

Análisis *in silico* de la bioseguridad de una cepa de *Priestia* sp. aislada de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y su potencial uso como probiótico en acuicultura

Carla CUERVO¹

¹ Bacteriología y laboratorio clínico, Facultad de ciencias de la salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia

*Correspondencia: ccuervov@unicolmayor.edu.co

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0497-5679>

Resumen

Los probióticos son empleados cada vez más en acuicultura debido a que influyen positivamente en el crecimiento de los peces, además de mejorar sus actividades metabólicas e influir en el control de patógenos. Sin embargo, para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe estar libre de factores de virulencia, en el caso de cepas de *Bacillus*, se espera que estén libres de enterotoxinas (*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK* y *entFM*) y cereulida sintasa (*ces*), además de carecer de genes que puedan conferir resistencia antibiótica. Por lo tanto, se evaluó la bioseguridad de una cepa de *Priestia megaterium* M4, mediante la secuenciación del genoma completo, posteriormente se realizó la anotación en la base de datos de factores de virulencia (VFDB) y ResFinder. En el presente estudio no se identificaron genes asociados a virulencia ni la presencia de genes de resistencia antibiótica adquiridos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se considera que la cepa de *Priestia megaterium* M4 es una posible candidata para emplearse como probiótico en el cultivo de tilapia nilótica.

Abstract

Probiotics are increasingly used in aquaculture because they positively influence fish growth, improve their metabolic activities and influence the control of pathogens. However, a microorganism must be free of pathogenic factors to be recognized as a probiotic. In the case of *Bacillus* strains, enterotoxins (*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK* y *entFM*) and cereulide synthase (*ces*), in addition to antibiotic resistance genes must be absent. The objective of the present study was to evaluate the biosafety of a *Bacillus megaterium* M4 strain by sequencing the complete genome, followed by annotation in the virulence factor database (VFDB) and ResFinder. In the current study, virulence-associated genes and resistance-acquired genes were not identified neither of them affected the biosafety of the strain, nor were any of the genes associated with antibiotic resistance. Considering the results obtained, the *Priestia megaterium* M4 strain is considered a possible candidate for use as a probiotic for Nile tilapia culture.

Palabras clave: *Priestia megaterium*, probiótico, bioseguridad, factores de virulencia, resistencia antibiótica

Key words: *Priestia megaterium*, probiotic, biosecurity, virulence factors, antibiotic resistance

1. Introducción

Actualmente la demanda de alimentos se ha convertido en un tema relevante a nivel mundial principalmente por el continuo crecimiento de la población, la cual se estima que para el año 2050 tenga un aumento de casi 9700 millones de personas (FAO, 2018),

esta situación sumada a la limitación en el acceso de los recursos básicos ha generado un gran interés en el desarrollo de métodos de cultivo más eficaces y rentables.

Uno de los métodos de producción de proteína de alta calidad, que ha logrado posicionarse es la acuicultura, se estima que la producción mundial de pescado alcanzó alrededor de 179 millones de toneladas en 2018, con un valor total de primera venta estimado en USD 401 mil millones, de los cuales 82 millones de toneladas, valoradas en USD 250 mil millones, provinieron de producción acuícola. (FAO, 2020).

Sin embargo, uno de los retos que afronta este sector es la presencia de patógenos que son usualmente controlados mediante la administración de antibióticos (Zhou et al., 2020). Tras su aplicación se ha evidenciado que reducen significativamente la abundancia y diversidad del microbiota intestinal en varias especies de peces, independientemente de los métodos de exposición, dosis y tiempo. (Limbu et al., 2021). Además de que reducen la actividad antagónica de la microbiota contra los microorganismos patógenos (Panghal et al., 2017). Otra de sus desventajas es que representa un problema de salud pública, ya existe una relación directa entre el uso de antibióticos en alimentos y la aparición de resistencia antibiótica en patógenos humanos y animales tras su uso terapéutico y profiláctico (Aly y Albutti, 2014; Reverter et al., 2020).

Como alternativa al uso de antibióticos, surge la práctica de la aplicación de probióticos con el fin de limitar los efectos secundarios, mejorar el rendimiento productivo, impulsar la producción de pescado y proteger la salud humana (Lara, 2012).

Usualmente los probióticos son aislados de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) nativa de los peces, e incluyen bacterias, levaduras y hongos filamentosos, además pueden aplicarse individualmente, en mezclas o consorcios. (Melo-Bolívar et al., 2020). El género *Bacillus* es uno de los grupos bacterianos que ha estado en controversia debido a que se asocia con intoxicaciones alimentarias (Dietrich et al., 2021), sin embargo, tras la caracterización de algunas cepas se han posicionado como opción viable, debido a que pueden sobrevivir a la acidez presente en el estómago, tolerar las sales biliares y otras condiciones hostiles del TGI. Además de que resultan ser más estables durante el procesamiento y almacenamiento de preparaciones alimentarias y farmacéuticas gracias a su presentación en esporas (Elshagabee et al., 2017).

Los probióticos fueron definidos según la OMS (2002) como "microorganismos vivos que, tras la ingestión en concentraciones suficientes, pueden ejercer beneficios para la salud del hospedero", sin embargo, autores como Zorriehzakra et al. (2016) incluyen microorganismos inactivados y definen un probiótico como "un microorganismo vivo, muerto o un componente de la bacteria que actúa bajo diferentes modos de acción, confiriendo efectos beneficiosos al hospedero o su entorno". Los probióticos tienen diferentes modos de acción, por ejemplo, en un estudio, tras la administración de *Bacillus subtilis* a camarones se pudo determinar que influyó en el crecimiento y la modulación de la respuesta inmunitaria a través de la actividad fagocítica, (Kewcharoen y Srisapoom, 2019) también pueden aumentar la actividad de enzimas como proteasa y amilasa en el tratamiento con *Bacillus megaterium* (actualmente denominado como *Priestia megaterium*) suministrado a bagres. (Afrilasari et al., 2017).

La inclusión dietética de diferentes especies de *Bacillus* en un modelo en tilapia nilótica también influyó en la tasa de conversión alimenticia, mejoró los índices de producción de óxido nítrico, inmunoglobulina M, lisozima y fosfatasas, además de favorecer la protección contra patógenos como *Streptococcus agalactiae* (El-Haroun et al., 2006; Kuebutornye et al., 2020), *Aeromonas hydrophila* (Mukherjee et al., 2019; Cavalcante et al., 2020) y *Vibrio cholerae* (XinHai et al., 2021).

B. megaterium renombrada como *Priestia megaterium* luego de un análisis filogenético (Gupta et al., 2020) es una bacteria Gram-positiva en forma de bastón utilizada principalmente a nivel industrial por la producción de enzimas como α - y β -amilasas, penicilina G acilasa, xilanasas, hidrolasas, glicosiltransferasas, citocromo monooxigenasas, además de su gran relevancia en la producción de vitamina B12 es considerada como no patógena (Godard et al., 2020).

Para que un microorganismo pueda ser considerado seguro para su uso como probiótico debe cumplir con una serie de requisitos sujetos a las regulaciones contenidas en la ley alimentaria general para su comercialización con destino humano o animal. Según lo establecido por la OMS/FAO el microorganismo debe ser considerado como GRAS (Generalmente reconocido como seguro) (Celandroni et al., 2019). En Europa, la EFSA introdujo el término de presunción cualificada de seguridad (QPS). El concepto de QPS implica algunos criterios adicionales de evaluación de la seguridad de los suplementos bacterianos, incluido el historial de uso seguro y la ausencia de resistencia adquirida a

los antibióticos, además del análisis de genes que codifiquen factores de virulencia, en el caso de cepas de *Bacillus* se debe investigar la presencia de enterotoxinas (*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK* y *entFM*) y cereulida sintasa (*ces*). (EFSA, 2018).

No obstante, se han presentado irregularidades en el cumplimiento de estas disposiciones lo cual afecta directamente la bioseguridad de los probióticos y puede influir en la salud de los diferentes usuarios, en varios estudios se ha determinado la presencia de estas enterotoxinas e incluso de genes de resistencia que pueden ser transferidos. (Noor et al., 2015; Zhu et al.; 2016; Cui et al., 2020; Deng et al., 2021)

Por medio del presente estudio se evaluó la bioseguridad de la cepa *Priestia megaterium* M4 aislada del tracto gastrointestinal de *O. niloticus* mediante un análisis *in silico* que determino la presencia de genes de resistencia y factores de virulencia, con el fin de determinar su posible uso como probiótico en acuicultura.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención del genoma

El genoma de *Priestia megaterium* M4, fue obtenido de un microorganismo aislado de cultivo continuo de Exclusión Competitiva (CFCEC, por sus siglas en inglés) establecido por (Melo-Bolívar et al. (2019), a partir de contenido intestinal de alevinos de Tilapia del Nilo (*O. niloticus*).

2.2 Secuenciación del genoma

El genoma de *Priestia megaterium* M4 fue enviado a los Servicios Forenses y Científicos, Queensland Health, Australia, para la extracción de ADN, la preparación de la biblioteca y la secuenciación del genoma completo. El ADN genómico bacteriano se extrajo utilizando el DSP DNA Mini Kit (Qiagen, Victoria, Australia). Se utilizó el Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, Victoria, Australia) para preparar la biblioteca de secuenciación, a la que siguió la secuenciación en el NextSeq 500 (Illumina) utilizando el kit NextSeq 500 Mid Output v2 (Illumina).

2.3. Ensamblaje del genoma

El ensamblaje del genoma se realizó siguiendo los siguientes pasos: evaluación de la calidad de los reads, limpieza de los reads con baja calidad, ensamblaje, calidad del ensamblaje y formación de scaffolds a partir de contigs. La verificación de la calidad de los reads se realizó por medio del programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Trimmomatic (Bolger et al., 2014) fue seleccionado para realizar la limpieza de reads que mostraron baja calidad. Luego, el ensamblaje de los reads se ejecutó por medio del pipeline de Shovill (<https://github.com/tseemann/shovill>) usando el ensamblador SPAdes (Prjibelski et al., 2020). Seguido, la evaluación de la calidad del ensamblaje fue verificada por medio de Quast. Finalmente, Medusa (Bosi et al., 2015) fue utilizado para la formación de scaffolds a partir de los contigs generados por Shovill.

2.4 Anotación del genoma

Con el fin de determinar la presencia de genes asociados a factores de virulencia, se realizó la anotación del genoma en la base de datos de factores de virulencia VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>), mediante su herramienta VFalyzer, en la cual se comparó el genoma de *P. megaterium* M4, frente a todos los genomas disponibles. Respecto a los genes de resistencia antibiótica, se realizó la anotación en la herramienta ResFinder, disponible en la página del Centro de epidemiología genómica (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)

2.5 Post anotación del genoma

Luego de la identificación de los posibles factores de virulencia se comparó cada una de las secuencias suministradas por la VFDB frente al genoma de *P. megaterium* M4 contenido en RAST (<https://rast.nmpdr.org/>), con el fin de confirmar la presencia de dichas secuencias en el genoma de *P. megaterium* M4.

2.6 Análisis de la información

Mediante la obtención de la secuencia de cada uno de los FV encontrados en el genoma de *P. megaterium* M4 disponible en RAST, se procedió a realizar un BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con el fin de determinar la identificación de cada uno de los factores en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y realizar el análisis bibliográfico.

3. Resultados

Mediante el ensamblaje del genoma, se logró determinar características propias de *P. megaterium* M4, su genoma está compuesto por 5.470.427 pb, cuenta con 327 contigs,

su porcentaje de G-C es de 37.7%, el número de secuencias codificantes es de 5929 y cuenta con 287 subsistemas. (Tabla 1)

Los resultados obtenidos tras la anotación del genoma en la VFDB se encuentran contenidos en la Tabla 2. Se obtuvo similitud con 45 secuencias, pero no se identificaron genes que codifiquen enterotoxinas (*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK* y *entFM*) y cereulida sintasa (*ces*).

Tras la anotación en ResFinder se pudo determinar que el genoma de *P. megaterium* M4 no alberga genes de resistencia antibiótica adquiridos puesto que, no se encontró similitud con las 97 secuencias disponibles dentro de las cuales se encuentran genes que codifiquen mecanismos de resistencia frente a betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, aminoglucósidos entre otros.

4. Discusión

La bioseguridad es uno de los factores más importantes que debe tenerse en cuenta para la formulación de probióticos, los riesgos en el caso de cepas de *Bacillus* incluyen la producción de enterotoxinas, la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos y la citotoxicidad contra las células normales. Particularmente *B. cereus* se asocia a la producción de enterotoxinas que lo catalogan como un posible patógeno humano (Lee et al., 2019), por tal razón el presente estudio contribuye a la mayor comprensión del nivel de seguridad de *P. megatrium* M4 y su potencial uso probiótico, con el fin de hacer un uso responsable de esta alternativa tecnológica y evitar daños colaterales en los sistemas de cultivo y peces cultivos.

Si bien en la cepa de *P. megaterium* M4 no se determinaron factores de virulencia ni genes de resistencia antibióticos que puedan afectar su posible uso, como el caso de la cepa de *Bacillus coagulans*, la cual estaba libre de genes de enterotoxina (*bceT*, *ces*, *entFM* y *cytK*) así como de genes (*Hbl* y *nhe*) y no producir actividad hemolítica (Gözde y Zerrin, 2021), este no siempre es el caso, pues desafortunadamente, estudios previos señalan que otros probióticos ya comercializados poseen riesgos de salud pública.

En un análisis a 34 productos probióticos comerciales que contenían cepas de *Bacillus* sp. se logró determinar que el 60% de los aislados mostraba actividad hemolítica y casi todos los aislados de *B. cereus* y *B. thuringiensis* producían *Nhe* y *Hbl*, en *B. cereus* se identificó la presencia del gen de la toxina *ces*. (Cui et al., 2020). En otro estudio, además de encontrar que todas las cepas de *B. cereus* producían enterotoxina *Nhe* y algunas cepas además producían además *Hbl* se determinó que las preparaciones además estaban mal etiquetadas y contenían especies bacterianas adicionales. (Zhu et al., 2016) En el ámbito de la acuicultura un estudio realizado por Anoyewaa et al. (2021) permitió determinar que algunos probióticos etiquetados con cepas de *Bacillus* sp. tres aislamientos albergaban los genes de enterotoxina *nheABC* y *entFM*, mientras que dos tenían los genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *cytK*. No obstante, en ninguno de los aislamientos se logró identificar la presencia del gen *ces* hemético.

Otro aspecto importante en cuanto a la bioseguridad es la ausencia de genes asociados a resistencia antibiótica, ya que los probióticos actúan como reservorios de genes de

resistencia que pueden ser transferidos verticalmente u horizontalmente a patógenos o al microbiota intestinal. (Li et al., 2020). De igual forma en los casos de detección de enterotoxinas en productos disponibles comercialmente, también se han identificado genes de resistencia, en el estudio publicado por Zhu et al. (2016) además se reportó que casi la mitad de las cepas del grupo *B. cereus* albergaban el gen de resistencia *tet* que confiere resistencia a tetraciclinas y algo aún más relevante es que en una cepa, dicho gen estaba situado en un elemento genético móvil. En otro estudio además del gen *tet* se logró identificar los genes *cat*, *cfr*, *lsa*, y *van*, que generan resistencia a cloranfenicol, cloanfenicol/ lincosamidas, oxazolidonas, pleuromutilinas, lincosamidas/ pleuromutilinas, y vancomisina, respectivamente. (Cui et al., 2020).

En nuestro estudio se encontró similitud con 45 genes asociados a virulencia, sin embargo, estos factores resultan ser benéficos en el entorno probiótico, por ejemplo, la proteína de unión a fibronectina facilita la interacción hospedero-patógeno, promoviendo la adhesión a la mucosa intestinal. (Hymes et al., 2016), también se identificaron genes que codifican proteínas asociadas a la formación de biopelículas como la tirosina proteína fosfatasa y la adenilsulfato quinasa, la formación de estos complejos facilita la supervivencia de los probióticos dentro la mucosa intestinal (Das et al., 2021). Otro factor involucrado en la supervivencia de los probióticos es la acetiltransferasa, que produce la O-acetilación del peptidoglicano, esta modificación protege a la bacteria de acción de las lisozimas. (Sychantha et al., 2017).

Referencias

Afrilasari W, Widanarni, Meryandini A (2017). Effect of Probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the Population of Intestinal Microflora, Digestive Enzyme Activity and the Growth of Catfish (*Clarias* sp.). *HAYATI Journal of Biosciences*. 23.

Aly SM, Albutti A (2014) Antimicrobials Use in Aquaculture and their Public Health Impact. *Journal of Aquaculture Research and Development* 5: 247.

Anokyewaa M, Kwaku A, Li Y, Lu Y, Kuebutornye, F. et al. (2021). Prevalence of virulence genes and antibiotic susceptibility of *Bacillus* used in commercial aquaculture probiotics in China. *Aquaculture Reports*. 21. 100784.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M. et al. (2015). MeDuSa: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics*, 31(15), 2443-2451.

Cavalcante R, Silveira G, Tachibana L, Días, D, Oshiro E. et al. (2020). Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports*. 17. 100343.

Celandroni F, Vecchione A, Cara A, Mazzantini D, Lupetti A et al. (2019) Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PloS One* 14(5).

Cui Y, Wang S, Ding S, Shen J, Zhu K. (2020) Toxins and mobile antimicrobial resistance genes in *Bacillus* probiotics constitute a potential risk for One Health. *J Hazard Mater* 382:121266.

Das, Susmita & Mondal, Kausik & Pal, Amit & Sengupta, Chandan. (2021). Evaluation of the probiotic potential of *Streptomyces antibioticus* and *Bacillus cereus*

on growth performance of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture Reports* 20. 100752.

Deng, Fengru & Chen, Yunsheng & Sun, Tianyu & Wu, Yuting & Su, Yiting & Liu, Changyue & Zhou, Junyu & Deng, Yiqun & Wen, Jikai. (2021). Antimicrobial resistance, virulence characteristics and genotypes of *Bacillus* spp. From probiotic products of diverse origins. *Food Research International*. 139. 109949.

EFSA. (2018) Guidance on the Characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms.

El-Haroun, Ehab & Goda, Ashraf & Chowdhury, M A Kabir. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*. 37. 1473 – 1480.

Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märklbauer E, Granum PE. (2021) The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* 13(2):98.

Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. (2017) *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* 8:1490

FAO. 2018. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. Rome.

FAO. 2020. The estate of world fisheries and aquaculture

FAO / OMS (2002). Informe de un grupo de trabajo conjunto FAO / OMS sobre la redacción de directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.

Godard T, Zühlke D, Richter G, et al. (2020) Metabolic Rearrangements Causing Elevated Proline and Polyhydroxybutyrate Accumulation During the Osmotic Adaptation Response of *Bacillus megaterium*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:47.

Gözde Konuray Altun, Zerrin Erginkaya (2021) Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety 151, 112233

Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. (2020) Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. Nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 70(11):5753-5798.

Hymes JP, Klaenhammer TR. (2016) Stuck in the Middle: Fibronectin-Binding Proteins in Gram-Positive Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 7:1504.

Kewcharoen, Werasan & Srisapoome, Prapansak. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. From Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & Shellfish Immunology*. 94.

Kuebutornye FKA, Lu Y, Abarike ED, Wang Z, Li Y, Sakyi ME. In vitro Assessment of the Probiotic Characteristics of Three *Bacillus* Species from the Gut of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. (2020) *Probiotics Antimicrob Proteins* 12(2):412-424.

Lara-Flores, M. (2012). The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Journal of Microbiology Research*. 2. 2141-5463.

Lee, NK., Kim, WS. & Paik, HD. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. (2019) Food Science and Biotechnology 28, 1297–1305

Li T, Teng D, Mao R, Hao Y, Wang X, Wang J. (2020) A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. Food Research International 136: 109571.

Limbu, S.M., Chen, L.-Q., Zhang, M.-L. and Du, Z.-Y. (2021), A global analysis on the systemic effects of antibiotics in cultured fish and their potential human health risk: a review. Reviews in Aquaculture 13: 1015-1059.

Melo-Bolívar, J. F., Ruiz Pardo, R. Y., Hume, M. E., Nisbet, D. J., Rodríguez-Villamizar, F., Alzate, J. F., ... & Villamil Díaz, L. M. (2019). Establishment and characterization of a competitive exclusion bacterial culture derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) gut microbiomes showing antibacterial activity against pathogenic *Streptococcus agalactiae*. Plos one 14(5), e0215375.

Melo-Bolívar Javier Fernando, Ruiz-Pardo Ruth Yolanda, Hume Michael E, Sidjabat Hanna E, Villamil-Diaz Luisa Marcela (2020) Probiotics for cultured freshwater fish. Microbiology Australia 41, 105-108.

Mukherjee, Anjan & Chandra, Goutam & Ghosh, Koushik. (2019). Single or conjoint application of autochthonous Bacillus strains as potential probiotics: Effects on growth, feed utilization, immunity and disease resistance in Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquaculture. 512. 734302.

Noor Uddin GM, Larsen MH, Christensen H, Aarestrup FM, Phu TM, Dalsgaard A (2015) Identification and Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Probiotic Products Used in Shrimp Culture. PLoS ONE 10(7): e0132338.

Panghal, Anil & Janghu, Sandeep & Virkar, Kiran & Gat, Yogesh & Kumar, Vikas & Chhikara, Navnidhi. (2017). Potential Non-Dairy Probiotic Products – A Healthy Approach. Food Bioscience.

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. Current protocols in bioinformatics 70(1), e102.

Reverter, M., Sarter, S., Caruso, D. et al. (2020) Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. Nature Communications 11, 1870

Sychantha D, Jones CS, Little DJ, et al. (2017) In vitro characterization of the antivirulence target of Gram-positive pathogens, peptidoglycan O-acetyltransferase A (OatA). PLoS Pathogens 13(10): e1006667.

XinHai Zhu, Shuangming Zhang, Liying Zhou. et al. (2021) Probiotic potential of *Bacillus velezensis*: Antimicrobial activity against non-O1 *Vibrio cholerae* and immune enhancement effects on *Macrobrachium nipponens*. Aquaculture 541

Zhou, M. & Yu, Shen & Hong, Bing & Li, Juan & Han, Han & Qie, Guang. (2020). Antibiotics control in aquaculture requires more than antibiotic-free feeds: A tilapia farming case *. Environmental Pollution 268. 115854.

Zorriehzahra MJ, Delshad ST, Adel M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Lazado CC (2016) Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. The Veterinary Quarterly Q. 36(4):228-241.

Zhu, K., Hölzel, C. S., Cui, Y., Mayer, R., Wang, Y., Dietrich, R., Didier, A., Bassitta, R., Märtlbauer, E., & Ding, S. (2016). Probiotic *Bacillus cereus* Strains, a Potential Risk for Public Health in China. Frontiers in microbiology 7, 718.

Característica	
Tamaño del genoma (pb)	5470427
Contings	327
Contenido GC (%)	37.7
Número de secuencias codificantes	5929
Número de subsistemas	287

Tabla 1. Características generales del genoma de *Priestia megaterium* M4

Gen	Referencia NCBI	Figfam	Scaffold	Position	Size (nt)	Size (aa)	Strand
Proteína de unión a fibronectina fibrinógeno	PEU70577.1	fig145272 2.11.peg.1 041	1	1016210-1 014498	1713	571	-
Inhibidor inmune A	WP_153254096.1	fig145272 2.11.peg.3 120	1	2838073-2 835722	2352	784	-
Fosfatasa Ser / Thr de tipo PP2C de la familia Stp1 / IreP	WP_153254967.1	fig145272 2.11.peg.1 053	1	1028952-1 029695	744	248	+
UTP - glucosa-1-fosfato uridiltransferasa GalU	WP_129705437.1	fig145272 2.11.peg.1 66	1	176467-177351	885	295	+
UTP - glucosa-1-fosfato	WP_153253130.1	fig145272 2.11.peg.3 332	1	3036670-3035783	888	296	-

uridiltransferasa GalU							
Proteína de biosíntesis de cápsula CapA	ADF37866.1	fig145272 2.11.peg.4 722	1	4313957-4 312761	1197	399	-
Poly-gamma-glutamato sintasa CapB	AXI27890.1	fig145272 2.11.peg.4 724	1	4315645-4 314464	1182	394	-
Poly-gamma-proteína de biosíntesis CapC	AXI27891.1	fig145272 2.11.peg.4 723	1	4314447-4 313998	450	150	-
Gamma-glutamyltransferasa	WP_153254847.1	fig145272 2.11.peg.4 179	1	3806225-3 804537	1689	563	-
Gamma-glutamyltransferasa	WP_153255255.1	fig145272 2.11.peg.1 397	1	1362453-1 364531	2079	693	+
Gamma-glutamyltransferasa CapD	WP_153252729.1	fig145272 2.11.peg.4 719	1	4310821-4 309259	1563	521	-
Nucleótido azúcar deshidrogenasa	WP_116074812.1	fig145272 2.11.peg.1 67	1	177597-178880	1284	428	+
UTP--glucosa-1-fosfato uridiltransferasa GalU	WP_153253481.1	fig145272 2.11.peg.4 215	1	3841381-3 840473	909	303	-
UDP-glucosa 4-epimerasa GalE	WP_098966223.1	fig145272 2.11.peg.4 687	1	4280939-4 279959	981	327	-
Proteína que contiene el dominio Cupin	WP_153254122.1	fig145272 2.11.peg.5 722	1	7119-8498	1380	460	+

Manosa-6-fosfato isomerasa, clase I	<u>WP_153254123</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>723</u>	1	8583-9590	1008	336	+
Proteína de biosíntesis capsular	<u>WP_153254124</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>725</u>	1	11419-12177	759	253	+
Tirosina-proteína quinasa de la familia CpsD / CapB	<u>WP_151874521</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>726</u>	1	12167-12871	705	235	+
Tirosina proteína fosfatasa	<u>WP_153254125</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>727</u>	1	13081-13848	768	256	+
UDP-glucosa 4-epimerasa GalE	<u>MQR85369.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>099</u>	1	4714524-4715537	1014	338	+
Regulador transcripcional de la familia LytR	<u>WP_153252568</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>905</u>	1	6602-5646	957	319	-
Regulador de almacenamiento de carbono CsrA	<u>WP_153252751</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>88</u>	1	196654-196884	231	77	+
Regulador de respuesta CheY	<u>WP_153254753</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>107</u>	1	1081304-1081666	363	121	+
Factor de transcripción regulador de respuesta	<u>WP_153252060</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>438</u>	1	5039535-5040227	693	231	+
Factor de transcripción regulador de respuesta	<u>WP_153254023</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.3</u> <u>999</u>	1	3633596-3634315	720	240	+
Factor de transcripción	<u>WP_153255240</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>428</u>	1	1396053-1396724	672	224	+

regulador de respuesta							
Proteína de la familia de la hemolisina III	<u>WP_153251982.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.4</u> <u>759</u>	1	4347259-4 347909	651	217	+
Adenilil-sulfato quinasa	<u>MQR84850.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.3</u> <u>71</u>	1	368775- 369374	600	200	+
Subunidad alfa de ureasa	<u>WP_153254504.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.2</u> <u>317</u>	1	2118268-2 119977	1710	570	+
Proteína accesoria ureasa UreG	<u>WP_153254501.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.2</u> <u>320</u>	1	2121153-2 121767	615	205	+
Isoprenil transferasa	<u>WP_013084770.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>126</u>	1	1097968- 1098750	783	261	+
Proteína de la familia 4 de la glicosiltransferasa	<u>WP_153254121.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>721</u>	1	5963- 7114	1152	384	+
Transportador de Sn-glicerol-3-fosfato ABC Proteína de unión a ATP UgpC	<u>WP_153253514.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.4</u> <u>271</u>	1	3896361-3 897452	1092	364	+
Transportador ABC Proteína de unión a ATP	<u>WP_153254861.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.4</u> <u>194</u>	1	3821954-3 822748	795	265	+
Transportador ABC Proteína de unión a ATP	<u>WP_153253263.1</u>	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.2</u> <u>068</u>	1	1922555-1 923313	759	253	+

Proteína de la familia del aspartato aminotransferasa	<u>WP_153254085</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>225</u>	1	1204627-1 205991	1365	455	+
Proteína de poro del sistema de secreción Flagelar tipo III FliP	<u>WP_098333994</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>109</u>	1	1082364-1 083032	669	223	+
Proteína de biosíntesis flagelar FliQ	<u>WP_013084782</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>110</u>	1	1083043-1 083312	270	90	+
Factor de elongación Tu	<u>WP_153253314</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.3</u> <u>845</u>	1	3500942-3 502159	1218	406	+
Acetiltransferasa	<u>WP_153253359</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>153</u>	1	4770065-4 768170	1896	632	-
Proteína de la familia 2 de las glicosiltransferasas	<u>WP_043978303</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>333</u>	1	1301352-1 302341	990	330	+
Catalasa KatA	<u>WP_153252823</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.5</u> <u>4</u>	1	61617- 60157	1461	487	-
Prolipoproteína diacilgliceril transferasa	<u>WP_098433189</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.2</u> <u>22</u>	1	235055- 235888	834	278	+
Prolipoproteína diacilgliceril transferasa	<u>WP_153254805</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.3</u> <u>937</u>	1	3581164-3 581979	816	272	+
Peptidasa de señalización II	<u>WP_154989735</u> 1	<u>fig145272</u> <u>2.11.peg.1</u> <u>029</u>	1	1001214-1 001681	468	156	+

Tabla 2. Genes asociados virulencia encontrados en *Priestia megaterium* M4 tras la anotación en la VFDB