepa-huesped o viceversa (Ying *et al.*, 2007). Entonces la mayor diversidad de la microbiota y la presencia de bacterias potencialmente beneficiosas en peces silvestres, puede atribuirse a diversos factores, siendo preponderante la alimentación natural. Sin embargo, es importante tener en cuenta el efecto

del hábitat del hospedero y analizarlo como un conjunto (ambiente) y no individualmente a través de las partes que lo componen (temperatura, salinidad, sedimentos, entre otros).

La aparición de las levaduras en el intestino de los peces es variable y puede fluctuar de niveles no detectables a 10^7 UFC/g del contenido intestinal (Gatesoupe, 2006). Dentro de estas levaduras tenemos al género *Debaryomyces*, pertenecientes al phylum Ascomycota, que probablemente dominan en el intestino de algunos peces marinos tales como: *Tachurus symmetricus* y *Atherinopsis affinis littoralis* (Gadanho & Sampaio, 2005), y en estas especies de peces, la concentración de levadura es mayor en el interior del pez que en el agua de mar circundante, lo que sugiere que la levadura puede crecer dentro del intestino de pez. Tal es el caso que el género *Debaryomyces* se ha aislado con frecuencia como la levadura dominante en el intestino de trucha arco iris (Gatesoupe, 2006). Por otro lado estas levaduras presentan mecanismos de control biológico, basándose en la competencia de espacio y nutrientes (Chang-Goyal & Spotts, 1996), producción de enzimas hidrolíticas, e inducción a la resistencia del hospedero (Droby *et al.*, 2002). También presentan actividad enzimática de la inulinasa, quitinasa, superóxido dismutasa (SOD) (García-González *et al.*, 2009), lipasa (Takac & Sengel, 2010) y α galactosidasa (Viana *et al.*, 2009). Además, *Debaryomyces* presenta la capacidad para sintetizar α -galactosidasa en el tratamiento de los productos de soja para reducir oligosacáridos rafinosa (Viana *et al.*, 2007), que son reconocidos como factores anti-nutricionales para los mamíferos y peces. Curiosamente, este género se ha propuesto como un agente terapéutico anti-inflamatorio en modelos animales (ratas Wistar) (García-González *et al.*, 2009). En esta investigación, mediante método tradicional *Debaryomyces* es el único género que se reporta dentro de los quince aislados del contenido intestinal de jurel cola amarilla de tipo silvestre (Anexo 3). Inclusive los perfiles RFLP de ITS de estos aislados son similares entre ellos (Figura 4), lo que nos indica que este género representa el 100% de abundancia de esta levadura como parte de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* silvestre y que según las características descritas por los autores, este género podría ser utilizada como futuro probiótico con el fin de mejorar las condiciones de crecimiento y salud en peces de acuicultura.

De los resultados obtenidos cabe señalar que los medios de cultivo (TSA y YEPD) utilizados para estudiar la microbiota intestinal de los peces son adecuados para recuperar bacterias y levaduras intestinales dominantes en peces *Seriola lalandi* silvestre, pero que al utilizar estos métodos tradicionales de cultivo se ocupa mucho tiempo de trabajo, además se requiere plaqueo inmediato de las muestras recogidas; sin embargo mediante este método se obtiene la capacidad de obtener géneros microbianos dominantes mediante cultivo proporcionando una buena oportunidad para comparar los perfiles de ADN de bacterias o levaduras aisladas con los perfiles totales obtenidos directamente de las muestras de contenido intestinal mediante método molecular. Además cabe mencionar que mediante cultivo en placas se lograron obtener nueve géneros bacterianos dentro del phylum Actinobacterias, a diferencia del phylum Proteobacterias que solo presentó seis géneros bacterianos.

En la presente investigación, los perfiles RFLP de 16SrRNA de los aislados mediante método tradicional se compararon con los perfiles RFLP de 16SrRNA totales obtenidos mediante método molecular independiente de cultivo, encontrándose en términos de abundancia a *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y *Proteus* (Figura 6 y 7) para los

perfiles totales mediante método molecular a diferencia de *Leucobacter*, *Alcaligenes*, *Psychrobacter*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Figura 3) para los perfiles de los aislados mediante método tradicional. Sin embargo no se lograron obtener perfiles RFLP de ITS totales para levaduras, ya que las bandas presentadas en el PCR de ITS fueron muy débiles (Anexo 4), inclusive no todas las muestras evidencian dichas bandas a excepción de sl3, sl4, sl6 y sl7. En consecuencia a este resultado se cuantificaron dichas muestras utilizando qPCR (Cuadro 1), encontrándose un promedio de 5×10^3 levaduras por gramo, que fueron detectadas solo en los perfiles donde se observaron las bandas tenues.

Los métodos moleculares utilizados en este estudio se basaron en la amplificación de los genes usando marcadores PCR 16SrRNA o ITS, lográndose identificar poblaciones microbianas dominantes. El método de PCR-RFLP no es cuantitativo, aunque existen estudios indicando que la intensidad la banda en el perfil RFLP puede corresponder a la abundancia relativa de bacterias o levaduras en el ecosistema, pudiéndose ser amplificados con la misma eficiencia (Magne *et al.*, 2006); (Calvo-Bado *et al.*, 2003). En nuestra investigación, la abundancia microbiana basada en intensidad de bandas fue diferente entre los perfiles RFLP de 16SrRNA pero similar para los perfiles RFLP de ITS con respecto al método tradicional, por otro lado con el método molecular la intensidad de las bandas fue totalmente diferente ya que para las levaduras los perfiles RFLP de ITS totales no se evidenciaron, mientras que para bacterias los perfiles RFLP de 16SrRNA variaron observándose abundancia bacteriana en los carriles sl1, sl3, sl5, sl7 y sl8.

En general, en este estudio se sugiere utilizar otras enzimas de restricción para lograr obtener perfiles específicos para los géneros *Staphylococcus* y *Halomonas*. Además realizar comparaciones del análisis de la microbiota intestinal en *Seriola lalandi*, tanto en peces de medio silvestre como de acuicultura pero de la misma edad y temporada estacional. También sería necesario utilizar otros tipos de genes como *rpoB*, que puede ser un marcador molecular de gran alcance, ya que su estado de copia única conduce a perfiles de bandas individuales. . Inclusive sería necesario emplear otros métodos moleculares como el PCR a tiempo real para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN.

CONCLUSIONES

- La estrategia de cultivo tradicional logró describir la composición microbiana de *Seriola lalandi*, de origen silvestre, identificando a phylum proteobacterias como el principal componente bacteriano de la microbiota de *Seriola*, destacando la presencia de los géneros bacterianos *Leucobacter*, *Alcaligenes*, *Psychrobacter*, *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y de la levadura *Debaryomyces*.
- Los métodos tradicionales de cultivo lograron describir al phylum Actinobacteria como el phylum con mayor diversidad en géneros bacterianos, como componentes de la microbiota intestinal de *Seriola lalandi* silvestre.
- Los géneros *Marinobacter*, *Halomonas*, *Staphylococcus* y *Proteus* identificados por métodos tradicionales de cultivo, se confirman en los perfiles de la microbiota derivados de métodos moleculares.
- El género *Marinobacter* presentó el 50% de abundancia relativa mediante método molecular a comparación del método tradicional que este género sólo obtuvo el 7% de abundancia relativa.

LITERATURA CITADA

- Aguilera, E., G. Yany & J. Romero. 2013. Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* vol.41, n.3.
- Al-Harbi A.H., Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250(3-4):566-572.
- Aly S., Ahmed Y., Ghareeb A. & Mohamed M., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 128–136.
- Amman R., Ludwig W. & Schleifer K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.*, 59: 143–169.
- Asfie, M., Yoshijima, T. & Sugita, H., 2003. Characterization of the goldfish faecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. *Fish. Sci.* 69, 21–26.
- Askarian F., Zhou Z., Olsen R., Sperstad S. & Ringø E. 2012. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterisation by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*, 326-329: 1–8.
- Austin B & Alzahrani AMJ. 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow-trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 33: 1–14.
- Bevins C. & Salzman N. 2011. The potter's wheel: The host's role in sculpting its microbiota. *Cell Mol Life Sci.*, 68(22): 3675–3685.
- Bianchi, G., KE Carpenter, JP Roux, FJ Molloy, D. Boyer & HJ Boyer. 1999. Guía de identificación de especies de la FAO para los propósitos de la pesca. Guía de campo de los recursos marinos vivos de Namibia. FAO, Roma. 265p.
- Brunvold L, Sandaa RA, Mikkelsen H, Welde E, Bleie H & Bergh O. 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively reared cod (*Gadus morhua*) using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272: 319–327.
- Calvo-Bado LA, Pettitt TR, Parsons N, Petch GM, Morgan JAW & Whipps JM. 2003. Spatial and temporal analysis of the microbial community in slow sand filters used for treating horticultural irrigation water. *Appl Environ Microb* 69: 2116–2125. 45.
- Cantas L., Fraser T., Fjelldal P., Mayer I. & Sørum H. 2011. The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) a comparison of composition and drug resistance. *Veterinary Research*, 7:71.
- Carvalho, C. M.; Rocha, A.; Estevinho M., L., F.; A. Choupina. 2005. Identification of honey yeast species base don RFLP analysis of the ITS región. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*. Diciembre, año/vol. 5. Número 001. Sociedad Mexicana de nutrición y Tecnologia de alimentos. Reynosa, Mexico. 11-17pp.
- Cha J., Rahimnejad S. Yang S., Kim K. y Lee K. 2013. Evaluations of *Bacillus* spp. as Dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture*, 402–403: 50–57.

- Chapin K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Cole J., Chai B., Farris R., Wang Q., Kulam-Syed-Mohideen A., McGarrell D., Bandela A., Cardenas E., Garrity G. y Tiedje J. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.*, 35: D169–D172.
- Dhanasiri, A. K. S., Brunvold, L., Brinchmann, M. F., Korsnes, K., Bergh, Ø., Kiron, V. 2011. Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. *Microbial ecology* 61(1), 20-30.
- Drancourt M, C. Bollet, A. Carlouz, R. Martelin, JP Gayral, & D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol.*38:3623-3630.
- Dyer, BS & MW Westneat. 2010. Taxonomía y biogeografía de los peces costeros del Archipiélago Juan Fernández y las islas Desventuradas, Chile. *Rev. Biol. Marzo Oceanogr*, 45: 589-617.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO, Roma, 253 pp.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. FAO, Roma, 231 p
- FishBase. 2016. Froese, R & D., Pauly Editores. La World Wide Web publicación electrónica. www.fishbase.org.
- Fishstat. 2015. Fisheries and Aquaculture Department, FishStatj-software for fishery statistical time series.
- Frank, A., Reich, C., Sharma, S., Weisbaum, J., Wilson, B., Olsen, G. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8), 2461-2470.
- Gadanhó M, Sampaio JP. 2005. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. *FEMS Yeast Res* 5:253–261 46.
- Gatesoupe F. 2006. Probiotics and prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua Feeds: Formulation Beyond*, 2(3): 3-5.
- González N, Romero J & Espejo RT. 2003. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S–23S rRNA spacer region. *J Microbiol Meth* 55: 91–97.
- González, J., Saiz, C. 2005. Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International Microbiology*, 8:189-194.
- Gordon JI. 2005. A genomic view of our symbiosis with members of the gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40(Suppl 1):S28 12.
- Griffiths S, Melville K, Cook M, Vincent S, Pierre M & Lanteigne C. 2001. Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Aquat Anim Health* 13: 355–363.
- Guamán C. & Carvajal J. 2009. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum*, Vol 14, No 2-3.

- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall T. A. 2011. Bioedit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences.* 2 (1): 60 - 61.
- Hansen GH & Olafsen JA. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb Ecol* 38: 1–26.
- Heras-Vásquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente Jimenez, J. M., Rodriguez-Vico, F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* 3: 3-9.
- Holben WE, Williams P, Gilbert MA, Saarinen M, Sarkilahti LK, Apajalahti JH. 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel Mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon. *Microb Ecol* 44:175–185.
- Hovda M.B., Lunestad, B.T., Sivertsvik, M., Rosnes, J.T. 2007. Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR–DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 68–75. 47.
- Huber I, Spanggaard B., Appel K., Rossen L., Nielsen T. y Gram L. 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.*, 96: 117-132.
- Jafaryan H., Asadi R. y Bagheri A. 2008. The promotion of growth parameters and feeding efficiency of *Acipenser nudiventris* larvae by using of probiotic *Bacillus* via bioencapsulation of *Artemia urmiana*. Resource management, natural, human and material resources for the sustainable development of aquaculture. Aquacult, Europe.
- Jensen S., Øvrea's L., Bergh Ø. y Torsvik V. 2004. Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with larvae of the Atlantic halibut propose succession from a uniform normal flora. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 728–736.
- Jensen, S., Bergh, Ø, Enger, Ø. Hjeltnes, B. 2002. Use of PCR-RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Can. J. Microbiol.* 48, 379–386.
- Kersarcodi-Watson, A., Heinrich, K., Lategan, M., Gibson, L. 2007. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1- 14.
- Kim D. y Kim D. 2013. Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.06.008
- Kim, D., Brunt, J., Austin, B. 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology* 102(6), 1654-64.
- Kumar R., Mukherjee S., Ranjan R., Nayak S. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 168–172.
- MacFarlane & Cummings J. 1991. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function. In: *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease.* S.F. Phillips, J.H. Pemberton and R.G. Shorter, eds. Raven Press Ltd., New York. p 51-92.
- Magne F, Abely M, Boyer F, Morville P, Pochart P & Suau A. 2006. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by

- sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 128–138.
- Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K y Kim S. 2013. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol Res.*, 168 (6): 311-32.
- Martin-Antonio B., Manchado M., Infante C., Zerolo R., Labella A., Alonso C y Borrego J. 2007. Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research*, 38: 1213 – 1222.
- Merrifield D., Burnard D., Bradley G., Davies S., Baker R. 2009. Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 40:1064-1072.
- Merrifield D., Dimitroglou A., Foey A., Davies S., Baker R., Bogwald J., Castex M. y Ringø E. 2010a. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1–18.
- Merrifield D., Harper G., Dimitroglou A., Ringø E y Davies S. 2010b. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, 41: 1268-1272.
- Mills S., Stanton C., Fitzgerald G. y Ross P. 2011. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microbial Cell Factories*, 10(1): 1-19.
- Moreno C, Romero J & Espejo RT. 2002. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* 148: 1233–1239.
- Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Muyzer G, Dewaal EC & Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Appl Environ Microb* 59: 695–700.
- Nakada, M. 2008. Capture-based aquaculture of yellowtail. In A. Lovatelli; P.F. Holthus (eds). *Capture-based aquaculture. Global overview*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 508. Rome, FAO. pp. 199–215.
- Navarrete P., Espejo R y Romero J. 2009. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Microb Ecol.*, 57: 550–561.
- Navarrete P., Magne F., Araneda C., Fuentes P., Barros L., Opazo R., Espejo R. y Romero J. 2012. PCR-TTGE analysis of 16SrRNA from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut Microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS ONE* 7(2): e31335.
- Navarrete P., Magne F., Mardones P., Riveros M., Opazo R., Suau A., Pochart P. y Romero J. 2010. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1): 148-156.
- Nayak, S.K. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquacult. Res.*, 41: 1553-1573.
- Neulinger S., Järnegren J., Ludvingsen M., Lochte K. y Düllo W. 2008. Phenotype-specific bacterial communities in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and their implications for the coral's nutrition, health and distribution. *Appl. Environ. Microb*, 74: 7272-7285.

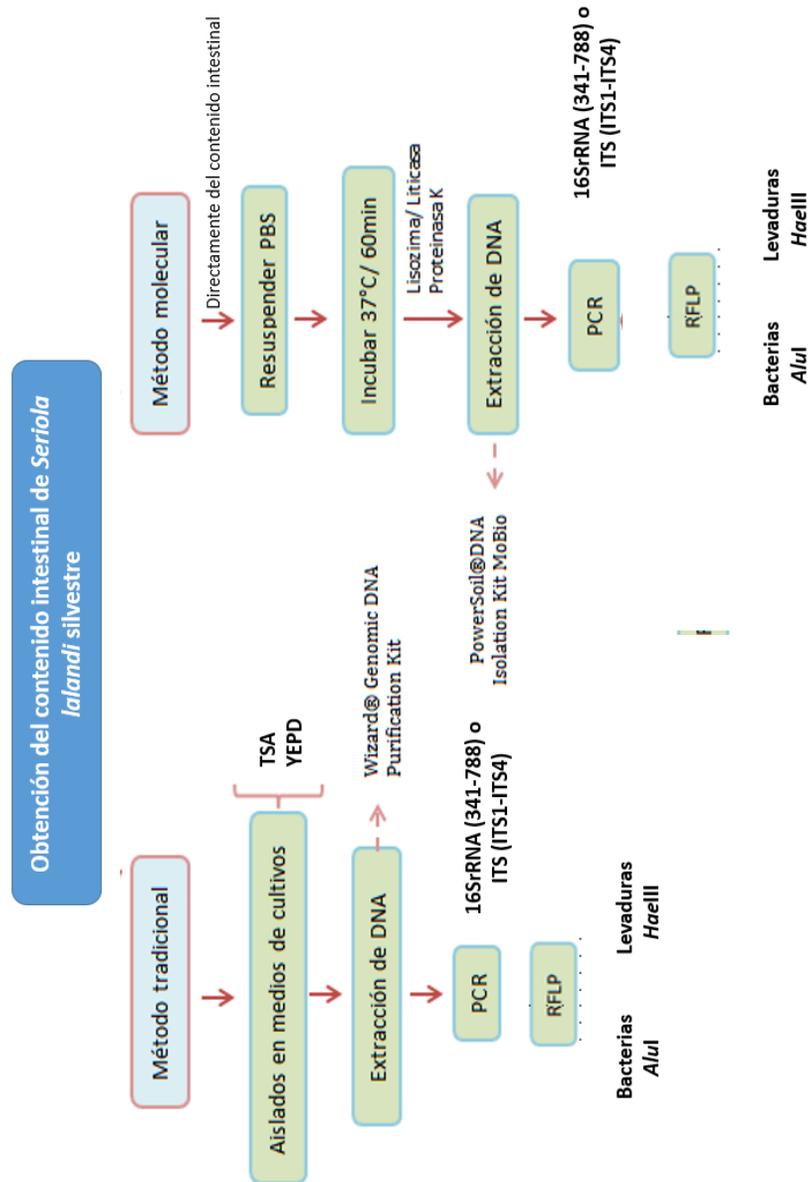
- Nugroho, E., DJ Ferrell, P. Smith & N. Taniguchi. 2001. Divergencia genética del pez rey de Japón, Australia y Nueva Zelanda inferido por el ADN de microsatélites y marcadores de la región de control del ADN mitocondrial. *Pescado. Sci.*, 67: 843 a 850.
- Ochoa, J. L; R., Vásquez-Juárez. 2004. Las levaduras como herramientas científicas y biotecnológica. *Universidad y Ciencia*, vol. Num. Esp., núm. I, 2004, pp. 39-50. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, México.
- Pond M., Stone D. y Alderman D. 2006. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261: 194–203.
- Rantsiou K., Dolci P. & L. Cocolin. 2010. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy plant. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S156-S162.
- Ratón, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Microbiología*; 21: 15 – 19.
- Rawls J., Mahowald M., Ley R. y Gordon J. 2006. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, 127(2): 423-33.
- Rawls J., Samuel B. y Gordon J. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 4596–4601.
- Ray A., Ghosh K. y Ringø E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 5: 465–492.
- Ringø E., Sperstad S., Myklebust R., Mayhew T. y Olsen R. 2006a. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquacul Res.*, 37: 891-897.
- Ringø E., Sperstad S., Myklebust R., Refstie S. y Krogdahl Å. 2006b. Characterisation of the microbiota associated with the intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 481 261, 829-84.
- Ringø E., Strom E. y Tabachek J. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26: 773-789.
- Roeselers G., Mittge E., Stephens W., Parichy D., Cavanaugh C., Guillemin K. y Rawls J. 2011. Evidence for a core microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 5: 1595–1608.
- Romero J, Garcia-Varela M, Lacleste JP, Espejo RT. 2002. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). *Microb Ecol* 44:365–371.
- Romero J, Navarrete P. 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb Ecol* 51:422–430
- Romero J. y Navarrete P. 2012. Marine Vertebrate Animal Metagenomics, Salmonidae: The microbiota of the digestive tract of salmonids. <http://www.springerreference.com/index/chapterdbid/303261>.
- Rosa, C.; P., Gábor. 2006. Biodiversity and Ecophysiology of yeasts. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in Germany. 578p.

- Sakata, T.; M. Nakaji; D., Kakimoto. 1978. microflora en el tracto digestivo de los peces marinos I: Caracterización general de los aislamientos de cola amarilla. Mem. Fac. Pescado. Kagoshima Univ., 27: 65 -71.
- Smriga S., Sandin S. y Azam F. 2010. Abundance, diversity, and activity of microbial assemblages associated with coral reef fish guts and feces. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1): 31-42.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielson, J., Nielson, T., Appel, K.F., Gram, L., 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182, 1–15.
- Spor, A., Koren, O., Ley, R. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 9 (4), 279-290.
- Sugita H., Kurosaki M., Okamura T., Yamamoto S. y Tsuchiya C. 2005. The culturability of intestinal bacteria of Japanese coastal fish. 2005. *Fisheries Science*, 71: 956–958.
- Sugita H., Okano R., Suzuki Y., Iwai D., Mizukami M., Akiyama N. y Matsuura S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish Sci.*, 68: 1004-1011.
- Sullam K., Essinger S., Lozupone C., O’connor M., Rosen G., Knight R., Kilham S. y Russell J. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*, 21: 3363–3378.
- Sun Y., H. Yang, Z. Ling, J. Chang y Ye J. 2009. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(11): 713-720.
- Sun Y., Yang H., Ma R. y Lin W. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5): 803-809.
- Sun Y., Yang H., Ma R., Zhang C. y Lin W. 2011. Effect of dietary administration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*, 17(3): 733-740.
- Tapia-Paniagua S., Chabrillón M., Díaz-Rosales P., García de la Banda I., Lobo C., Balebona M. y Moriñigo M. 2010. Intestinal Microbiota Diversity of the Flat Fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) Following Probiotic Administration. *Microb Ecol.*, 60: 310–319
- Tapia-Rusell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M., Larqué-Saavedra, A., Perez-Brito, D. 2006. A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* **33**: 67-70.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana, 959.
- Tsuchiya C., Sakata T. y Sugita H. 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1): 43–48.
- Turnbaugh P. y Gordon J. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol.*, 587 (17): 4153–4158.
- Uchii K., Matsui K., Yonekura R., Tani K., Kenzaka T., Nasu M. y Kawabata Z., 2006. Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of

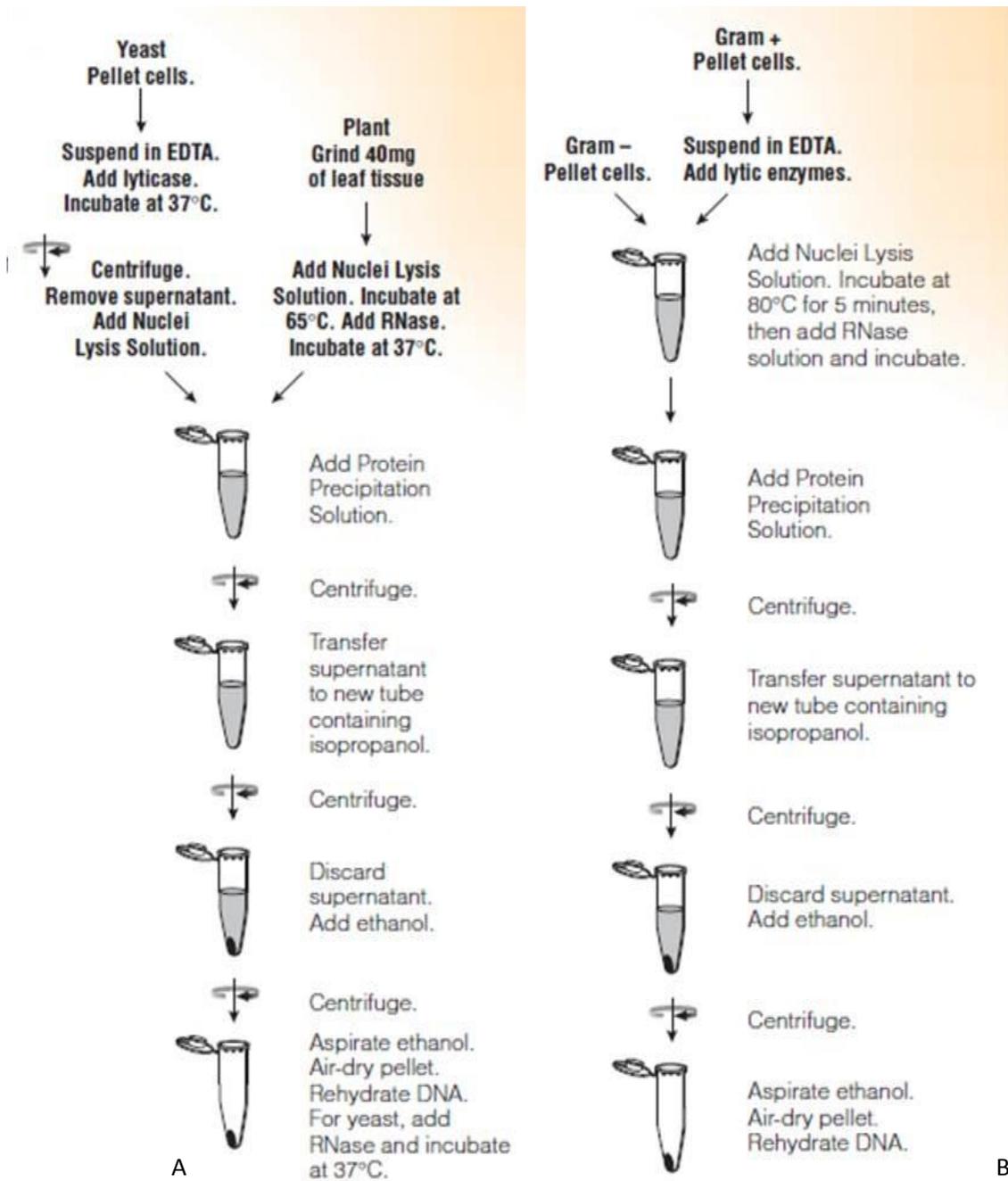
- bluegill (*Lepomis macrochirus*) with three different feeding habits. *Microb Ecol.*, 51: 277–283.
- Vaughan, E., Schut, F., Heilig, H., Zoetendal, E., De Vos, W., Akkermans, A. 2000. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1:1-12.
- Verner-Jeffreys D., Shields R., Bricknell I. y Birkbeck T. 2003. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture*, 219: 21-42.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. y Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biol Rev.*, 64: 655-671.
- Wang G., Liu Y., Li F., Gao H., Lei Y. y Liu X. 2010. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 29: 278–287.
- Wang Q., Garrity G., Tiedje J. y Cole J. 2007. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5261-5267.
- Xing M., Hou Z., Yuan J., Liu Y., Qu Y. y Liu B. 2013. Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3): 432–43.
- Yang H., Sun Y., Ma R., Li J. y Huang K. 2011. Probiotic *Psychrobacter* sp. improved the autochthonous microbial diversity along the gastrointestinal tract of grouper *Epinephelus coioides*. *J Aquac Res Development*, S1:001.
- Ye J., Wang K., Li F. y Sun Y. 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac Nutr.*, 17: 902-911.
- Ying, C., Lei, W., Jiazhong, L., Zhantao, S., Ligu, A. 2007. Identification and purification of a novel adhesion-associated protein in a new strain of *Lactobacillus*, L15, from flounder *Paralichthys olivaceus*. *Veterinary Microbiology* 122(1), 116-122.

ANEXOS

Anexo 1. Procesamiento de las muestras de contenido intestinal según las estrategias de trabajo en paralelo: método tradicional y método molecular de identificación del “juel cola amarilla” (*Seriola lalandi*) de medio silvestre.



Anexo 2. Protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit



a) Para purificación de levaduras.

b) Para purificación de bacterias.

Anexo 3. Descripción de los microorganismos identificados en el contenido intestinal de *Seriola lalandi* de medio silvetsre.

	Phylum	Género	Gen utilizado	% identificación	N° de aislados
Bacterias	Actinobacteria	<i>Agrococcus</i>	16SrRNA	100	1
		<i>Arthrobacter</i>	16SrRNA	100	3
		<i>Brachybacterium</i>	16SrRNA	100	3
		<i>Brevibacterium</i>	16SrRNA	99	1
		<i>Dietzia</i>	16SrRNA	100	2
		<i>Knoellia</i>	16SrRNA	100	1
		<i>Leucobacter</i>	16SrRNA	100	14
		<i>Kocuria</i>	16SrRNA	100	1
		<i>Microbacterium</i>	16SrRNA	100	1
	Bacteroidetes	<i>Myroides</i>	16SrRNA	100	1
	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	16SrRNA	100	4
		<i>Planomicrobium</i>	16SrRNA	100	1
		<i>Staphylococcus</i>	16SrRNA	100	5
	Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	16SrRNA	100	9
		<i>Halomonas</i>	16SrRNA	100	5
		<i>Marinobacter</i>	16SrRNA	100	6
<i>Proteus</i>		16SrRNA	100	1	
<i>Pseudoalteromona</i>		16SrRNA	100	1	
	<i>Psychrobacter</i>	16SrRNA	100	6	
Levaduras	Ascomycota	<i>Debaryomyces</i>	ITS	100	15

Anexo 4. PCR -ITS para levaduras provenientes del contenido intestinal directo de *Seriola lalandi* de medio silvestre.

