

Revista Ciencias del Mar UAS



Julio - Septiembre 2026

Núm. 4 Vol. 3

U N I V E R S I D A D A U T Ó N O M A D E S I N A L O A

Parasitología y Sanidad Acuícola

Número Especial
EDICIÓN 1

Dr. Víctor Vidal-Martínez

Parasitólogo

ISSN 3061-8959



CREATIVE COMMONS



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



Artículo Científico

Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias intestinales autóctonas de *Oreochromis niloticus*

In vitro evaluation of the probiotic potential of gut bacteria native to *Oreochromis niloticus*



1. Diana Elizabeth García Rodríguez



0009-0000-6415-6985

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.



2. Marcelo Leandro Delgado Gelpud



0009-0008-9810-8306

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.



3. Camilo Lenin Guerrero Romero



0000-0002-6948-4344

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.

Autor de correspondencia: camiloguerrero.ipa@udenar.edu.co



4. Yemal Alexander Maigual Enriquez



0000-0002-9873-2538

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.



5. Leidy Tatiana Portillo Delgado



0000-0002-4988-8149

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.



6. Marco Antonio Imués Figueroa



0000-0002-7607-540X

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.



7. Lizeth Giovanna Mejía Ortiz



0000-0001-7182-1365

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.



8. Luis Evert Enriquez Benavides



0000-0002-9009-9432

Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Pasto, Nariño, Colombia.

**Evaluación *in vitro* del potencial probiótico
de bacterias intestinales autóctonas de
*Oreochromis niloticus***

**In vitro evaluation of the probiotic
potential of gut bacteria native to
*Oreochromis niloticus***

► RESUMEN

Los probióticos desempeñan un papel relevante en el cultivo de *Oreochromis niloticus*, ya que contribuyen al equilibrio del tracto digestivo, mejoran la digestión de nutrientes, fortalecen la respuesta inmune y aumentan la resistencia frente a patógenos oportunistas como *Streptococcus agalactiae*. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial probiótico de bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal de *O. niloticus*. Se realizaron el aislamiento bacteriano y la caracterización física y biológica mediante observación morfológica, tinción de Gram, pruebas bioquímicas, antibiograma y evaluación de la actividad antagonista frente a *S. agalactiae*. Se obtuvieron 14 aislados bacterianos, de los cuales tres cepas mostraron potencial probiótico. La prueba de pH permitió seleccionar los morfotipos IM-011, IM-012 y IM-013 (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Brevibacterium casei*, respectivamente) por su alta supervivencia. El análisis de antagonismo basado en un diseño factorial, presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los morfotipos y sus interacciones. El *Bacillus thuringiensis* fue el más efectivo a una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹. Sus productos extracelulares, principalmente ácido acético y láctico, contribuyeron en la inhibición del crecimiento de *S. agalactiae*. Estos resultados sugieren que las bacterias identificadas son candidatas a probióticos, aunque se recomienda validar sus efectos mediante estudios *in vivo*.

Palabras clave: Probióticos, *Oreochromis niloticus*, Antagonismo, *Streptococcus agalactiae*



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



► ABSTRACT

Probiotics play an important role in the farming of *Oreochromis niloticus*, as they help maintain the balance of the digestive tract, improve nutrient digestion, strengthen the immune response, and increase resistance to opportunistic pathogens such as *Streptococcus agalactiae*. The objective of this study was to evaluate the probiotic potential of bacteria native to the gastrointestinal tract of *O. niloticus*. Bacterial isolation, physical, and biological characterization were performed using morphological observation, Gram staining, biochemical tests, an antibiogram, and evaluation of antagonistic activity against *S. agalactiae*. Fourteen bacterial isolates were obtained, of which three strains showed probiotic potential. The pH test facilitated the selection of the morphotypes IM-011, IM-012, and IM-013 (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Brevibacterium casei*, respectively) due to their high survival rates. The antagonism analysis, based on a factorial design, revealed significant differences ($P < 0.05$) among the morphotypes and their interactions. *Bacillus thuringiensis* demonstrated the greatest efficacy at a concentration of 1×10^7 CFU mL⁻¹ (colony-forming units). The extracellular products of these organisms, primarily acetic and lactic acids, contributed to the inhibition of pathogen growth. These results suggest that the identified bacteria are candidates for probiotics, although their effects should be validated through in vivo studies.

Keywords: Probiotics, *Oreochromis niloticus*, Antagonism, *Streptococcus agalactiae*

► INTRODUCCIÓN

La acuicultura a nivel mundial ha experimentado un crecimiento significativo, y su viabilidad económica depende de una producción eficiente, condición necesaria para garantizar la rentabilidad del sector (Rodríguez et al., 2025). Sin embargo, este aumento ha traído consigo importantes desafíos, entre los que destaca el manejo de las enfermedades bacterianas (Romanzini y Costa, 2023); Ntakirutimana et al., 2025). Los brotes de estas enfermedades en los sistemas acuícolas



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



han generado pérdidas económicas considerables debido a las elevadas tasas de mortalidad en los cultivos, así como a los altos costos asociados a las estrategias de prevención y tratamiento (Mahmud et al., 2025).

En este sentido, el cultivo de tilapia del Nilo (*O. niloticus*), una de las especies de mayor demanda en el mercado mundial, enfrenta importantes retos en áreas de sanidad e inocuidad. Las altas densidades de siembra características de los sistemas de producción intensiva, junto con las prácticas de manejo orientadas a maximizar el rendimiento, generan estrés en los peces, esta condición altera las comunidades microbianas presentes tanto en el ambiente como en el hospedador, lo que favorece la disbiosis de la microbiota intestinal y, por consiguiente, el desarrollo de enfermedades (Infante-Villamil et al., 2021; Abd El-Hack et al., 2022). Ante ello, resulta importante comprender los factores que contribuyen al mantenimiento de la salud y la resistencia de los peces frente a los patógenos entre los cuales, la microbiota intestinal, desempeña un papel esencial (Bertaglia et al., 2023).

La microbiota intestinal se ha utilizado como un biomarcador de la salud y de capacidad metabólica de los peces debido a su participación en diversos procesos biológicos, entre ellos el crecimiento, la fisiología, la respuesta inmunitaria y la función de barrera frente a patógenos. En consecuencia, una disminución de su diversidad y estabilidad se asocia estrechamente con una mayor susceptibilidad a enfermedades. Debido a su importancia, varios estudios han centrado su atención en aislar y caracterizar la diversidad y las funciones de las comunidades bacterianas presentes en peces sanos, así como en identificar los factores externos que modulan la composición, el equilibrio y la funcionalidad de la microbiota intestinal (Xiong & Chen 2018).

Para controlar las enfermedades infecciosas en el cultivo de tilapia del Nilo, se han utilizado antibióticos y biocidas como métodos preventivos; sin embargo, el uso inadecuado de estos productos químicos ha contribuido al aumento de la resistencia bacteriana, a la contaminación de los ecosistemas acuáticos y a la acumulación de residuos farmacológicos en los tejidos de los peces y en el agua (Matee, 2026).

Como alternativa a esta problemática, la adopción de probióticos que, de



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son un grupo de bacterias beneficiosas que producen ácido acético, ácido láctico, bacteriocinas y péptidos antibacterianos para inhibir el crecimiento de patógenos y conferir beneficios para la salud del huésped (Moustafa et al., 2021; Elsegeny et al., 2025; Mohammed et al., 2025).

Asimismo, los probióticos pueden definirse como complementos microbianos vivos que, al modular la microbiota asociada al hospedero o al ambiente, favorecen la resistencia a enfermedades, el crecimiento, la supervivencia, el aprovechamiento del alimento, la respuesta al estrés y la calidad del agua (Vulla et al., 2024). En este contexto, el tracto gastrointestinal de los peces constituye un reservorio natural de bacterias con potencial probiótico. Por ello, los microorganismos aislados de este ambiente se catalogan por ser candidatos prometedores para el desarrollo de suplementos probióticos más eficientes y adaptados a las condiciones fisiológicas del hospedador (Chakma et al., 2025).

Estudios previos indican que los probióticos se emplean en la acuicultura como suplementos alimenticios o aditivos en el agua y desempeñan un papel importante en los peces al controlar enfermedades bacterianas, fúngicas y virales (Anokyewaa et al., 2026). Entre ellos, se destacan las bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, aunque existen formulaciones probióticas basadas en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y hongos (*Saccharomyces*) (Calcagnile et al., 2024; Tayyab et al., 2025).

Respuestas benéficas se han documentado en otras especies de interés comercial, como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa común (*Cyprinus carpio*), el bagre rayado (*Pangasianodon hypophthalmus*) y el camarón blanco (*Penaeus vannamei*), en ellas probióticos como: *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus* Liq-Vtech, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* mejoraron el crecimiento, la supervivencia, el desempeño fisiológico y la respuesta inmunológica innata (Võ et al., 2024; Hosseinzadeh et al., 2025; Mahmoodian et al., 2025; Lalitha et al., 2025).



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



De manera similar, diversos estudios han evaluado el potencial probiótico de bacterias aisladas de la tilapia del Nilo. Por ejemplo, Chemlal-Kherraz et al. (2016) analizaron 10 cepas de *Lactobacillus* aisladas de esta especie y demostraron un fuerte antagonismo frente a patógenos clave (*S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus* sp. y *Pseudomonas* sp.). Estas cepas destacaron por su rápida producción de ácido láctico, logrando reducir el pH en menos de tres horas, lo que les confiere características idóneas para su uso en acuicultura. Por su parte, Kuebutornye et al. (2020) aislaron tres cepas nativas (*Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*) que toleraron condiciones extremas de hasta 100 °C, pH 1 y sales biliares. Además, inhibieron eficazmente a los patógenos *S. agalactiae*, *A. hydrophila* y *V. harveyi*, demostrando un alto potencial para sustituir el uso de antibióticos. Finalmente, Abarra et al. (2025) evaluaron *in vitro* e *in vivo* dos aislados autóctonos de *Bacillus subtilis* de tilapia, que exhibieron actividad enzimática digestiva y antagonismo bacteriano.

En conjunto, las evaluaciones de especies como *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus toyonensis*, respaldan el potencial antibacteriano y justifican su aplicación como alternativa natural a los quimioterapéuticos convencionales en acuicultura (Guimarães et al., 2024; Niveditha et al., 2025). En este contexto, y con el fin de contribuir a la implementación de soluciones bioseguras para la especie, este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial probiótico *in vitro* de bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal de tilapia nilótica (*O. niloticus*).

► MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo según lo establecido en la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y el Acuerdo 001 de 2011 del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño, garantizando el uso responsable de los juveniles de tilapia del Nilo y el cumplimiento ético en todo el proceso.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



Caracterización del aislado bacteriano

Recolección de muestra

Se utilizaron cinco juveniles de tilapia del Nilo (*O. niloticus*) de 50 g, provenientes de una producción extensiva en el municipio de Buesaco, Nariño, Colombia, seleccionados con base en criterios de comportamiento y estado de salud, de acuerdo con lo descrito por Aly et al. (2008). Posteriormente, fueron trasladados al Laboratorio de Sanidad Acuícola del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño, en Pasto, Nariño, Colombia.

Aislamiento y siembra bacteriana

Se sacrificaron los organismos mediante anestesia con eugenol en proporción 1:9 (eugenol: etanol) a una concentración de 2 mL gal⁻¹ (Machnik et al., 2023)gal. Se diseccionó cada ejemplar y, de cada uno, se extrajo el tercio medio del intestino. La masa biológica resultante (1 g) se maceró en un mortero con solución salina fisiológica hasta la homogeneización completa. A partir de esta preparación, se realizaron diluciones sucesivas hasta 10⁻⁶ en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y en el Caldo Soja Trypticaseína (TSB). Se homogeneizó con un vortex (VF2®, IKA Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen, Alemania) y sembró 100 µL de cada dilución mediante la técnica de siembra masiva (Sanders, 2012) en cajas Petri con agar (MRS) y agar Trypticase de Soya (TSA), se incubó a una temperatura de 36 °C en una incubadora (Memmert® Schwabach, Alemania) y se realizaron lecturas del crecimiento bacteriano al cumplir las 24 y 48 h de incubación.

Identificación y purificación de morfotipos

Para obtener cepas puras, se realizaron subcultivos sucesivos de colonias individuales en nuevos medios de cultivo. Se consideraron aspectos morfológicos, como color, forma, elevación y borde, de acuerdo con lo establecido por Arroyo et al. (2018). Posteriormente, se realizó una tinción de Gram para su observación microscópica, según la metodología de Canosa (2003). Cada aislamiento recibió un código basado en su localización (IM= Intestino Medio) y el número de morfotipos. Los microorganismos se conservaron a -20 °C en una solución de glicerol y caldo TSA o MRS (1:1), de acuerdo con Palacios Quintanilla y Rivas Hernández (2019).



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Identificación bioquímica

Los cultivos aislados fueron evaluados mediante pruebas bioquímicas tales como Citocromo Oxidasa, Catalasa y Prueba de producción de Sulfuro-Indol-Motilidad, Lactosa, utilización de Citrato, Ureasa e Hidrólisis de esculina, según Macfaddin (2003); Shields y Cathcart (2010); Ortega y Fuertes (2015).

Selección inicial de los morfotipos bacterianos

Los morfotipos bacterianos aislados se sometieron a un proceso de selección preliminar mediante crecimiento en agar MacConkey, utilizado como medio diferencial y selectivo para la identificación de bacterias Gram negativas. Los aislados fueron sembrados en agar MacConkey e incubados de acuerdo a Murray et al. (2015). Los morfotipos que presentaron crecimiento se clasificaron como positivos y fueron excluidos de las evaluaciones posteriores, ya que no cumplieron los criterios de selección de candidatos con potencial probiótico.

Evaluación del potencial probiótico de los aislados

Actividad hemolítica

La actividad hemolítica se evaluó mediante la inoculación de cada aislado utilizando el método francés en placas de agar MRS o TSA suplementadas con 5 % v/v de sangre humana, según la colonia bacteriana evaluada. Los cultivos se incubaron a 36 °C durante 24 h. Posteriormente, las cepas se caracterizaron según el grado de hemólisis producido, clasificándose como alfa, beta o gamma hemolíticas, de acuerdo con Noguera y Villamil (2009).}

Resistencia al pH

Una vez obtenidos los morfotipos que cumplieron con el requisito anterior (gamma-hemólisis), se inoculó el 10% de cada aislado utilizando caldo MRS para las cepas del género *Lactobacillus* y caldo TSB para los aislados del género *Bacillus*, previamente acidificado con ácido clorhídrico 1N hasta alcanzar pH 1 y 2, de acuerdo con Cueto-Vigil et al. (2010). Como control, cada aislado se inoculó simultáneamente en caldo MRS o TSB ajustado a un pH 7. Se midió la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS® 40/50 Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) al tiempo inicial 0 h (Ti) y al finalizar las 24 h de incubación (Tf). De manera paralela, se realizaron diluciones seriadas



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

hasta 10^{-6} en Ti y Tf, a partir de las cuales se sembraron alícuotas de 100 µL en cajas Petri. Esto permitió determinar el número de células viables mediante el método de conteo en placa. El porcentaje de supervivencia se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\log_{UFC Tf}}{\log_{UFC Ti}} * 100$$

Donde: **Log_{UFC Tf}**: logaritmo de las unidades formadoras de colonias (UFC) en el Tf y **Log_{UFC Ti}**: logaritmo de las UFC inoculadas inicialmente en el Ti (Cueto-Vigil et al., 2010).

Sensibilidad a antibióticos

La técnica de sensibilidad a antibióticos fue desarrollada por Montero-Recalde (2018). Los aislados obtenidos y la cepa patógena *S. agalactiae*, fueron sometidos a ensayos de sensibilidad frente a diferentes antibióticos: eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), oxitetraciclina (30 µg) y gentamicina (120 µg). Se realizó una siembra en césped de cada cepa en cajas de Petri con agar MRS, TSA y Brain Heart Infusion (BHI), según correspondiera. El sembrado se dejó secar durante cinco minutos con la caja cerrada; posteriormente, con pinzas estériles, se colocaron los discos de antibióticos sobre la superficie del agar, distribuyéndolos de manera uniforme en la periferia. Después, se incubaron a 36 °C durante 24 horas. Finalmente, se midieron los diámetros de los halos de inhibición (mm). Los resultados se clasificaron como sensibles (> 20 mm) o resistentes (< 20 mm), de acuerdo con los criterios establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (US) (2006).

Actividad antibacteriana mediante productos extracelulares (PECs)

Se utilizaron colonias aisladas del tracto intestinal de *O. niloticus* y, de acuerdo con Sudheesh y Xu (2001), los PECs se obtuvieron al cultivar bacterias en medio TSB e incubadas durante 24 horas a 36 °C. Posteriormente, las muestras se procesaron en una centrífuga (Z 230®, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania) por un tiempo de 20 min a 12,000 rpm y se extrajo el sobrenadante, según las indicaciones de Newaj-Fyzul (2007) y Balcázar et al. (2009). La capacidad de inhibición



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



bacteriana se evaluó utilizando una cepa patógena certificada tipo I de *S. agalactiae* (ATCC® 13813™), bacteria reportada como uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades en cultivos de tilapia.

Evaluación de la capacidad de los PECs en la inhibición del crecimiento de la bacteria patógena

Se estableció una relación 1:1 en tubos de ensayo, se combinaron 5 mL de los PECs derivados de los distintos morfotipos bacterianos con 5 mL de la cepa patógena (*S. agalactiae*), previamente cultivada en caldo BHI. Como control, se sembró la bacteria patógena en un tubo de ensayo sin la presencia de PECs. Se midió el crecimiento a una absorbancia de 600 nm en intervalos de 0, 4, 8 y 12 horas.

Evaluación de la actividad antibacteriana mediante la técnica de pozos en agar

Siguiendo las indicaciones de Montero-Recalde (2018), la bacteria *S. agalactiae* se sembró en caja Petri sobre agar BHI de forma masiva; utilizando un hisopo estéril, y se dejó secar durante cinco minutos. Posteriormente, se perforaron cuatro pozos de 7.4 mm de diámetro en el agar con la parte posterior de una punta de micropipeta estéril y se sellaron con 10 µL de agar BHI. En tres de los pozos se agregaron 20 µL de los productos extracelulares (PECs) de la bacteria en estudio, mientras que en el cuarto pozo se utilizó caldo TSB como control. El ensayo se realizó en triplicado. Las cajas de Petri se incubaron a 36 °C durante 24 horas. Finalmente, se midió el diámetro del halo formado alrededor de los pozos, siguiendo la recomendación de Noguera y Villamil (2009).

Análisis de los productos extracelulares (PECs) de las bacterias seleccionadas

Los PECs se analizaron en el laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema de HPLC estuvo compuesto por un cromatógrafo de líquidos (Breeze, Waters Corporation®, Milford, MA, EE. UU.) equipado con una bomba binaria (modelo 1525, Waters Corporation®, Milford, MA, EE. UU.) un detector de arreglo de diodos PDA (modelo 2998, Waters Corporation®, Milford, MA, EE. UU) configurado a una longitud de onda de 210 nm, y un inyector de muestra (modelo



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

7725i, Rheodyne, Rohnert Park®, CA, EE. UU.) con Loop de 20 µL. Las separaciones cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente utilizando una columna analítica C18(2) (250 mm x 4.6 mm x 5.4 µm) 100 Å. La fase móvil estuvo constituida por un buffer de fosfato ajustado a pH 2.5 y acetonitrilo, con un flujo de 1.0 mL min⁻¹. Finalmente, para identificar y cuantificar los metabolitos, se utilizaron estándares comerciales de referencia de grado HPLC de ácido láctico y ácido acético (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.), los cuales fueron identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y de los espectros de absorción ultravioleta (UV) (Szkop y Bielawski, 2013).

Cinética de crecimiento de morfotipos aislados y bacterias patógenas

Cada morfotipo se inoculó en caldo TSB o BHI y se incubó a 36°C. La absorbancia se midió a 600 nm en intervalos de 30 min, desde el inicio del cultivo hasta que la curva de crecimiento alcanzó la fase de declive o muerte. Paralelamente, se determinó la concentración mediante el recuento en cámara de Neubauer, según el método de Rodríguez (2005).

Identificación molecular de las cepas seleccionadas

Se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, Colombia. Se inocularon las bacterias en agar TSA en tubos de ensayo, se empaquetaron y se transportaron refrigerados. Se utilizó el método de identificación bacteriana propuesto por del Rosario Rodicio y del Carmen Mendoza (2004), el cual consiste en la secuenciación del ADN_r 16S en tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón y c) análisis de la secuencia.

Ensayo de antagonismo

Se determinó la capacidad inhibitoria de las cepas probióticas frente a *S. agalactiae* mediante la medición de halos de inhibición. Para ello, se efectuó la siembra de *S. agalactiae* en forma masiva con hisopo estéril sobre la caja Petri de acuerdo con las concentraciones establecidas (1x10⁶ UFC mL⁻¹ o 1x10⁷ UFC mL⁻¹); posteriormente, se dejó secar por cinco minutos y se realizaron cuatro pozos de 7.4 mm de diámetro en el agar, utilizando la parte posterior de una punta para micropipeta estéril, los cuales fueron sellados con 10 µL de agar BHI. En tres de los pozos se



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

agregó 20 μL de biomasa según la concentración de cepas para cada uno de los niveles (1×10^6 UFC/mL o 1×10^7 UFC/mL) según corresponda, el cuarto pozo (control) se utilizó caldo TSB, el ensayo se realizó por triplicado. El conjunto se incubó a 36°C durante un período de 12 a 24 horas. Finalmente, se midió el diámetro del halo formado alrededor de los pozos, siguiendo la recomendación de Noguera y Villamil (2009).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos del ensayo de antagonismo fueron sometidos a pruebas de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) factorial para evaluar el efecto de los factores, así como la interacción sobre el diámetro del halo de inhibición. Cuando se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$), las medias se compararon mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En todos los casos se estableció un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ utilizando el software RStudio versión 4.3.1. Con el fin de determinar el mejor aislado y la mejor concentración frente a *S. agalactiae*, se aplicó un diseño factorial conformado por tres morfotipos bacterianos (IM-011, IM-012 e IM-013) y dos concentraciones de *S. agalactiae* (1×10^6 y 1×10^7 UFC mL^{-1}), ver Tabla I.

Tabla I. Matriz de arreglo factorial

Cepa patógena/ concentración		Morfotipos/concentración					
		IM-011		IM-12		IM-013	
		1×10^6 UFC/mL	1×10^7 UFC/mL	1×10^6 UFC/mL	1×10^7 UFC/mL	1×10^6 UFC/mL	1×10^7 UFC/mL
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1×10^6 UFC/mL	T ₁₋₀	T ₂₋₀	T ₁₋₁	T ₂₋₁	T ₁₋₂	T ₂₋₂
	1×10^7 UFC/mL	T ₃₋₀	T ₄₋₀	T ₃₋₁	T ₄₋₁	T ₃₋₂	T ₄₋₂

UFC: Unidad Formadora de Colonias.

IM-011, IM-12 y IM-013: Códigos de identificación interna asignados a los morfotipos bacterianos aislados del intestino medio de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

► RESULTADOS

Se aislaron 14 morfotipos provenientes de la región media del intestino de *O. niloticus*. Los morfotipos mostraron características bacilares, lo que corrobora el crecimiento bacteriano en medios selectivos específicos para el desarrollo de bacterias ácido-lácticas. En cuanto a la

coloración de las colonias, el 50% fue blanco, 28.5% crema y el 21.5% translúcida. Respecto a la forma, el 50% irregular, 35.8% circular, puntiforme y filamentososa 7.1%. En relación con el borde, el 42.9% fue ondulado, 28.6% redondeado, 14.3% lobulada, borde filamentososo y espiculado presentaron 7.1% respectivamente. La superficie convexa fue la característica predominante, observada en siete morfotipos (50%). A nivel microscópico, la tinción de Gram mostró que el 64.3% de los morfotipos aislados eran Gram positivos con forma bacilar, mientras que el 35.7% Gram negativos con forma de bacilo (Figura 1, Tabla II).

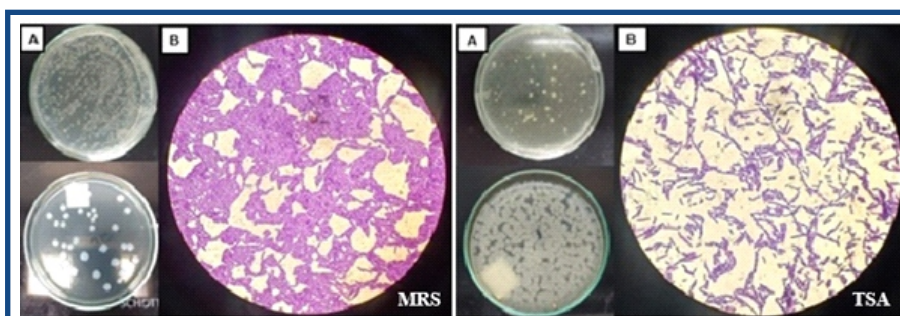


Figura 1. Morfotipos aislados en medio nutritivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y agar Trypticase de Soya (TSA). A) Aislamiento y purificación bacteriana; B) Análisis morfológico mediante tinción de Gram a 100X.

Tabla II. Caracterización morfológica de las colonias de los microorganismos aislados

Código	Color	Forma	Borde	Superficie	Tinción de Gram
IM-001	Blanco	Irregular	Lobulado	Convexa	+
IM-002	Crema	Puntiforme	Ondulado	Convexa	+
IM-003	Blanco	Irregular	Ondulado	Convexa	+
IM-004	Blanco	Circular	Espiculado	Convexa	+
IM-005	Blanco	Irregular	Ondulado	Convexa	-
IM-006	Traslúcida	Irregular	Ondulado	Planoconvexa	-
IM-007	Traslúcida	Circular	Ondulado	Planoconvexa	-
IM-008	Blanco	Circular	Redondeado	Plana	-
IM-009	Traslúcida	Circular	Redondeado	Convexa	-
IM-010	Blanco	Filamentosa	Filamentososo	Plana	+
IM-011	Crema	Irregular	Redondeado	Planoconvexa	+
IM-012	Crema	Irregular	Ondulado	Planoconvexa	+
IM-013	Blanco	Circular	Redondeado	Convexa	+
IM-014	Crema	Irregular	Lobulado	Plana	+



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Pruebas bioquímicas de los organismos aislados

En la tabla III, se observa que 13 morfotipos presentaron un resultado positivo en la prueba de catalasa (92.9%). En la prueba de SIM, el 50% de los aislados mostró motilidad. La prueba de Lactosa fue positiva en 10 morfotipos (71.5%), mientras que en la prueba de hidrólisis de esculina correspondió a resultados negativos con 12 aislados (85.7%). La prueba de Mac Conkey fue utilizada como método de filtrado selectivo (Murray et al., 2015), donde el crecimiento bacteriano indicó la presencia de bacterias Gram negativas, lo que sugiere una posible presencia de agentes patógenos para peces.; así, de las 14 cepas bacterianas, cinco fueron excluidas del estudio por marcar positivo en esta prueba, una característica no deseable para el objetivo de esta investigación. En consecuencia, se seleccionaron 9 morfotipos bacterianos (64.3%).

Tabla III. Pruebas bioquímicas de los organismos aislados

Código	Oxidasa	Catalasa	Sulfuro	Indol	Motilidad	Mac Conkey	Lactosa	Citrato de Simons	Ureasa	Hidrólisis de esculina
IM-001	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
IM-002	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IM-003	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IM-004	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
IM-005	±	+	-	+	-	+	+	+	+	+
IM-006	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
IM-007	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
IM-008	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
IM-009	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
IM-010	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
IM-011	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
IM-012	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
IM-013	±	+	-	-	-	-	+	-	-	-
IM-014	±	+	-	-	+	-	+	-	+	-

Ensayo actividad hemolítica

Se constató que el total de los 9 morfotipos seleccionados anteriormente, presentaron hemolisis tipo "gama hemólisis", (Tabla IV).

Tabla IV. Tipo de hemólisis de los morfotipos aislados del intestino medio de tilapia nilótica (*O. niloticus*)

Código	Hemólisis
IM-001	Y
IM-002	Y
IM-003	Y
IM-004	Y
IM-0010	Y
IM-0011	Y
IM-0012	Y
IM-0013	Y
IM-0014	Y
"Y" Gama – Hemólisis	



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Resistencia al pH

La resistencia de los morfotipos aislados frente a cambios de pH fue evaluada mediante el recuento de UFC mL⁻¹ al tiempo inicial (Ti) y final (Tf) (Figura 2). Los resultados de los morfotipos IM-001 a IM-004 y IM-010 a IM-014 expuestos a pH 1 se presentan en las figuras 2A y 2B, respectivamente, mientras que los correspondientes a pH 2 se muestran en las figuras 2C y 2D. De igual manera, el crecimiento de los morfotipos bajo condiciones de control se muestra en las figuras 2E y 2F. Bajo las condiciones evaluadas, los morfotipos IM-011, IM-012 y IM-013 presentaron los mayores valores de concentración bacteriana ante la exposición a pH ácido (Figura 2B y 2D). Estos morfotipos alcanzaron una concentración de 9.10×10^3 UFC mL⁻¹, 3.87×10^3 UFC mL⁻¹ y 3.19×10^3 UFC mL⁻¹, respectivamente. Con base en su capacidad de supervivencia en condiciones de pH extremo, estos morfotipos fueron seleccionados para las pruebas posteriores de evaluación del potencial probiótico.

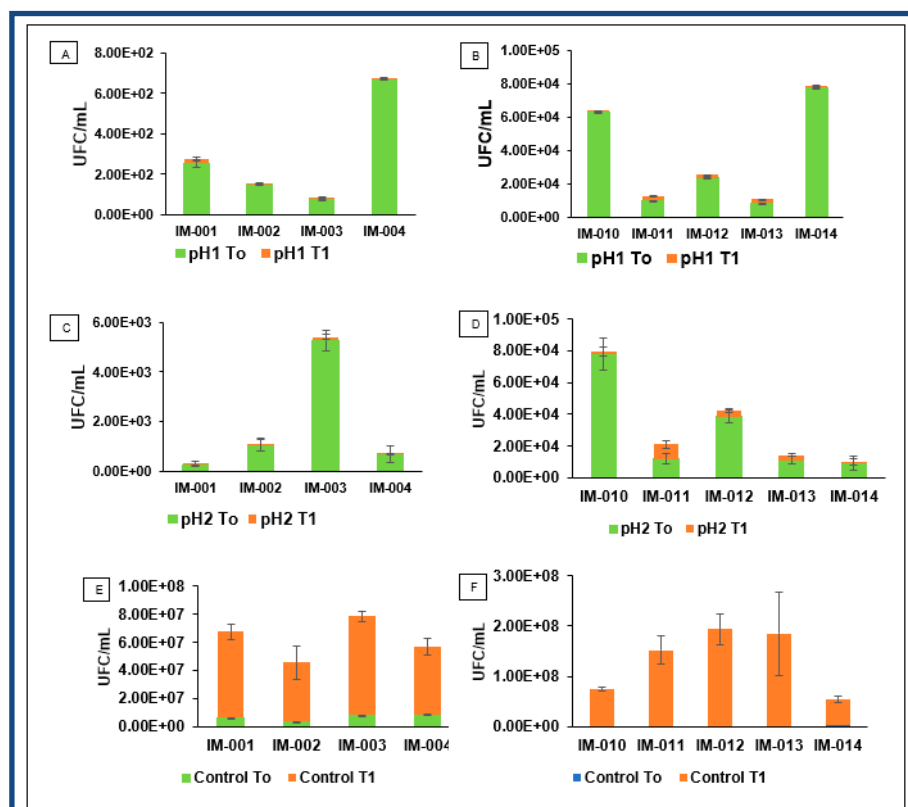


Figura 2. Resistencia de los morfotipos aislados frente a cambios de pH. (Ti: tiempo inicial; Tf: Tiempo final) Los datos se expresan como media ± DE.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Supervivencia de los morfotipos al pH

Los morfotipos IM-011, IM012 e IM-013 presentaron los mayores porcentajes de supervivencia a niveles de pH 1 y 2. En la Figura 3 se observa que estos aislados conservaron su viabilidad después de la exposición a condiciones extremas. A pH 1, las supervivencias fueron 87%, 75% y 86% para IM-011, IM012 e IM-013, respectivamente, mientras que a pH 2 alcanzaron valores de 97%, 78% y 87% respectivamente (Figuras 3B y 3D).

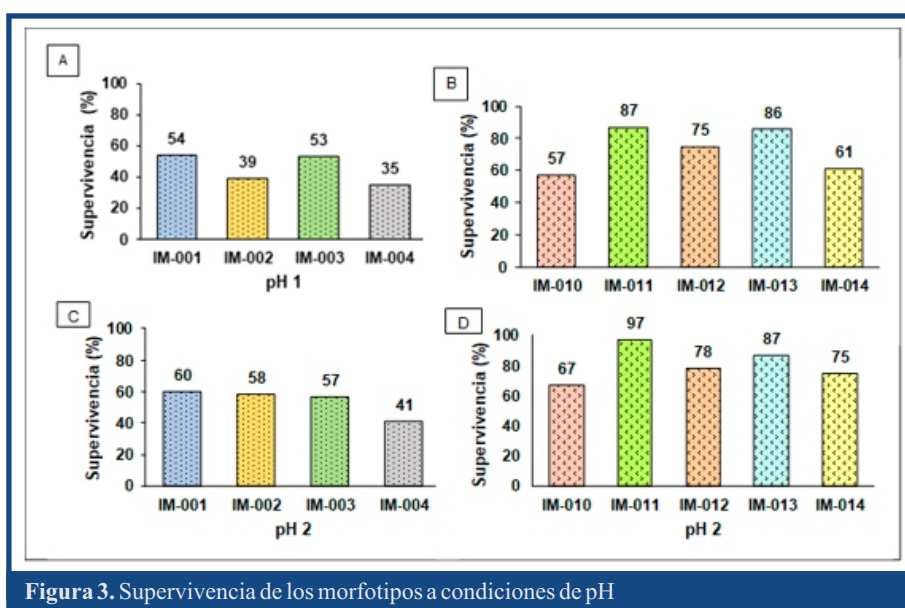


Figura 3. Supervivencia de los morfotipos a condiciones de pH

Sensibilidad a los antibióticos

Los tres morfotipos seleccionados (IM-011, IM-012 e IM-013) fueron sensibles a los cuatro antibióticos: eritromicina, cloranfenicol, amoxicilina y gentamicina (Figura 4). Esta sensibilidad se manifestó a través de la formación de halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con cada antibiótico. Lo que indica una eficacia de estos agentes para inhibir el crecimiento bacteriano, (Tabla V).



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

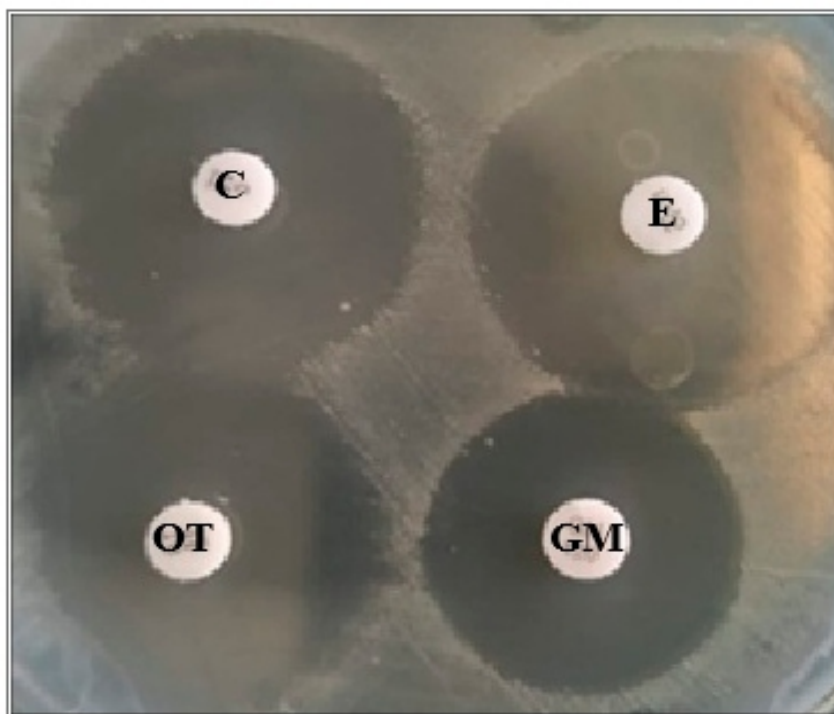


Figura 4. Halo de inhibición: C) Cloranfenicol; E) Eritromicina; OT) Oxitetraciclina; GM) Gentamicina

Tabla V. Sensibilidad antibiótica de bacterias con potencial probiótico frente a cuatro antibióticos

Antibióticos	$\mu\text{g}/\text{disc}$	Halo de inhibición (mm)		
		IM-011	IM-012	IM-013
Eritromicina	15	23.67 ± 0.57	25.17 ± 0.29	26.15 ± 0.27
Cloranfenicol	30	22.76 ± 0.36	21.15 ± 0.26	29.98 ± 0.32
Oxitetraciclina	30	21.32 ± 0.47	22.81 ± 0.31	31.63 ± 0.54
Gentamicina	120	23.19 ± 0.23	24.19 ± 0.17	26.33 ± 0.57
Sensible (S) > 20 mm				

Evaluación de la actividad antibacteriana mediante productos extracelulares (PECs) y contra bacterias patógenas

En la tabla VI, se observa que los productos extracelulares de los morfotipos seleccionados ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de la cepa patógena *S. agalataiae* en comparación con el control, demostrando que los aislados presentan potencial de actuar como agentes inhibidores frente a este tipo de patógeno y se perfilan como bacterias con potencial probiótico.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Tabla VI. Análisis de Competitividad: Cepas Aisladas del Intestino Medio de Tilapia Nilótica (*O. niloticus*) frente a Cepa Patógena (*S. agalactiae*)

	Absorbancia (600nm)			
	0 horas	4 horas	8 horas	12 horas
IM-O11 + <i>S. agalactiae</i>	0.502	0.478	0.480	0.482
IM-O12 + <i>S. agalactiae</i>	0.477	0.469	0.490	0.483
IM-O13 + <i>S. agalactiae</i>	0.470	0.510	0.499	0.495
Control (<i>S. agalactiae</i>)	0.527	0.641	0.852	0.96

Determinación de la actividad antibacteriana mediante la técnica de pozos en agar

En este ensayo, se determinó la capacidad inhibitoria de los productos extracelulares (PECs) derivados de las bacterias aisladas (IM-011, IM-012, IM-013) frente a *S. agalactiae*. Este efecto se visualizó mediante la formación de halos de inhibición alrededor de los pozos en el agar. Un halo de inhibición superior a 10 mm indica una alta capacidad de los morfotipos seleccionados para inhibir el crecimiento de *S. agalactiae*, lo que fortalece la evidencia de su impacto antimicrobiano, figura 5.

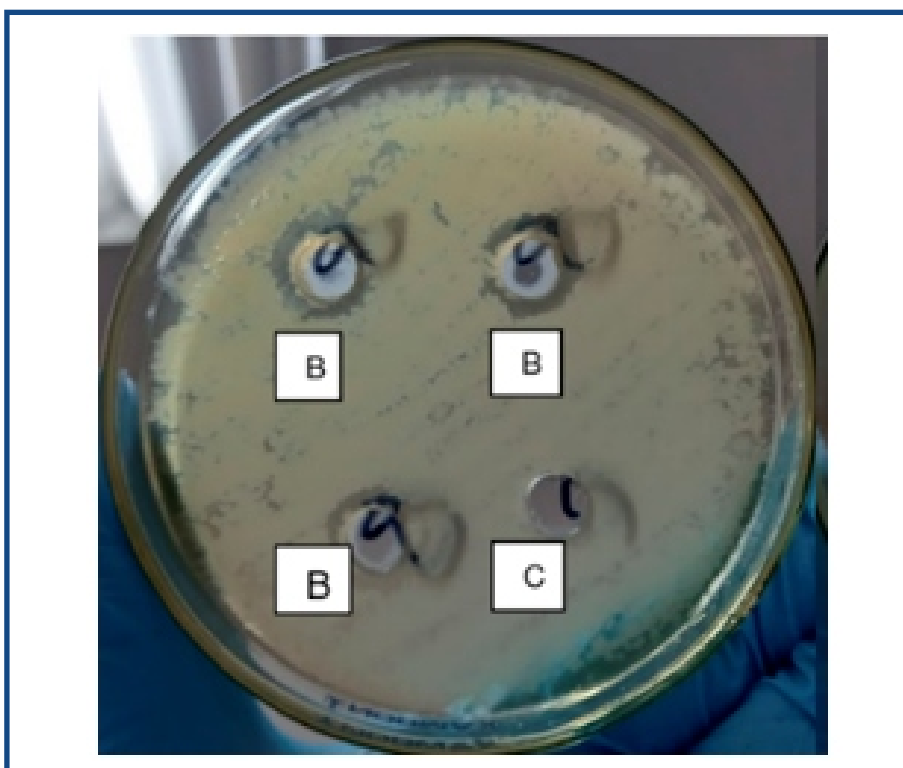


Figura 5. Determinación de la actividad antibacteriana mediante la técnica de pozos en agar frente a *S. agalactiae*. B: productos extracelulares (PECs) de los morfotipos IM-011; IM-012; IM-013, C: control (caldo TSB).



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Ensayo de antagonismo

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Esto indica que, por lo menos uno de los tratamientos establecidos produjo un efecto inhibitor sobre la bacteria patógena *S. agalactiae*. En la figura 6, se observa el diámetro del halo de inhibición obtenido con los tres morfotipos bacterianos: P1 = IM-011, P2 = IM-012 y P3 = IM-013. Los tratamientos correspondieron a las diferentes combinaciones entre la concentración del probiótico y la concentración de *S. agalactiae*: T1 (1×10^6 UFC mL^{-1} probiótico + 1×10^6 UFC mL^{-1} patógeno), T2 (1×10^7 UFC mL^{-1} probiótico + 1×10^6 UFC mL^{-1} patógeno), T3 (1×10^6 UFC mL^{-1} probiótico + 1×10^7 UFC mL^{-1} patógeno) y T4 (1×10^7 UFC mL^{-1} probiótico + 1×10^7 UFC mL^{-1} patógeno). El T2 con el morfotipo IM.012 (P2) presentó una mayor inhibición del patógeno, mientras que el T3 con el morfotipo IM-013 (P3) registró el menor diámetro del halo de inhibición con valores inferiores a 20 mm (círculo rojo).

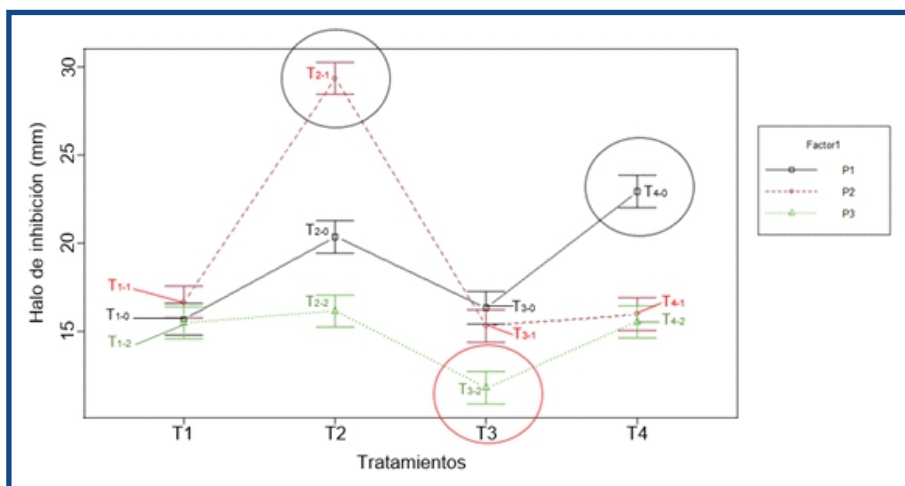


Figura 6. Representación de los factores y sus interacciones sobre la media del diámetro del halo

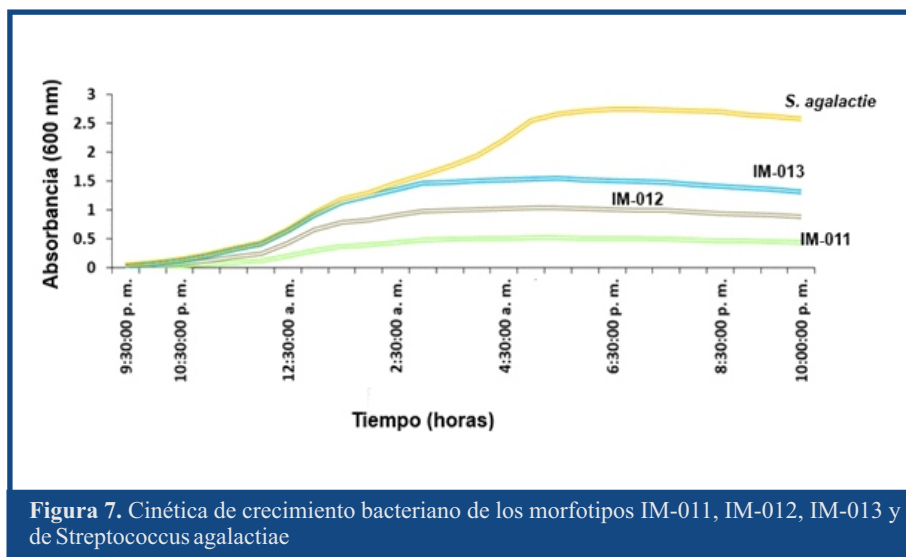
Cinética de crecimiento de los morfotipos aislados y bacteria patógena

En la figura 7, describe el comportamiento del crecimiento de los morfotipos IM-011, IM-012, IM-013 y *S. agalactiae*. La fase exponencial de los aislados inició aproximadamente a las tres horas de incubación. El aislado IM-011 presentó los valores de absorbancia más bajos, mientras que *S. agalactiae* mostró un incremento de absorbancia más prolongado antes de alcanzar la fase estacionaria.



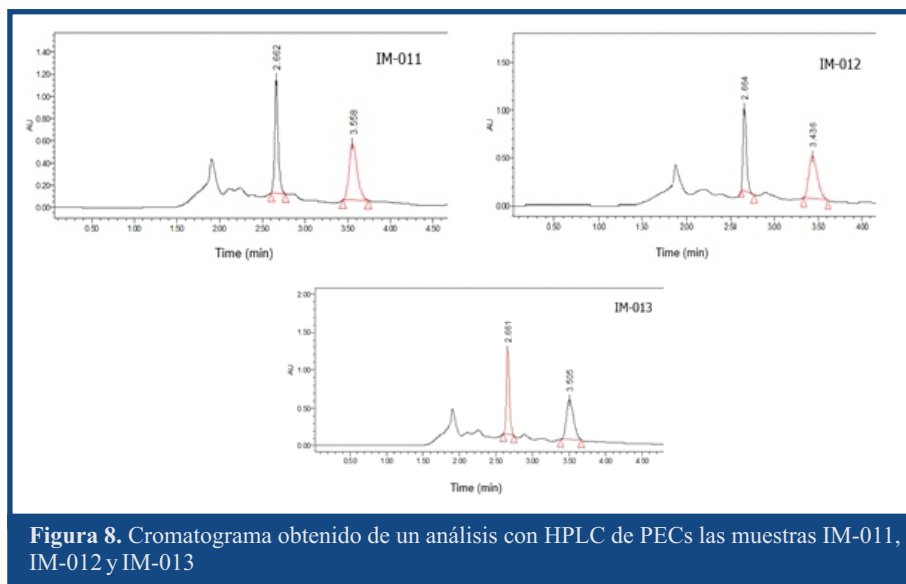
OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



Análisis de los extractos bacterianos

El análisis cromatográfico de los extractos extracelulares de los morfotipos (IM-011, IM-012 y IM-013) se presenta en la figura 8. Se detectó la presencia de ácido acético y ácido láctico en las muestras (IM-011, IM-012 y IM-013), indicando una composición química similar en términos de estos dos compuestos. La combinación de ácido acético y ácido láctico en las muestras presenta un punto positivo para el empleo de los morfotipos como posibles probióticos, lo anterior teniendo en cuenta que este tipo de ácidos generan inhibición en el crecimiento de bacterias patógenas.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



Identificación molecular de las cepas seleccionadas

El resultado del secuenciamiento de los aislados probióticos comparado con la base de datos pública del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), muestra lo siguiente: IM-011 es identificado como *Bacillus cereus*, con un porcentaje de identidad del 93.37%; IM-012 como *Bacillus thuringiensis*, con un 93.4%; e IM-013 como *Brevibacterium casei*, con un 88.2% de identidad

► DISCUSIÓN

La selección de bacterias con potencial probiótico provenientes del tracto gastrointestinal de *O. niloticus* constituye una estrategia de creciente interés en acuicultura debido a la necesidad de reducir la dependencia de antibióticos y limitar la aparición de resistencia antimicrobiana en sistemas intensivos de producción. Diversos autores han señalado que el uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura favorece la selección de cepas resistentes y genera impactos ambientales y sanitarios relevantes (Serrano, 2005; Suzuki et al., 2017). En este contexto, los probióticos se han propuesto como una alternativa biológica orientada al control preventivo de enfermedades infecciosas (Defoirdt et al., 2011; Hai, 2015). Lo anterior adquiere especial importancia frente a *S. agalactiae*, agente etiológico ampliamente asociado a episodios de estreptococosis en tilapia y reconocido como una de las principales limitantes sanitarias de la acuicultura intensiva (Mian et al., 2009; Li et al., 2015; Zé Zhang, 2021). En Colombia, incluso, el ICA declaró una emergencia sanitaria por la presencia de *S. agalactiae* en sistemas productivos piscícolas (ICA, 2023), lo cual refuerza la pertinencia del presente estudio.

Los resultados obtenidos permitieron aislar y seleccionar morfotipos bacterianos con características compatibles con bacterias potencialmente probióticas, en particular cepas relacionadas con los géneros *Bacillus* y *Brevibacterium*. La predominancia de bacilos Gram positivos coincide con lo reportado por Martínez-Cruz et al. (2012) y Kaynar y Beyatli (2009), quienes describen que el género *Bacillus* representa uno de los grupos bacterianos más frecuentemente aislados



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



del intestino de peces debido a su elevada capacidad de adaptación fisiológica y formación de esporas. De manera similar, estudios previos en tilapia realizados por Ibargüen et al. (2019) y Palacios y Rivas (2019) reportaron la obtención de morfotipos con morfologías coloniales comparables a las observadas en este trabajo, incluyendo colonias convexas, circulares o irregulares, de tonalidades blancas o crema y características bacilares Gram positivas. En el presente estudio, la utilización de agar MacConkey como criterio de exclusión permitió descartar morfotipos con crecimiento compatible con bacterias Gram negativas potencialmente patógenas. Aunque este criterio no garantiza por sí mismo inocuidad biológica, sí constituye un filtro preliminar relevante considerando que numerosas bacterias Gram negativas multirresistentes representan actualmente un problema sanitario importante en sistemas acuáticos (Fariñas y Martínez-Martínez, 2013). En este sentido, la selección posterior de cepas Gram positivas buscó priorizar bacterias compatibles con perfiles fisiológicos históricamente asociados a aplicaciones probióticas en acuicultura.

La ausencia de actividad hemolítica observada en los nueve morfotipos seleccionados constituye uno de los principales criterios de seguridad descritos en la literatura para la evaluación preliminar de probióticos. Resultados similares fueron reportados por Palacios y Rivas (2019) y por Quevedo (2020), quienes encontraron hemólisis de tipo gamma en cepas aisladas de peces con potencial probiótico. Según Gutiérrez (2016), la ausencia de hemolisinas constituye un criterio deseable, ya que reduce la probabilidad de efectos patogénicos asociados al uso de bacterias vivas en organismos acuáticos. No obstante, aunque este resultado sugiere un perfil de seguridad favorable en condiciones in vitro, la ausencia de hemólisis no excluye por completo otros posibles factores de virulencia, particularmente en especies cercanas a grupos bacterianos con antecedentes clínicos descritos en otros hospedadores.

Respecto a la tolerancia a pH ácido, las cepas IM-011, IM-012 e IM-013 presentaron los mayores porcentajes de supervivencia bajo condiciones extremas de acidez. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Quevedo (2020), quien seleccionó cepas resistentes a condiciones de estrés ácido como criterio de viabilidad probiótica. Del mismo modo,



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

Balcázar et al. (2008) señalaron que la tolerancia al pH ácido representa una característica funcional importante debido a la variabilidad fisiológica del tracto digestivo de tilapia, cuyos valores pueden oscilar entre pH 2.5 y 8. Las diferencias observadas entre morfotipos podrían estar asociadas a variaciones metabólicas relacionadas con la producción de ácidos orgánicos y mecanismos de regulación intracelular, tal como sugieren Estela et al. (2007) y Cueto-Vigil et al. (2010), Fimbres-Acedo et al. (2026). En contraste, Lucano (2011) reportó cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* incapaces de sobrevivir a pH 2, lo que evidencia que la resistencia a condiciones ácidas no es uniforme entre las bacterias intestinales de peces y probablemente depende tanto de la especie hospedera como de las características fisiológicas de cada aislado bacteriano. Aun así, debe considerarse que la supervivencia observada en este estudio corresponde exclusivamente a condiciones *in vitro* y no necesariamente refleja la complejidad del ambiente gastrointestinal *in vivo*.

En cuanto a la sensibilidad antimicrobiana, los morfotipos seleccionados fueron sensibles a eritromicina, cloranfenicol, amoxicilina y gentamicina. Este hallazgo resulta relevante, dado que la resistencia antimicrobiana ha sido reconocida por la OMS como una de las principales amenazas para la salud pública global (OMS, 2021). Diversos autores han indicado que los probióticos destinados a aplicaciones acuícolas deben presentar sensibilidad a antibióticos para minimizar el riesgo de transferencia horizontal de genes de resistencia (Ferreira et al., 2001). Estudios realizados por Ibargüen et al. (2019) y Quevedo (2020) reportaron resultados similares, con sensibilidad frente a varios antibióticos de uso frecuente en acuicultura. No obstante, el hecho de que una cepa sea sensible en ensayos fenotípicos no descarta completamente la presencia de determinantes genéticos asociados a resistencia, por lo que análisis moleculares complementarios serían necesarios para evaluar este aspecto con mayor precisión.

Uno de los hallazgos más relevantes del estudio fue la actividad antagonista observada frente a *S. agalactiae* mediante productos extracelulares y ensayos de difusión en agar. Los halos de inhibición superiores a 20 mm, registrados principalmente para IM-011 e IM-012,

**OPEN ACCESS**

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

sugieren una importante capacidad inhibitoria en condiciones experimentales controladas. Resultados comparables fueron descritos por Haridas y Pillai (2019), quienes reportaron halos de inhibición de 26 mm producidos por cepas de *B. thuringiensis* frente a *Aeromonas hydrophila*, así como por Kuebutornye et al. (2019) y Nakharuthai et al. (2023), quienes documentaron actividad antagonista de *Bacillus spp.* frente a *S. agalactiae* y otros patógenos de peces. En este trabajo, la detección cromatográfica de ácido láctico y ácido acético coincide con lo descrito por Nayak (2010), Ibrahim (2015) y Tinh et al. (2008), quienes señalan que la producción de ácidos orgánicos constituye uno de los mecanismos más frecuentes mediante los cuales los probióticos limitan el crecimiento de bacterias patógenas. Sin embargo, el presente estudio no permite determinar si la inhibición observada depende exclusivamente de dichos compuestos o si intervienen mecanismos adicionales como producción de bacteriocinas, competencia por nutrientes o interferencia en sistemas de *quorum sensing*, mecanismos previamente descritos para bacterias del género *Bacillus* (Brown, 2011; Nayak, 2010; Avila-Castillo et al. 2026).

La mayor inhibición observada cuando las concentraciones probióticas superaron las del patógeno también coincide con lo señalado por Verschuere et al. (2000) y Hai (2015), quienes destacan que la competencia por nutrientes y espacio constituye un mecanismo ecológico fundamental en la actividad probiótica. En contraste, cuando la concentración de *S. agalactiae* fue elevada, la capacidad inhibitoria disminuyó, lo cual podría reflejar limitaciones competitivas bajo escenarios de alta carga bacteriana. Este comportamiento es consistente con estudios experimentales de infección realizados por Delannoy et al. (2014), Abuseliana et al. (2011) y Sukhavachana et al. (2019), donde altas concentraciones de *S. agalactiae* generaron elevadas tasas de mortalidad en tilapia. No obstante, los resultados del presente estudio deben interpretarse únicamente como evidencia de antagonismo *in vitro* y no como demostración directa de protección clínica frente a infección.

La identificación molecular reveló afinidad de las cepas seleccionadas

**OPEN ACCESS**

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original

con *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Brevibacterium casei* (IM-011, IM-012 y IM-013, respectivamente). Estos hallazgos son parcialmente consistentes con reportes previos en los que especies del género *Bacillus* han sido aisladas del intestino de peces y evaluadas como probióticos potenciales (Kaynar y Beyatli, 2009; Soltani et al., 2019). Estudios han demostrado que las especies de *Bacillus* pueden producir metabolitos antimicrobianos, enzimas extracelulares y compuestos capaces de modular las respuestas inmunológicas en organismos acuáticos (Docando et al., 2021; Vine et al., 2006). En el caso específico de *Brevibacterium casei*, Kiran (2014) reportó la producción de polihidroxibutirato con actividad antiadhesiva frente a bacterias patógenas, lo que podría explicar parcialmente el efecto antagonista observado en IM-013. Sin embargo, debe señalarse que los porcentajes de identidad molecular obtenidos fueron moderados, particularmente para IM-013, por lo que la asignación taxonómica debe considerarse preliminar y requeriría análisis filogenéticos complementarios para su confirmación definitiva.

Esta investigación aporta evidencia sobre la existencia de bacterias autóctonas de *O. niloticus* con características compatibles con potencial probiótico y actividad antagonista frente a *S. agalactiae*. El principal aporte radica en la integración de criterios morfológicos, fisiológicos, antagonistas y moleculares para la selección de cepas provenientes del propio hospedero, un aspecto todavía limitado en sistemas acuícolas tropicales. Entre las fortalezas del estudio destaca el uso de múltiples pruebas de selección y la evaluación específica frente a un patógeno de alta relevancia sanitaria en tilapia. Sin embargo, las limitaciones incluyen el carácter exclusivamente *in vitro* de los ensayos, el número reducido de aislados seleccionados y la ausencia de validaciones funcionales *in vivo* relacionadas con colonización intestinal, respuesta inmune o desempeño zootécnico. Por ello, aunque los resultados sugieren un potencial biotecnológico promisorio, cualquier extrapolación hacia aplicaciones comerciales o sanitarias debe realizarse con cautela hasta contar con evaluaciones experimentales en organismos vivos y bajo condiciones productivas reales.

**OPEN ACCESS**

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



► CONCLUSIONES

En la presente investigación, las cepas *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Brevibacterium casei* presentaron características compatibles con un potencial probiótico y una actividad antagonista *in vitro* frente a *S. agalactiae*. Se sugiere incluir en futuras investigaciones evaluaciones de seguridad a largo plazo, considerando los efectos sobre la función hepática, la integridad intestinal y/o el estrés oxidativo. Bajo el escenario de un experimento *in vivo*, se recomienda explorar la posibilidad de combinar consorcios probióticos, o también considerar prebióticos o microencapsular la cepa para mejorar su viabilidad durante el almacenamiento y la administración, tomando en cuenta que la eficacia probiótica es altamente sensible a la forma de suministro. Estas recomendaciones constituyen una guía para avanzar hacia la aplicación responsable y científica de probióticos bacterianos en acuicultura, fortaleciendo las estrategias de prevención sanitaria y sostenibilidad en la producción de tilapia nilótica.

► AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado con fondos del Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño. Los autores expresan su gratitud al Programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la misma universidad. Queremos expresar nuestro especial agradecimiento a los revisores anónimos que nos han ayudado a mejorar sustancialmente el manuscrito.

► LITERATURA CITADA

Abarra, S. T., Maulu, S., Odu-Onikosi, S. G., Momoh, T. A., Eynon, B., Emery, M., Rawling, M., & Merrifield, D. L. (2025). *In Vitro* and *In Vivo* evaluation of autochthonous probiotics and their effects on the mucosal health of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals*, 15(22), 3296. doi: 10.3390/ani15223296.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Abd El-Ghany, W. A. (2024).** Applications of organic acids in poultry production: an updated and comprehensive review. *Agriculture*, 14(10), 1756. doi: 10.3390/agriculture14101756.
- Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Nader, M. M., Salem, H. M., El-Tahan, A. M., Soliman, S. M., & Khafaga, A. F. (2022).** Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biometeorology*, 66(11), 2183-2194. doi: 10.1007/s00484-022-02347-6.
- Abuseliana, A. F., Daud, H. H. M., Aziz, S. A., Bejo, S. K., & Alsaid, M. (2011).** Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from a fish farm in Selangor to juvenile red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(7), 914-919. doi: 10.3923/javaa.2011.914.91.
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., & Mohamed, M. F. (2008).** Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277(1), 1-6. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.02.021.
- Algammal, A. M., Mabrok, M., Almessiry, B. K., Atwah, B., Al-Otaibi, A. S., Mohamed, Y. S., Steele, S., Enany, M., Dayrit, G. B., Yousseff, F., & Hashem, M. E. A. (2025).** Unraveling the pathogenic potential, virulence traits, and antibiotic resistance genes of multidrug-resistant *Streptococcus agalactiae* strains retrieved from Nile tilapia. *BMC microbiology*, 25(1), 629. doi: 10.1186/s12866-025-04405-6.
- Anokyewaa, M. A., Wang, Z., Amenyogbe, E., Lu, Y., & Zhen, G. (2026).** Impacts of probiotics on microbial populations in aquaculture systems. *Microbial Ecology*, 89, 94. doi: 10.1007/s00248-026-02710-9.
- Arroyo, P. L. C., Hurtado, C. A. B., & Pérez, E. P. (2018).** Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2), 438-449. doi: 10.15381/rivep.v29i2.14482.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



Avila-Castillo RA, Del Rio-Rodriguez RE, Soto-Rodriguez SA, Navarro-Flores J, Cu-Escamilla AD, Marrujo-Lopez FI, Aguilar-Rendon KG, Gomez-Solano MI.(2026) Confirmed outbreaks of streptococcosis caused by *Streptococcus agalactiae* serotype ia in nile tilapia culture from Campeche, Mexico. *J Fish Dis.* 2026 Aug;49(8):e70159. doi: 10.1111/jfd.70159. Epub. Mar 17. PMID: 41844281.

Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., & Muzquiz, J. L. (2007). Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), 185-193. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00294.x.

Bertaglia, E. D. A., Furtado, W. E., Silva e Souza, Â. T., Fernandes, M. C., Pereira, S. A., Brasil, E. M., Pedreira, J. L., Tomas, G., & Martins, M. L. (2023). Influence of seasonality and culture stage of farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with monogenean parasitic infection. *Animals*, 13(9), 1525. doi: 10.3390/ani13091525.

Bhatnagar, A., & Lamba, R. (2017). Molecular characterization and dosage application of autochthonous potential probiotic bacteria in *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 11(2), 46-56.

Calcagnile, M., Tredici, S. M., & Alifano, P. (2024). A comprehensive review on probiotics and their use in aquaculture: Biological control, efficacy, and safety through the genomics and wet methods. *Heliyon*, 10(24), e40892. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e40892.

Canosa, A. (2003). Prácticas guías: Microbiología. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Biología Marina, Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

Chakma, S., Barua, H., Akter, A., Afroze, S., Faisal, M., & Khan, M. N. A. (2025). Isolation and identification of pathogenic bacteria present in commercially important fish, shellfish, water, and soil samples of Kaptai Lake, Bangladesh. *Environmental Microbiology Reports*, 17(6), e70252.

**OPEN ACCESS**

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Chemlal-Kherraz, D., Sahnouni, F., Matallah-Boutiba, A. & Boutiba, Z. (2016).** El potencial probiótico de los lactobacilos aislados del intestino de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Africana de Biotecnología*, 11 (68), 13220–13227. doi:10.5897/ajb12.748
- Chizhayeva, A., Amangeldi, A., Oleinikova, Y., Alybaeva, A., & Sadanov, A. (2022).** Lactic acid bacteria as probiotics in sustainable development of aquaculture. *Aquatic Living Resources*, 35, 10. doi: 10.1051/alr/2022011.
- Cueto-Vigil, M. C., Acuña-Monsalve, Y., & Valenzuela-Riaño, J. (2010).** *In vitro* evaluation of probiotic potential of lactic bacteria acid isolated from coastal serum. *Actualidades Biológicas*, 32(93), 129-138.
- Comité de ética en investigación. (2011).** Acuerdo 001 Por la cual se adiciona dos parágrafos al artículo 9 del Acuerdo 001 de 2011. *UDENAR*. <https://www.udenar.edu.co/recursos/wp-content/uploads/2021/03/Anexo-9.-Reglamento-Comite-de-etica-1.pdf>.
- Coulibaly, W. H., Kouadio, N. G. R., Camara, F., Diguță, C., & Matei, F. (2023).** Functional properties of lactic acid bacteria isolated from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Ivory Coast. *BMC microbiology*, 23(1), 152. doi: 10.1186/s12866-023-02899-6.
- Elsegeny, S. R., Radwan, F. S., Elshamy, Y. M., Amer, S. M., Mohamed, R. A., Shokrak, N. M., & Abdella, B. (2025).** A comprehensive overview of probiotics in aquaculture: from efficacy evaluation to diverse applications. *Annals of Microbiology*, 75(1), 35. doi: 10.1186/s13213-025-01825-7.
- Fachri, M., Amoah, K., Huang, Y., Cai, J., Alfatat, A., Ndandala, C. B., Shija, V. M., Jin, X., Bissih, F., & Chen, H. (2024).** Probiotics and paraprobiotics in aquaculture: a sustainable strategy for enhancing fish growth, health and disease prevention-a review. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1499228. doi: 10.3389/fmars.2024.1499228.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Fimbres-Acedo YE, Maeda-Martínez AN, Garza-Torres R. (2025).** Tilapia diseases reported in Mexico: A Systematic Review. *J Fish Dis.* Jun;48(6):e14105. doi: 10.1111/jfd.14105. Epub 2025 Feb 22. PMID: 39985448.
- Fitriadi, R., Nurhafid, M., Palupi, M., Riady, R. M., Amin, M., & Sukardi, P. (2026).** Isolation and screening of probiotics candidates from the intestinal tracts of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 39(4), 789-799. doi: 10.33899/ijvs.2025.155405.4039.
- Guimarães, M. C., Cerezo, I. M., Fernandez-Alarcon, M. F., Natori, M. M., Sato, L. Y., Kato, C. A., Moriñigo, M.A., Tapia, S., Dias, S., Ishikawa, C. M., Ranzani, M. J., Cassiano, L. L., Bach, E. E., Clissa, P. B., Orefice, D. P., & Tachibana, L. (2022).** Oral administration of probiotics (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*) in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) vaccinated and challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fishes*, 7(4), 211. doi: 10.3390/fishes7040211.
- Haridas, D & Pillai, D. (2012).** Evaluation of quorum quenching and probiotic activity of *Bacillus thuringiensis* QQ17 isolated from fish culture pond. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(05):1634-1649. doi: 10.20546/ijcmas.2019.805.189
- Hoseinifar, S. H., Faheem, M., Liaqat, I., Van Doan, H., Ghosh, K., & Ringø, E. (2024).** Promising probiotic candidates for sustainable aquaculture: An updated review. *Animals*, 14(24), 3644. doi: 10.3390/ani14243644.
- Hosseinzadeh, M., Esfahani, D. E., Ahmadifar, E., Ahmadifar, M., Moghadam, M. S., Mohammadzadeh, S., & El-Haroun, E. (2025).** Improving health and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio*): The role of *Saccharomyces boulardii* and *Lactobacillus rhamnosus* and their combination. *Animal Feed Science and Technology*, 327, 116435. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2025.116435.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Ibrahem, M. D. (2015).** Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent perspectives. *Journal of advanced research*, 6(6), 765-791. doi: 10.1016/j.jare.2013.12.004.
- Kuebutornye, F. K., Lu, Y., Abarike, E. D., Wang, Z., Li, Y., & Sakyi, M. E. (2020).** *In vitro* assessment of the probiotic characteristics of three *Bacillus* species from the gut of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(2), 412-424. doi: 10.1007/s12602-019-09562-5.
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D. K., & Sarkar, U. K. (2016).** Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24(4), 342-368. doi: 10.1080/23308249.2016.1193841.
- Lalitha, N., Ambasankar, K., Thirugnanamurthy, S., Tomy, S., Suganya, P. N., Raja, R. A., Kumar, S., Nanthini, R., & Lunghar, O. (2025).** Effect of dietary supplementation of *Lactiplantibacillus plantarum* probiotics as functional feed additive in pacific white shrimp (*Peneaus vannamei*). *Aquaculture International*, 33(5), 348. doi: 10.1007/s10499-025-02023-7.
- Lasik-Kurdyś, M., & Sip, A. (2019).** Evaluation of the antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substances of enological importance produced by *Oenococcus oeni* isolated from wine. *Eur Food Res Technol*, 245, 375-382. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3169-2>.
- Macfaddin, J. F. (2003).** *Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Machnik, P., Biazar, N., & Schuster, S. (2023).** Recordings in an integrating central neuron reveal the mode of action of isoeugenol. *Communications Biology*, 6(1), 309. doi: 10.1038/s42003-023-04695-4.
- Mahmud, M. N., Ansary, A. A., Ritu, F. Y., Hasan, N. A., & Haque, M. M. (2025).** An Overview of fish disease diagnosis and treatment in aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture Journal*, 5(4), 18. doi: 10.3390/aquacj5040018.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Matee, M. I. (2026).** A scoping review of antimicrobial use, residues, and resistance in African aquaculture: Evidence, gaps, and emerging interventions (2020–2025). *Bulletin of the National Research Centre*, 50(1), 16. doi: 10.1186/s42269-026-01399-7.
- Mahmoodian, S., Meimandipour, A., Faeed, M., Shamsara, M., Fatemi, S. S. A., Ghasemi, M., & Chaharmahali, M. (2025).** Dietary probiotic prototypes and their effects on growth performance, immune function, and gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in Veterinary Science*, 193, 105808. doi: [10.1016/j.rvsc.2025.105808](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105808).
- Ministerio de Salud de Colombia. (1993).** Resolución 8340: Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. *MinSalud*. https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/lists/biblioteca_digital/ride/de/dij/resolucion-8430-de-1993.pdf.
- Mohammed, E. A. H., Ahmed, A. E. M., Kovács, B., & Pál, K. (2025).** The significance of probiotics in aquaculture: a review of research trend and latest scientific findings. *Antibiotics*, 14(3), 242. doi: 10.3390/antibiotics14030242.
- Montero-Recalde, M., Vayas, L., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño, P., & Erazo-Gutierrez, V. (2018).** Evaluation of two methods for measuring the sensitivity of growth inhibition of the certified *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain. 29(4), 1543-1547.
- Moustafa, E. M., Farrag, F. A., Dawood, M. A., Shahin, K., Hamza, A., Decamp, O., Mohamed, R., Elsabagh, M., Eltholth, M., & Omar, A. A. (2021).** Efficacy of *Bacillus* probiotic mixture on the immunological responses and histopathological changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) challenged with *Streptococcus iniae*. *Aquaculture Research*, 52(5), 2205-2219. doi: 10.1111/are.15073.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015).** *Medical Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Niveditha, D., Sethu, M., Rashid, M. N., Deepa, J., Sini, H., & Govindan, N. K. (2025).** Evaluation of the Probiotic Potential of *Bacillus velezensis* SNR14-4 Strain from Nile Tilapia Gills Using Genomic and *In Vitro* Approach. *Ars Pharmaceutica*, 66(2), 152-173. doi:10.30827/ars. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03402.x.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (US). (2006).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved Standards. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., & Austin, B. (2007).** *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1699-1706. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03402.x.
- Ntakirutimana, R., Rahiman, K. M. M., Farhath, A. A., Lovejan, M., & Jijina, M. P. (2025).** From antibiotics to probiotics: Sustainable disease management in Nile tilapia aquaculture. *Advanced Gut & Microbiome Research*, 2025(1), 5144977. doi: 10.1155/agm3/5144977.
- Noguera Segura, C., & Villamil Díaz, L. M. (2009).** Aislamiento, identificación y valoración In vitro del potencial probiótico de cepas bacterianas nativas de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). [Tesis de Licenciatura, Universidad Jorge Tadeo Lozano]. Repositorios Latinoamericanos. uchile.cl/handle/2250/2250693.
- Ortega Villota, L., & Fuertes Romero, K. (2015).** *Evaluación de bacterias con potencial probiótico en la alimentación de larvas de camarón blanco (Litopenaeus vannamei) en el Municipio de Tumaco* [Tesis de Licenciatura, Universidad de Nariño]. Repositorio Institucional UDENAR. udenar.edu.co/1106/.
- Palacios Quintanilla, J. R., & Rivas Hernández, E. A. (2019).** *Aislamiento y caracterización de bacterias acidolácticas (BAL) obtenidas de Oreochromis niloticus (Tilapia) cultivadas en jaulas flotantes en el Lago de Ilopango El Salvador* [Tesis de Licenciatura, Universidad del Salvador]. Repositorio Institucional UES. ues.edu.sv.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Pereira, W. A., Mendonça, C. M. N., Urquiza, A. V., Marteinsson, V. P., LeBlanc, J. G., Cotter, P. D., Villalobos, F. E., Romero, J., & Oliveira, R. P. (2022). Use of probiotic bacteria and bacteriocins as an alternative to antibiotics in aquaculture. *Microorganisms*, 10(9), 1705. doi: 10.3390/microorganisms10091705.
- Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245. doi: 10.1016/S0213-005X(04)73073-6.
- Rodríguez-Hernández, M. E., Martínez-Castellanos, G., López-Méndez, M. C., Reyes-Gonzalez, D., & González-Moreno, H. R. (2025). Production costs and growth performance of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in intensive production systems: A review. *Sustainability*, 17(4), 1745. doi: 10.3390/su17041745.
- Rodríguez, L. M. Z. (2005). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Girona]. Repositorio Institucional. dialnet.unirioja.es.
- Romanzini, G., & da Costa, C. P. (2023). Cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em tanques-rede: uma revisão de literatura. *JRG de Estudos Acadêmicos*, 6(13), 783-797. doi: 10.5281/zenodo.8039083.
- Roncando, C. S., & de Freitas, R. F. (2022). Supervivencia observada en tres familias de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) infectadas con *Streptococcus agalactiae*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 69(3), 236-244. doi: 10.15446/rfmvz.v69n3.103804.
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (63), 3064. doi: 10.3791/3064.
- Shields, P., & Cathcart (2010). *Oxidase test protocol*. American Society for Microbiology.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original



- Sudheesh, P. S., & Xu, H. S. (2001).** Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*, 196(1-2), 37-46. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00575-5.
- Szkop, M., & Bielawski, W. (2013).** A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(3), 683-691. doi: 10.1007/s10482-012-9838-4.
- Tayyab, M., Islam, W., Waqas, W., & Zhang, Y. (2025).** Probiotic–vaccine synergy in fish aquaculture: exploring microbiome-immune interactions for enhanced vaccine efficacy. *Biology*, 14(6), 629. doi: 10.3390/biology14060629.
- Võ, T. C., Võ, T. T. B., Mai, H. Đ., Bạch, A. B., Lê, T. H., & Võ, V. T. (2024).** Effects of dietary supplementation with probiotics on growth performance, gut health and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, 23(1), 88-99. doi: 10.52997/jad.SI1.08.2024.
- Vulla, K. E., Mmanda, F. P., Nyangoko, B. P., & Makule, E. E. (2024).** Unlocking potential benefits on applications of probiotics in inland aquaculture industry: A review. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 4(6), e70027. doi: 10.1002/aff2.70027.
- Xiong, J. B., Nie, L., & Chen, J. (2018).** Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity. *Zoological research*, 40(2), 70. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.069.



OPEN ACCESS

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir igual (CC BY-NC-SA 4.0), que permite compartir y adaptar siempre que se cite adecuadamente la obra, no se utilice con fines comerciales y se comparta bajo las mismas condiciones que el original