

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS DE TILAPIAS (*Oreochromis niloticus*) CON POTENCIAL USO PROBIÓTICO PARA LA CRÍA Y LEVANTE DE ESPECIES DE INTERÉS ACUÍCOLA.

A. Ibargüen<sup>1</sup>, T. Ocampo<sup>1</sup>, K. Garcés<sup>1</sup> y M. Córdoba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Náutico Pesquero-CNP, SENA, E-invatec, Buenaventura-Colombia

aoibarguen@misena.edu.co; tocampo@sena.edu.co.

**Palabras claves:** Probióticos aislamiento, Tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*.

## RESUMEN

**E**n este trabajo se buscó potencializar el uso de bacterias nativas provenientes de aislados microbiológicos de tilapia *Oreochromis niloticus* como suplemento probiótico para disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por la elevada mortalidad debido a la presencia de agentes infecciosos, fúngicos y virales. Para ello, se seleccionaron los órganos: Branquias, intestinos, gónadas e hígado para la obtención de los microorganismos, inicialmente se realizaron frotis directos y disoluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  que fueron sembradas en Agar Triptona-Soja (TSA) y Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Se seleccionaron las branquias y los intestinos como órganos para el aislamiento de bacterias potencialmente probióticas. Una vez sembradas, aisladas y purificadas las bacterias por sus características físicas como, forma de colonia, color y margen, se procedió a la caracterización biológica (Tinción de Gram) y bioquímica, a través de la prueba de catalasa y las pruebas prefabricadas API E 20. De los 82 aislados se lograron preseleccionar 32 cepas autóctonas compatibles con género *Lactobacillus* y *Enterococcus* del intestino y branquias de tilapia *O. niloticus*, siendo coherente con que la abundancia en los morfotipos autóctonos de *O. niloticus*, está estrechamente relacionada con los productos extracelulares generados normalmente en su metabolismo. Para evaluar la capacidad inhibitoria, se llevó a cabo la prueba de entrecruzamiento contra los patógenos *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia ruckeri*, de igual forma, el antibiograma frente antibiótico ampliamente utilizados en la industria acuícola, como oxitetraciclina, eritromicina, ácido oxolínico, amoxicilina y florfenicol, de las cuales cinco cepas demostraron sensibilidad frente a cinco antibióticos de uso en acuicultura. Por otra parte, algunas bacterias pertenecientes a la microbiota autóctona de *O. niloticus*, aisladas principalmente de intestinos, tienen la capacidad de inhibir bacterias patógenas como *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia ruckeri* con halos de inhibición superiores a 6mm.

**E**n el mundo, la pesca y acuicultura siguen siendo fuente importante de nutrición e ingresos. Las especies de agua dulce, como la trucha y la tilapia, son responsables del incremento de la producción acuícola, representando un 60% de la producción total a nivel mundial [1]. En los últimos 40 años, se ha evidenciado un descenso importante en la obtención de recursos en el sector pesquero, lo que gradualmente afecta la captura y administración de los recursos para el sector con un enfoque sostenible. Frente a este panorama, la acuicultura surge como una opción originaria de soluciones que permite el control y ofrece un aumento en la oferta de alimentos con origen acuático a nivel mundial y local[2][3][4].

Asociado al crecimiento exponencial de la acuicultura, se han empezado a usar tecnologías más intensivas en los cultivos; esto, junto a la introducción de otras especies y cambios ambientales, han generado estrés y enfermedades en los peces. De hecho, las enfermedades de origen infeccioso son las que generan las mayores pérdidas económicas [5]. Se vienen aplicando diversas estrategias para poder controlar las enfermedades que afectan a las especies de cultivo, como es el uso de antibióticos de manera profiláctica en los estanques; sin embargo, el uso indiscriminado en cantidades o concentración y, de igual manera, la desinformación frente al uso adecuado, genera una fuerte coacción por parte de las bacterias, generando genes resistentes y cepas bacterianas multirresistentes, afectando gradualmente el bienestar de los animales cultivados y poniendo en riesgo de salud pública a los consumidores. Además, la biota propia del animal puede ser afectada por los antibióticos, esto involucra patógenos al igual que las bacterias que son benéficas para la salud del pez, provocando así una descompensación en la microbiota y mayor exposición a otras enfermedades [6][7].

En cuanto al desarrollo de la microbiota y la barrera intestinal, se va dando con el transcurso del tiempo después del nacimiento [8]. Inicialmente, la microbiota del intestino está conformada por especies facultativas, posteriormente, la modificación hacia una mayor proporción de anaerobios estrictos dependerá de la dieta de la especie, edad, ubicación geográfica, tratamiento con medicamentos, así como el bienestar del pez [9]. Actualmente, es aceptado que los peces tienen una microbiota intestinal específica que se vuelve estable al llegar a la etapa adulta, por consiguiente, aislar microorganismos propios de los peces, favorece su utilización como probióticos [10]. Es así como, diversos estudios, han establecido que los probióticos provocan efectos beneficiosos en el hospedador por medio de la ingesta en proporciones idóneas, mejorando la biota de los peces a través de la estimulación del sistema inmunológico, dando origen a

resistir diferentes patógenos causantes de diversas enfermedades, al igual que mejorando la calidad del agua por biorremediación [11][12].

El uso de probióticos está bien establecido desde hace muchos años, tanto en humanos como en animales de producción, principalmente con el uso de bacterias lácticas y levaduras. La introducción al sector acuícola ha ocurrido en los últimos años y se incrementa cada vez más, esto debido a los efectos positivos que confieren al hospedero: potencian el sistema inmune, disminuyen el número de microorganismos patógenos y mejoran tasas de crecimiento. Así mismo, se ha demostrado que promueven la actividad de ciertas enzimas digestivas, permitiendo obtener mejores índices de conversión [13]. De esta manera, los objetivos del presente estudio fueron aislar y caracterizar bacterias con potencial probiótico a partir de los morfotipos extraídos de la tilapia y determinar su actividad antagónica frente a patógenos de esta especie acuícola en condiciones de laboratorio.

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones de estudios marinos de la Universidad del Valle en convenio con el Centro Náutico Pesquero (SENA), y el laboratorio de investigaciones de la Universidad del Pacífico. Se capturaron 30 ejemplares (comprendido entre 150 – 200 g.) de sexo indistinto, con apariencia saludable y que no fuesen tratados con antibióticos. Los animales se aislaron y acondicionaron en tanques a una temperatura aproximada de 28°C, y con un sistema de aireación constante. A cada tanque se le realizaron recambios del 25% del volumen total de agua, cada día, esto con el propósito de evitar que se acumularan heces y materia orgánica generada por los ejemplares; durante su acondicionamiento, los peces fueron alimentados con pienso comercial por un periodo de 15 días. Los ejemplares fueron trasladados a los laboratorios de la Universidad del Pacífico, los cuales fueron sacrificados cumpliendo con los estándares de ética de manejo de animales. Antes del proceso de disección, se realizó una revisión exhaustiva frente a su comportamiento y las condiciones en que se encontraban en general sus extremidades, tegumentos y branquias.

## 2.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE DIFERENTES ÓRGANOS DE TILAPIA

La piel se desinfectó con etanol al 70% (p/v) y se diseccionó la cavidad peritoneal con bisturí estéril; en medio de cultivos selectivos, como el Agar Triptona-Soja (TSA) y Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) Merck®, ambos para el crecimiento bacteriano, se sembraron muestras obtenidas por frotis directamente en órganos como: branquias, gónada, hígado e intestino, y se empleó un asa estéril [14]. Posteriormente, se extrajo cada órgano y fueron homogeneizados en una disolución estéril al 0,9% de NaCl en un macerador estéril. Se realizaron diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , las cuales posteriormente se sembraron en cada medio de cultivo, se incubaron a temperatura ambiente las placas de TSA a 36°C las placas sembradas en agar MRS por un período de 24 a 48 h en condiciones aerobias, esto con el objetivo de encontrar la mayor cantidad de microorganismo viables por cada órgano. Una vez purificados y aislados los microorganismos, se procedió a congelarlos con el objetivo de aumentar la viabilidad de los cultivos, se utilizó en conjunto con el medio de cultivo TSA CALDO-Merck®, un crioprotector como el glicerol-Fisher Chemical® al 15% V/V y se preservaron a -20°C. Estas cepas, sirvieron como stocks para los ensayos posteriores, para así evitar las resiembras y la pérdida de características de estas.

## 2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y BIOQUÍMICA DE LOS MORFOTIPOS BACTERIANOS

A partir de los crecimientos bacterianos obtenidos en el proceso de siembra y aislamiento, se realizó la caracterización física y bioquímica de las cepas obtenidas desde las propiedades macroscópicas (tales como elevación, borde, color, textura, forma, tamaño, etc) y microscópicas (como tinción de Gram). Dentro de las características bioquímicas, se realizaron las comprobaciones necesarias para determinar las necesidades metabólicas de estas cepas, aplicando pruebas catalasa, oxidasa y API 20E-Bio-merieux®. Estas caracterizaciones, fueron un acercamiento a una identificación preliminar de las bacterias nativas aisladas.



## 2.3 SUSCEPTIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para realizar esta prueba, se llevaron a cabo dos técnicas: la prueba de entrecruzamiento y el antibiograma. A partir de estas pruebas, se buscó evidenciar el potencial probiótico de las bacterias nativas aisladas. Para la prueba de antibiograma, se emplearon cinco antibióticos los cuales fueron: florfenicol-MSD®, ácido oxolínico- BIO-RAD®, amoxicilina-Neoplex®, eritromicina-Eritrovet® y oxitetraciclina-Phibro®, obtenidos de manera comercial.

## 2.4 PRUEBA DE ENTRECruzAMIENTO O INHIBICIÓN POR CONTACTO FRENTE A PATÓGENOS

Para la prueba de entrecruzamiento o inhibición por contacto, se obtuvieron cultivos de patógenos como lo son la Aeromonas hydrophila y Yersinia ruckeri, a través de centros especializados que disponían de estos cultivos, y pertenecen al Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA. Se tomaron discos de agar MRS y TSA de 6 mm de diámetro con las bacterias lácticas previamente sembradas y aisladas, estas se colocaron sobre placas de Agar Mueller Hinton-Merck® con las bacterias patógenas antes mencionadas inoculadas; las placas Petri se incubaron a 35 °C durante 24 horas, posterior a este tiempo se procedió a realizar la lectura de los halos formados, se tuvo en cuenta el tamaño del halo de inhibición mínimo de 2mm como positivo para esta prueba.

# 03

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se obtuvieron recuentos viables de microorganismos a partir de los diferentes frotis y diluciones de órganos potenciales (Tabla 1), con el objetivo de determinar la presencia de posibles microorganismos con potencial probiótico. Los resultados reflejaron que los órganos que presentaban mayor recuento de microorganismos fueron las Branquias (B.I) y los Intestinos (In), los cuales obtuvieron resultados promedio de  $94,25 \times 10^3$  y  $90,75 \times 10^3$  UFC/g respectivamente. Las cepas aisladas fueron codificadas como Branquias (B), Hígado (H), Gónadas (G) e Intestinos (In), además teniendo en cuenta que los ejemplares estuvieron sometidos a cuestiones ambientales externas e internas.

Órgano	Ambiente	Recuento (UFC/g)
Branquias (B.I)	Interior	96x10 <sup>3</sup> ± 0,32
Branquias (B.E)	Exterior	92.5x10 <sup>3</sup> ±0,51
Hígado (H.I)	Interior	560 ±0,35
Hígado (H.E)	Exterior	39x10 <sup>3</sup> ±0,62
Gónadas (G.I)	Interior	1.2x10 <sup>3</sup> ±0,38
Gónadas (G.E)	Exterior	3.2x10 <sup>3</sup> ±0,73
Intestinos (In.I)	Interior	87x10 <sup>3</sup> ±0,51
Intestinos (In.E)	Exterior	94.5x10 <sup>3</sup> ±0,36

Tabla 1. Recuento de microorganismos viables en órganos potenciales.

A partir de 22 muestras de intestino y branquias de tilapias *Oreochromis niloticus*, se obtuvieron más de 82 aislados bacterianos, de los cuales, 32 compatibles macroscópicamente con bacterias lácticas: colonias pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con elevaciones de forma cóncava, con márgenes enteros, opacas, forma circular y ameboide, además sin pigmentos, sin embargo, sólo 12 presentaron características predominantes, con bordes circular definido y tonalidades Blancas-amarillas opacas, las cuales se purificaron y aislaron (Tabla 2).

CÓDIGO DE CEPA	MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS BACTERIANAS			
	FORMA	ELEVACIÓN	BORDE	COLOR
B.E5	Circular	Elevada	Circular	Blanca
B.I6	Circular	Cóncava	Circular	Naranja-amarilla
B.I14	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarilla
B.I16	Circular	Cóncava	Circular	Naranja fuerte
In.E17	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarilla
In.E20	Circular	Plana	Ondulado	Blanca-amarilla
I.In22	Circular	Plana	Ondulado	Amarilla
I.In1	Circular	Plana	Circular	Blanca
G.I1	Circular	Cóncava	Circular	Blanca
In.I10	Circular	Plana	Circular	Blanca
In.E12	Circular	Cóncava	Circular	Blanca
In.I18	Ameboide	Plana	Ondulado	Amarilla

Tabla 2. Morfología de colonias aisladas y purificadas.

Tabla 3. Caracterización fenotípica en base a criterios morfológicos y bioquímicos de las bacterias nativas aisladas.

Características	B.E5	B.I6	B.I14	B.I16	In.17	In.20	I.I22	I.I1	G.I1	I.I10	In.12	In.18
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Morfología:</b>												
<b>Bacilo</b>			+	+	+	+	+			+	+	+
<b>Coco</b>	+	+						+	+			
<b>Oxidasa</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Catalasa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>OF Glucosa:</b>												
<b>Oxidativo</b>	-	-	+	NC	-	+		-	-	+	NC	NC
<b>Fermentativo</b>	+	+	+	NC	+	NC	+	+	+	+	NC	NC
<b>ONPG</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>ADH</b>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
<b>LDC</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ODC</b>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>TDA</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Ureasa</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>CIT</b>	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>GEL</b>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>IND(Indol)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Utilización de:</b>												
<b>D-manitol</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Inositol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D-sorbitol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>L-ramnosa</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D-sacarosa</b>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>D-melibiosa</b>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
<b>Amigdalina</b>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<b>L-arabinosa</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
<b>Lactosa</b>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-

+: Positivo; -: Negativo; NC: No creció; ( ):Reacción lenta o tardía

Se destacan 8 aislados compatibles con el género *Lactobacillus* (bacilos cortos Gram positivos) y 4 aislados compatibles con el género *Enterococcus* (cocos Gram positivos) de los cuales, 1 cepa fue catalasa positiva, clasificándola como *Micrococcaceae*; mientras que las restantes, evidenciaron las pruebas con resultado negativo (Tabla 3). La presencia de oxidasa va muy relacionada con la producción de catalasa, pues es la enzima empleada para la degradación del peróxido de hidrógeno que se genera como resultado de la reducción del oxígeno. Las cepas aisladas B.I 14, I.In 10 e In.E 20 presentaron capacidad oxidativa frente a glucosa y su capacidad de fermentar sacarosa, Lactosa y L-arabinosa, un perfil de fermentación similar al género *Lactobacillus*. Por otra parte, las cepas B.E 5, I. In 1 y G.I 1, presentaron capacidad fermentativa frente la glucosa, lactosa, L-arabinosa, reflejan un perfil similar al de los *Enterococcus* (Tabla 3). Las cepas restantes, se mantuvieron para una posterior clasificación molecular, y establecer su identificación más certera. Finalmente, estas fueron conservadas en glicerol 15% v/v a -15°C para los ensayos posteriores.

Los resultados son coherentes con los reportados en diferentes trabajos de investigación en donde se aislaron especies del género *Lactobacillus* y *Bacillus* en intestinos de trucha, por otra parte, otros procesos de investigación reportaron la identificación de *Lactobacillus* y (otras bacterias como *Bacillus* y *Micrococcus*) a partir del tracto intestinal de peces de agua dulce [10][15][16][17][18]. La presencia de estas bacterias en el medio acuático ha sido asociada a reducción en la mortalidad, mejora la resistencia frente a patógenos del medio, así como de la calidad del agua [19]. Estudios han reportado la elevada presencia de bacterias del género *Lactobacillus* en poblaciones sanas de *Oreochromis niloticus* después de presentarse una epidemia de furunculosis [20]. Lo cual nos indica que la presencia de estas bacterias mejora el sistema inmune del pez y, por tanto, la salud en general del huésped.

La capacidad de resistencia a los antibióticos que manifiestan algunas cepas es un criterio determinante y restrictivo para ser seleccionado como posible probiótico. Las bacterias ácido lácticas (BAL), se han implementado en la acuicultura y en diversos estudios, sin embargo, en un comienzo se emplearon algunas cepas obtenidas a partir de fermentos lácteos o de origen terrestre, después, a medida que estudios en estos campos fueron reportando resultados tangibles, los probióticos propuestos se formularon con base en BAL nativas aisladas de peces cultivados [21][22]. Con relación a las 12 cepas seleccionadas como posibles probióticos, se mostraron sensibles frente a amoxicilina y florfenicol, esto sugeriría que algunas de estas cepas no transmitirán mediadores de resistencia antimicrobiana hacia el huésped, por otro lado, frente a *Eritromicina* y *Oxitetraciclina*, cepas aisladas B.E5, B.I 14, G.I 1 y I.In 10 presentaron resistencias (Tabla 4). Estos resultados son coherentes con estudios que indican que *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* son sensibles frente a estos antibióticos [23]. A pesar de que no existen medidas específicas en cuanto al tamaño del halo de inhibición propio de

*Lactobacillus* y *Enterococcus* frente a antimicrobianos en acuicultura, en trabajos similares con probióticos sugieren un tamaño de halo igual o mayor a 2mm [24][25]. Por otra parte, se podría establecer que en *Lactobacillus* los mecanismos que confieren resistencia frente al ácido oxolínico no están asociados a algún elemento genético móvil, por lo que el riesgo de transmisión al huésped es mínimo [26][27].

CEPA	Amoxicilina 10µg	Eritromicina 15 µg	Ácido oxolínico 20µg	Oxitetraciclina 30 µg	Florfenicol 30 µg
B.E 5	S	R	R	S	S
B.I 6	S	S	S	S	S
B.I 14	S	R	R	R	S
B.I16	S	S	S	S	S
In.E 17	S	S	S	R	S
In.E 20	S	S	S	S	S
I.In 22	S	S	S	S	S
I.In 1	S	S	S	S	S
G.I 1	S	R	R	R	S
I.In 10	S	R	S	S	S
In.E 12	S	S	S	R	S
In.I 18	S	S	S	S	S

Resistente (R) y Sensible (S)

**Tabla.4. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de las cepas seleccionadas frente a antibióticos utilizados en acuicultura.**

Por otro lado, una de las características que nos facilitó la selección de cepas que puedan ser consideradas como potenciales probióticos, es su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, no deseables en el organismo del pez, ni en el agua. En dicho sentido, este trabajo llevó a cabo ensayos con el fin de evidenciar la posible capacidad de inhibición de las cepas aisladas del intestino de tilapia, ya que con esto se cumpliría con los requisitos de selección ya establecidos previamente. Las bacterias aisladas con potencial probiótico fueron evaluadas a través de la prueba de entrecruzamiento con dos patógenos como la *A. hydrophila*, y *Yersinia ruckeri*, analizadas y ver su potencial de inhibición del crecimiento de dichos patógenos, siendo las cepas I.In 22 y B.I16 que presentaron halos de inhibición superiores a 6mm frente a los patógenos evaluados, además las cepas codifica-

das como B.E 5, I.In 1 y G.I 1 presentaron actividad nula frente a los patógenos *A. hydrophila*, y *Yersinia ruckeri* (Tabla 5). En diversas investigaciones, se reportaron procesos de aislamiento de bacterias lácticas de intestinos de tilapia, estas se evaluaron frente a patógenos para peces como: *S. typhi*, *K. pneumon*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* y *S. faecalis*, los aislados lograron inhibir su crecimiento, siendo coherente con lo desarrollado en estudio en donde las bacterias aisladas con potencial probiótico inhibieron el crecimiento de *A. hydrophila* [28][29]. Además, en otra investigación se aislaron bacterias lácticas de intestino de tilapia y observaron los efectos del extracto frente a *Aeromonas veronii* con halos de inhibición de hasta 35mm. En este estudio, se encontró que los extractos de los aislados bacterianos presentaron halos de inhibición frente a *A. hydrophila* desde 2mm hasta halos mayores de 10 mm y frente a *Yersinia ruckeri* con halos de inhibición mayoritariamente entre 2 mm y 6 mm. Las cepas presentaron actividad inhibitoria frente a *A. hydrophila* y *Yersinia ruckeri* después de 48h de incubadas. Estudios han revelado que, durante el periodo de 48h, las bacterias se encuentran en la fase exponencial de crecimiento, facilitando de una u otra forma su capacidad de sintetizar enzimas, proteínas y otras sustancias como antígenos a su máximo nivel. [24].

Código (CEPA)	Zona de inhibición (mm)	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
B.E 5	-	-
B.I 6	-	+
B.I 14	++	+
B.I16	+++	++
In.E 17	++	-
In.E 20	+++	-
I.In 22	+++	+++
I.In 1	-	-
G.I 1	-	-
I.In 10	-	+
In.E 12	++	-
In.I 18	+++	-

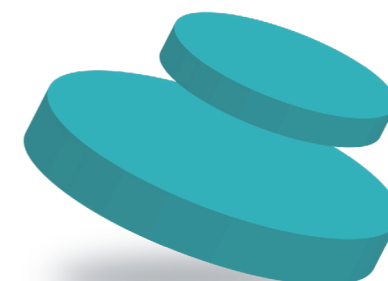
(-) no hubo halo de inhibición,  
 (+) zona de inhibición de 2 a 5 mm,  
 (++) zona de inhibición de 6 a 10 mm,  
 (+++) zona de inhibición mayor a 10 mm

**Tabla 5. Ensayos de actividad in vitro de candidatos a probióticos aislados de órganos potenciales de tilapia frente a patógenos bacterianos.**

Estos resultados inhibitorios del crecimiento de los patógenos estudiados, tienen que estar relacionados, probablemente, a la producción de sustancias propias de bacterias lácticas con actividad antibacteriana que se han investigado en trabajos previos, entre esos están los ácidos orgánicos, nicinas, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno [30]. En el presente estudio, se evaluaron algunas de las características recomendadas por la FAO para considerar a un microorganismo como probiótico y, después de ello, se comprobó su efecto antagonista frente a patógenos importantes de la trucha para finalmente establecer el potencial promisorio. Teniendo en cuenta que, los resultados obtenidos in vitro, no son contundentes para establecer la viabilidad de su implementación como probióticos. Para reconocer y establecer los efectos que pueden generar las bacterias lácticas, a raíz de la producción de enzimas sobre las tilapias en cuanto al aporte de micronutrientes, macronutrientes y enzimas digestivas, es pertinente realizar evaluaciones para determinar su favorabilidad “in vivo” [31][32][33][34].

## 04 CONCLUSIONES

De los 82 aislados se lograron preseleccionar 32 cepas, siendo 12 finalmente las escogidas como autóctonas compatibles con género *Lactobacillus* y *Enterococcus* del intestino y branquias de tilapia *Oreochromis niloticus*. Tanto la abundancia como la actividad antibacteriana de los diversos morfotipos extraídos y empleados autóctonos de *O. niloticus*, se relacionan estrechamente con los diversos productos extracelulares generados a raíz de los diferentes procesos metabólicos inherentes del pez. Siete cepas cumplieron con las condiciones in vitro seleccionadas para este estudio, demostraron sensibilidad frente a cinco antibióticos de uso en acuicultura. De los aislados autóctonos de la microbiota de *O. niloticus*, evidenciaron tener capacidad de inhibición de crecimiento de bacterias patógenas como *A. hydrophila* y *Yersinia ruckeri*.



## 05 REFERENCIAS

- [1] FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. (Roma). 224 pp.
- [2] Kent G. 1995. Aquaculture and food security. En: Proceedings of the PACON conference on sustainable aquaculture. Pacific Congress on Marine Science and Technology. Honolulu, Hawaii, USA. p. 11-14
- [3] Moriarty D. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. En: Bell C.R., Brylinsky, M. y P. Johnson-Green (eds). Memorias del VIII Simposio Internacional sobre Ecología Microbial. Canadá. p 7 .
- [4] Salazar G. 1999. Situación de la acuicultura rural de pequeña escala en Colombia, importancia, perspectivas y estrategias para su desarrollo. Red de Acuicultura Rural en Pequeña Escala. Taller ARPE, FAO-UCT. 26 p
- [5] Cruz Z. 2013. Probióticos y acuicultura: “Desafíos y perspectivas”. Rev. Industrias Pesqueras 2063-2064 42-45.
- [6] Acar J, Casewell M, Freeman J, Friis C y Goossens H. 2000. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clinical Microbiology and Infection*. 6 (9) 477—482.
- [7] Klaenhammer T, y Kullen M. 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 50 45-57
- [8] Cahill M. 1990 Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*. 19 21-41.
- [9] Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. 2001 Probiotics: Effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (suppl) 444S-450S.
- [10] Gómez-Gil B, Roque, A y Tumbull F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191 259-270.
- [11] Banerjee, G., & Ray, A. K. 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, 115, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- [12] Dawood, M. A. O., & Koshio, S. 2016. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.033>
- [13] Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. C. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: An update on their multiple modes of action: A review. *Veterinary Quarterly*, 36, 228–241. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1172132>
- [14] Mesalhy S, Abd-El-Rahman A, Jonh G, y Mohamed M. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential use as probiotics. *Aquaculture* 277: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.021>
- [15] Quispe W. 2017. Aislamiento de *Lactobacillus* sp. de “trucha arco iris” oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en puno. Tesis para obtener el grado de licenciado en biología. universidad nacional del altiplano Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fvg643d/doc/fvg643d.pdf>.
- [16] Balcázar J, Vendrell D, de Blas I, Ruiz I, Múzquiz J, y Gironés O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278 188-191.
- [17] Villamil Díaz, L. M., & Esguerra Rodríguez, D. 2017. Enterococcus, Myroides Y Exiguobacterium: géneros bacterianos con potencial probiótico para el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Biológica Colombiana*, 22(3), 331-339. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.59974>
- [18] Chen S-W, Liu C-H, Hu S-Y. 2018. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus nehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish and Shellfish Immunology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.059>
- [19] Hadi Z, Nahid B, Che Roos S, Mohd Salleh K, Kamaruzaman y S, Balcazar J. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1) 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.007>.
- [20] Castañeda-Monsalve, V. A., Junca, H., García-Bonilla, E., Montoya-Campuzano, O. I., & Moreno-Herrera, C. X. 2019. Characterization of the gastrointestinal bacterial microbiome of farmed juvenile and adult white Cachama (*Piaractus brachipomus*). *Aquaculture*, 512, 734325.
- [21] Villamil L. 2002. Aplicación de las bacterias lácticas en el cultivo de Rodaballo (*Scophthalmus Maximus* L.), Universidad de Santiago de Compostela. Instituto de investigaciones marinas. Trabajo para optar al grado de Doctor en Biología.
- [22] Villamil L, Tafalla C, Figueras A. y Novoa B. 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin. Diagn. Labor. Immun.* 9(6): 1318-1323.
- [23] Salminen S. et al. 1998. Demonstration of safety of probiotics -A review. *Int J Food Microbiol.* 44(1-2) 93-106.
- [24] Gutiérrez L. 2016. Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación (tesis de doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- [25] Zhou J, Pillidge C, Gopal P, y Gill H. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 98(2) 211-217
- [26] Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, y Sorrentino E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*. 85 193-204.

- [27] EFSA European Food Safety Authority. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. The EFSA Journal. 765 1-87
- [28] Escobar-Briones L, Olveda-Novoa M, y Puerto-Castillo C. 2006. Avances sobre la Ecología Microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. En: Cruz Suárez E, Marie D R, Tapia Salazar M, Nieto López MG, Villarreal Cavazos DA, Puello Cruz AC y García Ortega A. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey, Nuevo León, México. p 15-17.
- [29] Huicab-Pech ZG, Landeros-Sánchez C, Castañeda-Chávez MR, Lango-Reynoso F, López Collado CJ. 2016. Current State of Bacteria Pathogenicity and their Relationship with Host and Environment in Tilapia *Oreochromis niloticus*. J Aquac Res Development 7: 428. <https://doi:10.4172/2155-9546.1000428>
- [30] Monroy M. 2015. El uso de cinco cepas probióticas para la determinación de la sensibilidad (positiva o negativa) del crecimiento de bacterias patógenas (in vitro), aisladas de peces enfermos. Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente. 1(7) 25-31
- [31] Galdámez, J. W., Sáenz-Osorio, R. E., & Marín-Hernández, D. E. 2018. Evaluación de dos niveles de probiótico (*Bacillus subtilis*) en alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en fase juvenil. Revista Agrocienza-Revista de contenido científico de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, 1(6), 24-33
- [32] Xia Y, Lu M, Chen G, Cao J, Gao F, Wang M, Liu Z, Zhang D, Zhu H, Yi M. 2018 Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 76 368-379. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.020>
- [33] Waiyamitra, P., Zoral, M. A., Saengtienchai, A., Luengnaruemitchai, A., Decamp, O., Gorgoglione, B., & Surachetpong, W. 2020. Probiotics Modulate Tilapia Resistance and Immune Response against Tilapia Lake Virus Infection. Pathogens, 9(11), 919.
- [34] Ibrahem, M. D. 2015. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. Journal of Advanced Research, 6, 765–791. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004>

