

PROBIÓTICOS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA EN EL CULTIVO DE CAMARÓN: RESEÑA

Luisa Villamil Díaz y María Angélica Martínez-Silva

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos, Santa Marta, Colombia. luisa.villamil@utadeo.edu.co (L.V.D.), maria.martinez@utadeo.edu.co (M.A.M.S.)

RESUMEN

Las bacterias probióticas se definen como microorganismos vivos que administrados como suplemento en la dieta pueden causar modificaciones en la microbiota asociada al tracto gastrointestinal del hospedador y generar efectos benéficos como el incremento en la conversión alimentaria, en la resistencia a enfermedades y de la calidad del agua. Durante la última década, su aplicación en el cultivo de camarón se ha hecho frecuente ya que han surgido varios productos comerciales ideados para este fin. Al mismo tiempo, aunque hay publicados varios artículos científicos en el tema, es evidente que hace falta orientar los estudios para entender los mecanismos de acción de los probióticos, así como para establecer los protocolos de aplicación, teniendo en cuenta factores críticos como etapa de cultivo, densidad de siembra y dosis de administración en relación con los mecanismos de defensa inmunitaria del camarón y presencia de organismos potencialmente patógenos. Este trabajo pretende hacer una reseña de las publicaciones más destacadas en el uso de probióticos en acuicultura, particularmente en el cultivo de camarón, ya que su uso se perfila como una de las alternativas con mejores perspectivas al uso indiscriminado de antibióticos que causa problemas tales como la aparición de cepas bacterianas multiresistentes que pueden alterar los ecosistemas próximos al cultivo e incluso afectar la salud del consumidor.

PALABRAS CLAVE: Bacteria, Cultivo de camarón, Probióticos, *Bacillus*, *Lactobacillus*.

ABSTRACT

Probiotics as a biotechnological tool in shrimp culture: A review. Probiotic bacteria are defined as live microorganisms that administered as a diet supplement can cause modifications in the microbiota associated with the gastrointestinal tract of the host and generate beneficial effects such as an increase in the food intake conversion, disease resistance and water quality. During the last decade, its application in shrimp farming has become frequent since several commercial products designed for this purpose have emerged. At the same time, although there are a number of scientific articles published on the subject, it is evident that there is a lack of studies oriented to understand the probiotics working mechanisms and to establish the protocols for its implementation, taking into account critical factors such as the stage of cultivation, culture density and dosage in relation to the shrimp immune defense mechanisms and presence of potentially pathogenic organisms. This paper aims to review the most prominent publications regarding the use of probiotics in aquaculture, particularly in shrimp farming, since its use seems to be the alternative with better perspectives to the indiscriminate use of antibiotics that

cause problems such as the emergence of multi-resistant bacterial strains that could alter the ecosystems near aquaculture sites and even affect consumer health.

KEY WORDS: Bacteria, Shrimp culture, Probiotics, *Bacillus*, *Lactobacillus*.

INTRODUCCIÓN

El dramático incremento en la población mundial en los últimos dos siglos, sumado a la sobreexplotación de diferentes pesquerías (FAO, 2006) son factores que explican en parte el déficit de proteína para consumo humano. De acuerdo con el informe de la FAO, Estado de la Acuicultura Mundial: 2006, la acuicultura es una actividad con un alto potencial para satisfacer la creciente demanda de alimentos acuáticos ya que es probablemente el sector productivo de más rápido crecimiento, que genera actualmente alrededor del 50% de la producción de pescado en el mundo. El camarón es uno de los productos cultivados más importantes en Asia y la región Pacífica, con una producción de 1.1 millones de toneladas para 2006, mientras que Latinoamérica alcanzó 260000 toneladas (FAO, 2006).

Una de las principales dificultades que existe en el cultivo comercial de organismos marinos es la aparición de enfermedades infecciosas como resultado de la incidencia de bacterias, hongos y virus frecuentemente asociados con el aumento en las densidades de cultivo y rápido desarrollo de la acuicultura con deficiencias en los métodos de manejo, calidad de aguas, valor nutricional del alimento, entre otros factores (Paillard *et al.*, 2004; Pruzzo *et al.*, 2005). En el subsector cultivador de camarón marino, las enfermedades son consideradas actualmente como el principal factor causante de pérdidas en producción y dinero (Lin, 1995; Lightner, 1996; Moriarty, 1999). Enfermedades infecciosas como el virus del Taura, la Necrosis Hematopoyética Hipodérmica (IHHN) y el síndrome de la mancha blanca (WSSV) han generado devastación en Sur América, Hawai y el Pacífico. A este problema de las enfermedades se suma, además, el bajo precio que actualmente tiene el camarón en el mercado (US) (FAO, 2006), por lo que el sector debe buscar estrategias de producción que le aporten mayor competitividad a la cadena productiva, facilitando obtener una mayor cantidad de individuos y de mejor calidad por el mismo costo.

En el pasado, ante la aparición de cualquier síntoma de enfermedad, se recurrió al uso incontrolado de agentes químicos como los antibióticos, cuyo espectro de acción es obviamente limitado para la prevención y control de enfermedades (Subasinghe, 1997) y, además, causan efectos adversos como la aparición de cepas bacterianas multi-resistentes que incluso pueden llegar a afectar la salud del consumidor (Tsoumas *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1994). De igual manera, debido al largo tiempo de vida media en el agua de algunos antibióticos como la oxitetraciclina,

los residuos de antibióticos generados en granjas de cultivo en algunos pueden modificar las comunidades microbianas de los ecosistemas próximos (Hektoen *et al.*, 1995). De acuerdo con estos indicios, es claro que los acuicultores necesitan evitar la aplicación innecesaria de antibióticos y entender la complejidad de la comunidad microbiana que está presente en el agua de cultivo e implementar la aplicación de bacterias benéficas para combatir a las patógenas y las eventuales mortalidades a las que pudiera dar lugar. Considerando el resultado exitoso que se ha obtenido en algunos experimentos científicos realizados en granjas de peces, camarones y ostras, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (Subasinghe, 1997), definió el desarrollo de vacunas efectivas, el uso de inmunoestimulantes, potenciadores inmunológicos y de probióticos para mejorar la calidad del medio acuático, como las principales áreas de investigación en la lucha contra las enfermedades en acuicultura.

En Colombia, a pesar de que actualmente se usan probióticos comerciales en el cultivo de organismos acuáticos, no se han realizado estudios en los que se evalúe a profundidad los beneficios de su aplicación, así como resolver otras preguntas como comparar el efecto de los probióticos vivos con las células inactivas, como lo proponen Villamil *et al.* (2003b) y Gatesoupe (2008), o probar otros compuestos como bacteriocinas. Cabe mencionar que los productos de probióticos que se comercializan en el país son importados, por lo cual la realización de proyectos encaminados a obtener una formulación de probióticos con aislados bacterianos nativos a escala comercial que pueda ser probado con las características propias de nuestros cultivos, sería un importante avance en la prevención de las enfermedades que afectan dramáticamente el sector acuicultor.

¿QUÉ ES UN PROBIÓTICO?

El término probiótico ha sufrido modificaciones en su significado a lo largo de los años. De esta manera en 1968, se definió como un suplemento microbiano que se suministra a animales y humanos. Fuller (1989) lo redefinió como un microorganismo vivo que se administra al hospedero suplementado en el alimento para beneficiar el balance microbiano intestinal. Posteriormente, el término fue usado para referirse a un adyuvante dietario microbiano administrado de tal manera que se mantenga vivo dentro del tracto gastrointestinal, y que beneficie la fisiología del hospedero modulando el sistema inmune, así como mejorando el balance microbiano mediante la prevención de la colonización de bacterias indeseables en el tracto intestinal (Gatesoupe, 1999; Naidu *et al.*, 1999). Verschuere *et al.* (2000b) dieron una definición más amplia de los probióticos como microorganismos vivos que

tienen efectos benéficos en el hospedero mediante la modificación de la microbiota asociada, el incremento del aprovechamiento de la comida, el mejoramiento de la respuesta a enfermedades y de la calidad del ambiente. Sin embargo, en este punto es importante señalar que las bacterias que simplemente cumplen alguno de estos roles, tales como la producción de nutrientes esenciales para el aprovechamiento de las especies cultivadas, o bacterias que solamente ejercen una función específica de bio-remediación en el medio ambiente, no deben considerarse como probióticos. La aplicación de probióticos como control biológico es una alternativa viable dada la habilidad que poseen las cepas seleccionadas para impedir el crecimiento de bacterias oportunistas e influir en general en el establecimiento de la comunidad microbiana tanto en los individuos como en el agua de cultivo.

Aunque la evaluación de probióticos en acuicultura se ha abordado en diferentes artículos científicos y también están disponibles en el mercado productos comerciales, el concepto de “probiótico” y su eficacia sigue siendo poco conocido y controvertido; existen dudas sobre la eficiencia y seguridad de los organismos probióticos que pueden tener origen en una multiplicidad de factores tales como el uso de aislados con poca actividad, en que los productos comerciales han generado expectativas poco realistas por parte de los consumidores, además porque relativamente pocos estudios han abordado los mecanismos de acción de la cepas probióticas seleccionadas utilizando condiciones estandarizadas. Por lo cual, es urgente para el sector cultivador de camarón que se realicen estudios científicos reproducibles y exactos a escala piloto y comercial para lograr la aplicación de un protocolo que garantice una mejora significativa en los niveles productivos, teniendo aspectos clave como la fase del ciclo productivo, el tiempo, dosis y vía de administración, entre otros factores. De igual manera, los procesos de selección, crecimiento y escalamiento en la producción de los microorganismos probióticos seleccionados debe realizarse con alta rigurosidad de tal manera que cumplan los estándares de calidad, ya que podría alterarse la composición de las mezclas bacterianas originales, con resultados impredecibles.

¿CUÁLES SON LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS?

Las publicaciones científicas existentes en el tema han facilitado el entendimiento de los modos de acción de los probióticos en el hospedero, entre ellos la competencia por nutrientes, la modulación de la respuesta inmunitaria no específica, la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal, entre otros que se han evidenciado en

experimentos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, es necesario precisar que la eficacia de un probiótico seleccionado *in vitro* puede cambiar cuando se administra al hospedero, dada la gran influencia de factores más complejos como la ingestión selectiva (Prieur, 1981; Riquelme *et al.*, 2000) y la muerte en el tracto gastrointestinal (Vine *et al.*, 2006) causada por la incapacidad del probiótico para mantener su fisiología bajo circunstancias de una mayor interacción microbiana (Tinh *et al.*, 2007). En general, la relación entre los experimentos *in vivo* e *in vitro* ha sido descrita en los últimos artículos de revisión científica de uso de probióticos en acuicultura (Irianto y Austin, 2002; Balcazar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Tinh *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008). Entre los principales mecanismos descritos que usan los aislados probióticos para beneficiar al hospedador, se encuentran:

a. Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal

Es bien sabido que la habilidad de las bacterias para adherirse y sobrevivir en el mucus entérico es decisiva en el establecimiento de la microbiota intestinal. La capacidad de adherencia es una característica que es aprovechada de igual manera tanto por las bacterias probióticas como por las patógenas. En el caso de las probióticas, éste ha sido uno de los criterios más importantes para su selección y aplicación en acuicultura (Salminen *et al.*, 1996; Nikoskelainen *et al.*, 2003), mientras que para las patógenas la habilidad para adherirse, se relaciona con la virulencia y se considera como el primer paso para una infección (Bengmark, 1998). En acuicultura, la información disponible indica que las bacterias aisladas de animales cultivados o de su entorno tienen mayor capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal y a los tejidos, que las de otras bacterias foráneas que suelen ser transitorias, por lo que surge la necesidad de que los probióticos sean continuamente administrados, ya sea como suplemento en el alimento o a través del agua de cultivo (Ringø y Gatesoupe, 1998; Villamil *et al.*, 2003c). Además, se ha documentado que aislados microbianos de un organismo pueden colonizar otras especies cultivadas, indicando así la falta de especificidad para la colonización del tracto digestivo (Ringø, 1999).

b. Producción de antibióticos / compuestos antivirales

La selección de microorganismos con actividad probiótica también se puede determinar por la capacidad de generar productos extracelulares (ECPS) que pueden inhibir o matar otras bacterias potencialmente patógenas, entre ellos sustancias antibacteriales (Imada *et al.*, 1985; Williams y Vickers, 1986; Maeda, 1994; Vázquez *et al.*, 2006), sideróforos (Spanggaard *et al.*, 2001; Brunt *et al.*, 2007), enzimas bacteriolíticas (Nair *et al.*, 1985), ácido láctico (Lindgren y Clevström, 1978; Alakomi *et al.*, 2000), ácidos orgánicos (Midolo *et al.*, 1995),

peróxido de hidrógeno (Vázquez *et al.*, 2005), dióxido de carbono (Naidu *et al.*, 1999) y bacteriocinas (Villamil *et al.*, 2003a; Gatesoupe 2008). Las bacteriocinas son polipéptidos bacteriostáticos o bactericidas que en su mayoría son activos contra bacterias estrechamente relacionadas (Klaenhammer, 1998) y microorganismos Gram-positivos (Hurst, 1981; Severina *et al.*, 1998). Una de las bacteriocinas mejor conocidas es la nisina, que es un péptido sintetizado ribosomalmente y producido por algunas cepas de *Lactococcus lactis*. La eficiencia de este péptido ha sido probada contra patógenos multiresistentes de humanos como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis*, entre otros (Hurst, 1981; Liu y Hansen, 1990).

Por otra parte, los péptidos antimicrobianos derivados de estas bacterias interactúan con las células del sistema inmunológico (De Pablo *et al.*, 1999), y pueden ser reconocidos por ellas, gracias a los anticuerpos policlonales contra bacteriocinas como la nisina y pediocina en peces. Adicionalmente, algunas bacterias ácido-lácticas (LAB) también poseen actividad contra bacterias Gram-negativas como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* y *Proteus vulgaris* (Ringø y Gatesoupe, 1998). La carnocina de *Carnobacterium piscicola* también ha resultado eficaz para combatir a *Aeromonas hydrophila* (Lewus *et al.*, 1991). Estudios más recientes han postulado un nuevo género de bacterias aisladas de granjas productoras de rodaballo (*Scophthalmus maximus*), *Roseobacter*, como probióticos basado en la actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de peces marinos *V. anguillarum* y *V. splendidus* (Hjelm *et al.*, 2004).

Los probióticos no solo tienen capacidad antibacteriana, también se ha descrito actividad antiviral de algunos aislados como *Pseudomonas* sp., *Vibrio* spp. y *Aeromonas* sp., contra el virus de la necrosis hematopoyética (IHNV) (Kamei *et al.*, 1988). Maeda *et al.* (1997) aislaron una cepa de *Pseudoalteromonas undina*, que ejerció efectos antivirales e incrementó la supervivencia en camarón (*Penaeus* sp.) y dorada (*Sparus aurata*) infectados experimentalmente con el virus de la necrosis neuro Sima-aji (SJNNV), Baculo e Iridovirus. Varias cepas de *Vibrio* aisladas de un cultivo de camarón, también presentaron actividad antiviral significativa especialmente frente a IHNV y el virus de *Oncorhynchus masou* (OMV) (Direkbusarakom *et al.* 1998), aunque estudios recientes están dirigidos a establecer el mecanismo de actividad antiviral de manera directa en la supervivencia evaluando otros factores más complejos. Otros mecanismos que podrían inhibir el crecimiento de bacterias indeseables, como la competencia por nutrientes, la energía disponible o sitios de adherencia (Gatesoupe, 1999; Verschueren *et al.*, 2000a) deben ser tenidos en cuenta.

c. Producción de compuestos benéficos

Las bacterias marinas y las levaduras pueden llegar a ser un recurso de proteína importante en el mejoramiento del aporte nutricional de algunas especies acuáticas cultivadas debido al perfil de aminoácidos que contienen (Brown *et al.*, 1996). En ciertos aislados de bacterias intestinales, se ha demostrado alta producción de ácidos grasos de cadena corta (Yazawa, 1996) y también su contribución al valor nutritivo de los rotíferos (Watanabe *et al.*, 1992) y peces (Clements, 1997). De la misma manera, los lípidos producidos por microorganismos marinos han sido descritos como sustancias de gran importancia para la nutrición de especies acuáticas como el rodaballo y la tilapia (Ringø *et al.*, 1992; Kihara y Sakata, 1997). Por otra parte, la producción de enzimas como lipasas, quitinasas y proteasas, por parte de microorganismos seleccionados, pueden contribuir al proceso digestivo de los organismos cultivados, especialmente en estadios larvales de bivalvos (Prieur *et al.*, 1990) y camarón (Wang *et al.*, 2000).

d. Mejoramiento de las funciones inmunes

A pesar de que existe un amplio número de publicaciones científicas en las que se describe un aumento en la resistencia de peces tratados con probióticos durante infecciones experimentales (Gatesoupe, 1994; Cai *et al.*, 1998, Ottessen y Olafsen, 2000; Robertson *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006), existen relativamente muy pocas en las que se estudien a fondo los mecanismos empleados en dicha defensa; sólo trabajos recientes han demostrado la incidencia de los probióticos en las funciones del sistema inmune. Irianto y Austin (2002) describieron un incremento en parámetros celulares, como el número de eritrocitos, linfocitos y macrófagos y un aumento de la actividad lisozímica de *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Scophthalmus maximus* alimentados con probióticos seleccionados, tanto Gram-positivos como Gram negativos. Villamil *et al.* (2002) evaluaron los efectos inmunomoduladores de varias cepas de LAB de origen terrestre, encontrando que *L. lactis* viable e inactivado por calor incrementa funciones inmunitarias de rodaballo (*S. maximus*), como quimioluminiscencia de macrófagos de riñón anterior y concentración de lisozima en suero. Más tarde, Villamil *et al.* (2003b) encontraron que, en el caso de LAB, no sólo las células enteras son capaces de inducir un aumento en la respuesta inmune, algunos productos extracelulares como la nisina, principal bacteriocina producida por *L. lactis*, pueden aumentar la quimioluminiscencia y la producción de óxido nítrico en una dosis y tiempo dependiente en rodaballo (*S. maximus*).

En camarón, Balcázar (2003) describió un aumento en la resistencia de *Litopenaeus vannamei*, alimentado con un suplemento de *Bacillus* y *Vibrio*, contra

Vibrio harveyi y el síndrome de mancha blanca, este incremento en la resistencia se correlacionó con un aumento de la fagocitosis y la actividad antibacteriana de los hemocitos. Chiu *et al.* (2007) informaron que el camarón blanco *L. vannamei* tratado con complemento alimenticio de *Lactobacillus plantarum* aumentó significativamente la actividad fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio y la superóxido dismutasa (SOD), así como la transcripción del mRNA de peroxinectina (PE) y profenoxidasa (proPO), lo que contribuyó a la eliminación de *Vibrio alginolyticus* durante infecciones experimentales.

e. Mejora de la calidad de agua

Se ha propuesto que las bacterias del género *Bacillus* seleccionadas como probióticos pueden convertir la materia orgánica en CO₂, en contraste con las bacterias Gram-negativas que se caracterizan por convertir materia orgánica en biomasa bacteriana o limo (Dalmin *et al.*, 2001). Laloo *et al.* (2007) comprobaron la capacidad de tres aislados del género *Bacillus* para disminuir las concentraciones de nitritos, nitratos y amonios en el agua de cultivo de peces ornamentales. Este mismo fenómeno también fue observado por Kim *et al.* (2005) en *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis*, quienes atribuyen estos efectos a mecanismos tales como bioacumulación, bio-asimilación y nitrificación. Aunque la eliminación de nitrógeno es una propiedad predominante en bacterias autotróficas, se han producido varios informes que sugieren una contribución de las bacterias heterótrofas en este sentido (Abou-Seada y Ottow, 1985; Robertson y Kuenen, 1990; Sakai *et al.*, 1996, 1997; Kim *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006). De manera controversial, hay publicados varios estudios en camarón y bagre que no pudieron confirmar éstas hipótesis (Queiroz y Boyd, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998). Adicionalmente, la interacción entre bacterias probióticas y microalgas en los tanques de cultivo en general produce efectos positivos, ya que estabiliza los factores nutricionales del alimento vivo pudiendo contribuir al establecimiento de la microflora intestinal beneficiosa de los hospederos (Reitan *et al.*, 1993, 1997).

USO DE PROBIÓTICOS EN CAMARÓN Y OTROS CULTIVOS

La mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para acuicultura pertenecen a las bacterias ácido-lácticas (LAB), de los cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Estos son considerados como GRAS (“Generally recognized as safe”), reduciendo de este modo la necesidad de ensayos de seguridad biológica, inevitables para garantizar que la implementación de aislados probióticos no va a causar daños colaterales a los organismos cultivados ni al consumidor final

(Holzapfel *et al.*, 1998). El uso de probióticos como LAB está relativamente bien establecido en otras especies animales (Wallace y Newbold, 1992; Aiba *et al.*, 1998; Kontula *et al.*, 1998; Kirjavainen *et al.*, 1999a, 1999b; Netherwood *et al.*, 1999), de ellos se destaca el aumento de tamaño y peso, el establecimiento de un equilibrio microbiano intestinal, así como la mejora de algunas respuestas inmunes.

En peces, las LAB se han descrito como parte de la microflora normal de los organismos (Strøm y Olfasen, 1990, Ringø y Strøm, 1994; Ringø *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2000). La administración de LAB exógenas también se ha asociado con la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Lewus *et al.*, 1991; Gildberg *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1996), como promotor del crecimiento de peces (Noh *et al.*, 1994) y, en algunos casos, con un aumento de la supervivencia de peces infectados experimentalmente (Gatesoupe, 1994; Gildberg, 1995; Robertson *et al.*, 2000). La prevención de la colonización de bacterias perjudiciales con una selección de cepas bacterianas, se ha propuesto como una alternativa importante para el control microbiano en el cultivo de *Artemia* (Verschuere *et al.*, 1999). También se ha demostrado que algunas de éstas cepas bacterianas seleccionadas pueden prevenir el crecimiento de bacterias patógenas como *Vibrio proteolyticus* en el cultivo de *Artemia* (Verschuere *et al.*, 1999). Recientemente, Balcázar *et al.* (2007a, 2007b, 2007c) demostraron que *Lactococcus lactis ssp. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* aislados de salmónidos, eran capaces de persistir en el intestino de la trucha arco iris (*Salmo trutta*) y aumentar significativamente la actividad de la lisozima después de la suplementación de alimentos con probióticos.

Las LAB también se han aplicado con éxito en el cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*). Gatesoupe (1991) informó que un preparado comercial de *Lactobacillus plantarum* en estado viable disminuyó el recuento de *A. salmonicida* y otras bacterias asociadas a los rotíferos. Harzevili *et al.* (1998) demostraron que *L. lactis* (AR21) tienen un efecto inhibitorio contra *V. anguillarum* en cultivo de rotíferos en condiciones subóptimas y, de igual forma, demuestra un incremento significativo en el crecimiento en condiciones de alimentación óptimas.

En general, el uso de probióticos en el cultivo de camarón ha tenido buenas perspectivas; diversas publicaciones científicas han demostrado efectos positivos de la aplicación de probióticos como se muestra en la Tabla 1. Sin embargo, los resultados obtenidos en algunas granjas pueden ser variables debido a diferentes factores, que pueden afectar el resultado de las operaciones a largo plazo, como la calidad del probiótico, el modo de administración, la talla y las especies de camarón.

Tabla 1. Reseña de las principales publicaciones científicas que registran el uso de probióticos en el cultivo de crustáceos.

Probiótico	Origen	Observaciones	Modo de administración	Posible modo de acción	Referencia
<i>Bacillus</i> cepa S11	<i>Penaeus monodon</i> , mudas y agua de los estanques de camarón	Incremento en el peso y supervivencia de larvas y poslarvas de <i>P. monodon</i> . Reducción de la mortalidad luego de una infección con <i>V. harveyi</i> D331	Adicionado en la dieta	Antagonismo	Rengpipat <i>et al.</i> , (1998)
<i>Bacillus</i> cepa S11	?	Incremento en la supervivencia y crecimiento en estanques de camarón tigre <i>Penaeus monodon</i>	Adicionado en la dieta	?	Rengpipat <i>et al.</i> , (2003)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Agua de mar del océano Pacífico	Incremento en la supervivencia y peso de poslarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> ; reducción de <i>V. parahaemolyticus</i> en los camarones	Adicionado al agua del cultivo	Antagonismo	Garriques y Arévalo (1995)
<i>Bacillus</i>	?	Incremento en la supervivencia de camarones peneidos; reducción de la densidad de <i>Vibrio</i>	Adicionado al agua del tanque	Antagonismo	Moriarty (1998)
Cepa PM-4 y/o NS-110	Suelo	Incremento de supervivencia de <i>P. monodon</i> y larvas de cangrejo <i>Portunus trituberculatus</i> Reducción de la densidad de <i>Vibrio</i>	Adicionado al agua del cultivo	Antagonismo	Maeda (1994)

Continuación Tabla 1

Probiótico	Origen	Observaciones	Modo de administración	Posible modo de acción	Referencia
40 especies de bacterias aeróbicas como <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> y <i>B. macerans</i> .	Aislados de animales domésticos y peces	Rápido crecimiento luego del día 2, disminuyó la densidad cuando incrementó la densidad de protozoos. Los resultados sugieren una relación negativa entre protozoos y rotíferos	Adicionado al agua del cultivo	?	Hirata <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus</i> spp.	Probiótico comercial	Mantiene una optima transparencia y baja carga orgánica en los tanques, promueve el crecimiento y la supervivencia y la salud	Adicionado al agua del cultivo de los estanques	Antagonismo	Dalmin <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus</i> y <i>Vibrio</i> sp.	Cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Incrementa la resistencia a <i>Vibrio harveyi</i> y mancha blanca en <i>L. vannamei</i>	Adicionado en la dieta	Antagonismo, inmuno estimulación	Balcázar (2003)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Incrementa la supervivencia <i>in vivo</i> en una infección experimental con <i>V. harveyi</i>	Adicionado al agua del cultivo	Antagonismo	Vaseeharan y Ramasamy (2003)
<i>Pseudomonas</i> sp. PM11 <i>Vibrio fluvialis</i> PM17	<i>P. monodon</i>	<i>In vivo</i> mejora el sistema inmune de camarón pero no es consistente con la producción de sideróforos y enzimas extracelulares <i>in vitro</i>	Adicionado a la dieta	Inmuno estimulación	Alvandi <i>et al.</i> (2004)

Continuación Tabla 1

Probiótico	Origen	Observaciones	Modo de administración	Posible modo de acción	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> UTM 126	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Produce actividad antimicrobiana a <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , y <i>V. harveyi</i> en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo	Balcázar y Rojas-Luna (2007)
<i>Vibrio alginolyticus</i> UTM 102, <i>Bacillus subtilis</i> UTM 126, <i>Roseobacter gallaeciensis</i> SLV03, y <i>Pseudomonas aestuarina</i> SLV22	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Incrementa el factor de conversión y mejora la supervivencia en infecciones por baño con <i>V. parahaemolyticus</i> en <i>L. vannamei</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo	Balcázar <i>et al.</i> (2007c)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Colección	Incrementa la actividad, el estallido respiratorio superóxido dismutasa de <i>Vibrio alginolyticus</i> , así como profenoxidasa y peroxinectina en la transcripción de mRNA	Adicionado a la dieta	Inmuno estimulación	Chiu <i>et al.</i> (2007)
<i>Synechocystis</i> MCCB 114 y 115	Colección de agua de mar	Eliminación de <i>Vibrio</i> de poslarvas de <i>Penaeus monodon</i> Incremento la supervivencia durante infecciones con <i>V. harveyi</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo	Preetha <i>et al.</i> (2007)

Continuación Tabla 1

Probiótico	Origen	Observaciones	Modo de administración	Posible modo de acción	Referencia
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>L. vannamei</i>	Disminuye el número de <i>Vibrio</i> . Incrementa el conteo de hemocitos, hemoloxidasas y super-óxido dismutasa en <i>L. vannamei</i>	Adicionado a la dieta	Antagonismo Inmuno estimulación	Li <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus</i> (70 cepas) Probiótico comercial SANOLIFE MIC	?	Incrementa la tasa de crecimiento, supervivencia y disminuye la tasa de conversión alimenticia en <i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> y <i>P. monodon</i>	Adicionado en la dieta	?	Decamp y Moriarty (2007)
<i>Paenibacillus spp.</i> , <i>B. cereus</i> y <i>Pa. polymyxa</i>	Agua de mar, sedimento y muestras de intestino de peces marinos	Actividad probiótica de <i>Paenibacillus spp.</i> , <i>B. cereus</i> y <i>Pa. polymyxa</i> luego de infecciones con <i>Vibrios</i> en poslarvas de <i>P. monodon</i> .	?	Antagonismo	Ravi <i>et al.</i> (2007)
<i>Bacillus</i> (70 cepas) Probiótico comercial SANOLIFE MIC (<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>)	?	Disminuye el número de <i>Vibrio</i> e incrementa la supervivencia de <i>P. monodon</i> y <i>L. vannamei</i>	Adicionado al agua del cultivo	Antagonismo <i>in vitro</i>	Decamp <i>et al.</i> (2008)

Como se muestra en la Tabla 1, los mayores beneficios obtenidos por la suplementación de probióticos en el cultivo de crustáceos son el incremento de la supervivencia durante infecciones experimentales, presumiblemente asociado con la potenciación de las defensas del sistema inmune innato, así como un efecto antimicrobiano directo de los aislados demostrado en varios estudios, especialmente

in vitro. Esta condición está también relacionada con cambios significativos en la microbiota intestinal, por el desplazamiento de bacterias oportunistas y patógenas y al mismo tiempo con la colonización dominante de las cepas de microorganismos usados como probióticos.

Otro efecto benéfico asociado al uso de probióticos es el aumento de la tasa de crecimiento y de incremento en peso, que es atribuido principalmente al establecimiento en el tracto gastrointestinal (TGI) del hospedero, contribuyendo al balance de la microflora y mejorando la absorción de nutrientes (Gatesoupe, 2008) debido a la producción de enzimas digestivas (proteasas y amilasas) y exoenzimas cuya función es romper la celulosa y el almidón del alimento, facilitando de esta manera su asimilación (Jory, 1998). Como una acción positiva adicional también documentada en acuicultura, es importante mencionar la mejora en la calidad del agua relacionada con la capacidad de algunas bacterias para reducir el amonio y la materia orgánica que son frecuentemente una de las causas de estrés en los cultivos de camarón. Sin embargo, de acuerdo con la estricta definición de probiótico, es importante que quede claro que los microorganismos que son capaces de mejorar la calidad del agua, sin causar ningún efecto positivo directo en el hospedero no debe ser considerados como probióticos y que deberían más bien ser llamados agentes bio-remediadores.

De igual manera, la utilización de bacterias Gram-positivas como *Bacillus*, en general ha demostrado ser benéfica en el cultivo de camarón (*P. monodon*, *L. vannamei*), causando un importante incremento en las tasas de supervivencia y peso (Tabla 1). Sin embargo, pocos estudios han documentado la posible capacidad de los suplementos probióticos para mejorar la producción de nauplios y poslarvas. Recientemente Decamp *et al.* (2008) publicaron un resumen de los estudios provenientes de Asia y Latinoamérica en los que se utilizaron probióticos para la larvicultura de camarón. En ese artículo ellos registraron el desempeño de una mezcla comercial de cepas de *Bacillus* (SANOLIFE MIC), y encontraron que era una alternativa práctica al uso de antibióticos ya que si son implementados de manera simultánea con una buena higiene y medidas sanitarias adecuadas, reducen el impacto potencial de patógenos. Registra también que no existen diferencias significativas entre los tratamientos donde se valoraron algunos aspectos como la biomasa en el tanque, la supervivencia, la calidad de agua y la carga de *Vibrio*.

Los principales argumentos para la utilización del género *Bacillus* como aditivos de piensos para la acuicultura (Decamp *et al.*, 2006) es que se trata de bacterias cosmopolitas, que se encuentran en el suelo, el agua dulce y agua de mar, y también en los tractos gastrointestinales de crustáceos, peces, animales terrestres e incluso los seres humanos, además *Bacillus* puede producirse en concentraciones muy elevadas a un costo moderado en comparación con bacterias que no producen esporas. Por

otra parte, al ser formadores de esporas, son fáciles de transportar y almacenar como liofilizados para ser comercializados. Por otra parte, las bacterias Gram-negativas son dominantes en el tracto gastrointestinal de peces y mariscos (Moriarty, 1990; Prieur *et al.*, 1990; Clements, 1997), por lo cual géneros comúnmente encontrados en estos medios de cultivo como *Vibrio* y *Pseudomonas* también han sido evaluadas como posibles probióticos, incluso algunas cianobacterias han sido propuestas como probióticos para camarón (Preetha *et al.*, 2007).

Existen varios productos comerciales, algunos de los cuales son utilizados en Colombia (*MIC Sanolife*, INVE; *Biostart Advanced Microbial Systems*, Shakopee, MN; *BRF-1A*, *BRF-13A*, *PB-32*, *PBL-44*; Enviro-Reps International, Camarillo, CA; *PondPro-VC*, Biomangement Systems, Australia; *Probiotics*, Contessa,ZB Industries, San Pedro, CA; *Aquabiotic*, Loveland Industries Ltd, USA; *Organic GreenTM*, Hang Poong Industry, Inchon City, Corea; *BioSaf*, SafAgri, Minneapolis,MN), principalmente compuestos por bacterias nitrificantes y/o *Bacillus* spp. las cuales, al disminuir la cantidad de amonio y nitrito, mejoran el agua, beneficiando la salud de los animales. Es importante señalar que la calidad del agua de los cultivos intensivos no solo está determinada por la composición de la comunidad microbiana sino también por parámetros fisicoquímicos del agua tales como salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, así como otros factores estocásticos que pueden favorecer la entrada y proliferación de algunos microbios (Verschuere *et al.*, 1997, 2000a; Villamil *et al.*, 2003a).

USO DE PROBIOTICOS EN EL CULTIVO DE CAMARÓN EN COLOMBIA

En Colombia, a pesar de que la utilización de mezclas bacterianas comerciales en el cultivo de camarón es frecuente en algunas fincas de engorde, hasta el momento existen pocos estudios científicos que documenten los efectos reales en el cultivo, de tal manera que el incremento en la productividad como consecuencia del uso de probióticos en el país es controvertido. Existen varias razones que pueden explicar la discrepancia en los resultados obtenidos ya que hay factores críticos que pueden variar los resultados de manera dramática como la dosis del probiótico, el tiempo de administración, la fase en el ciclo de vida (Villamil *et al.*, 2003a; Martínez-Silva *et al.*, 2008a), además de la especie seleccionada como probiótico, ya que puede tener actividad antibacteriana frente a un patógeno pero no frente a otro que tenga otras estrategias de patogénesis (Martínez-Silva *et al.*, 2008b).

En los últimos años, se ha trabajado en el aislamiento y selección de bacterias propias del cultivo de camarón del Pacífico, con base en la actividad antibiótica *in vitro*. Los resultados obtenidos con las bacterias estudiadas muestran

resultados positivos durante desafíos experimentales contra bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* (Ramírez *et al.*, 2006; Bolívar, 2008). Es entonces importante continuar con esta aproximación metodológica y evaluar la actividad probiótica de las cepas durante infecciones experimentales con agentes infecciosos que ocasionan importantes mortalidades en el país, como *Spiroplasma* sp. (Nunan *et al.*, 2005), *Vibrio* spp. (Moriarty, 1998) y virus como la macha blanca (WSSV) y el Taura, que causan grandes pérdidas económicas y mortalidades (Balcázar, 2003).

CONCLUSIONES

Los estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la aplicación de un alto número de bacterias seleccionadas como probióticos tienen la capacidad de contribuir al establecimiento de la microbiota intestinal, incrementar el peso por la mejora en la asimilación del alimento, incrementar la supervivencia, la resistencia a infecciones y la respuesta inmune de los organismos cultivados, así como mejorar la calidad de agua en experimentos realizados a pequeña escala. Sin embargo, debido al bajo número de publicaciones que describen condiciones de producción intensiva, se evidencia la gran necesidad de establecer protocolos de aplicación de mezclas de probióticos comerciales de tal manera que se garanticen los mejores efectos en cuanto a supervivencia e incremento en peso en cada uno de los estadios de vida de los organismos cultivados para entender los episodios de altas mortalidades causadas por bacterias oportunistas, que han sido registrados en granjas comerciales. De igual manera, se espera que en Colombia puedan realizarse aislamientos y selección de bacterias autóctonas con potencial probiótico con el fin de desarrollar un producto comercial con un protocolo de administración estandarizado bajo las condiciones propias de los cultivos del país, teniendo en cuenta aspectos tan importantes como la dosis, el tiempo de administración, la edad de los organismos cultivados y la escala del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Seada, M. y J. Otto. 1985. Effect of increasing oxygen concentration on total denitrification and nitrous oxide release from soil by different bacteria. *Biol. Fert. Soils*. 1: 31-38.
- Aiba, Y., S. Nobuyuki, M. Abu, M. Kabir, M. Atushi y K. Yasuhiro. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.*, 93: 2097-2101.
- Alakomi, H. L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-kala y I. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2001-2005.

- Alavandi, S. V., K. K. Vijayan, T. C. Santiago, M. Poornima, K. P. Jithendran, S. A. Ali y J. J. Rajan. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, 17 (2):115-20.
- Balcázar, J. L. 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Reporte final, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador. 46 p.
- Balcázar, J. L. y T. Rojas-Luna. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol.*, 55 (5): 409-12.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I. Zarzuela-Ruiz, D. Cunningham, D. Vendrell y J. L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture (Review). *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. Calvo, O. Girones y J. L. Muzquiz. 2007a. Changes in intestinal micro biota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97: 522-527.
- Balcázar, J. L., I. De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés y J. L. Muzquiz. 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic LAB against furunculosis in rainbow trout. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51: 85-193.
- Balcázar, J. L., T. Rojas-Luna y D. P. Cunningham. 2007c. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96 (2): 147-50.
- Bengmark, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*, 42: 2-7.
- Bolívar, N. 2008. Evaluación de sobrevivencia y respuesta inmunitaria de juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con bacterias probióticas. Trabajo de grado Biología. Univ. Valle, Cali. 103 p.
- Brown, M. R., S. M. Barrett, J. K. Volkman, S. P. Nearhos, J. A. Nell y G. L. Allan. 1996. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve culture. *Aquaculture*, 143: 341-360.
- Brunt, J., A. Newaj-Fyzul y B. Austin. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 30 (10): 573-579.
- Cai, Y., Y. Benno, T. Naskase y O. H. Tae-Kwang. 1998. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *Genet. Microbiol.*, 44: 311-316.
- Chiu, C. H., Y. K. Guu, C. H. Liu, T. M. Pan y W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 23 (2): 364-77.
- Clements, K. D. 1997. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. 156-198. En: Mackie, R. I., B. A. With y R. E. Isaacson (Eds.). *Gastrointestinal ecosystems and fermentations*. Chapman and Hall Microbiology Series, International ThompsonPublishing, Nueva York. 241 p.
- Dalmin, G., K. Kathiresan y A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.*, 39: 939-942.
- Decamp, O. y D. J. Moriarty. 2007. Acuaculture species profit from probiotics. *Feed Mix*, 15: 1.
- Decamp, O., D. J. Moriarty y P. Lavens. 2006. Selected bacillus strains as feed additive for aquaculture. *Feed Technology*. Septiembre 2006: 1-5

- Decamp, O., D. J. Moriarty y D. Lavens. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39: 334-338
- De Pablo, M. A., J. J. Gafotio, A. Gallego, E. Ortega, A. M. Gálvez y G. Álvarez de Cienfuegos López. 1999. Evaluation of immunomodulatory effects of nisin-containing diets on mice. *FEMS Immunol. Medical. Microbiol.*, 24: 35-42.
- Direkbusarakom, S., M. Yoshimizu, Y. Ezura, L. Ruangpan y Y. Danayadol. 1998. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J. Mar. Biotechnol.*, 6: 266-267.
- FAO. 2006. State of world aquaculture. Copia avanzada. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. Roma. 198 p.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378.
- Garriques, D. y G. Arévalo. 1995. An evaluation of the production and use of live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. 53-59. En: Browdy, C. L. y J. S. Hopkins (Eds.). *Swimming through Troubled Water. Proceedings of the special session on shrimp farming.* World Aquaculture Society, Baton Rouge. 253 p. EE. UU.
- Gatesoupe, F. J. 1991. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement on their bacterial environmental and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. 561-568. En: Kaushik, S. J. y P. Luquet (Eds.). *Fish nutrition in practice.* Institut National de la Recherche Agronomique, París. 572 p.
- Gatesoupe, F. J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* against pathogenic *Vibrio*. *Aquat. Living. Resour.*, 7: 277-282
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture (Review). *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Gatesoupe, F. J. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14 (1-3): 107-114.
- Gildberg, A., A. Johansen y J. Børgwald. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplements with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138: 23-34.
- Harzevili, A. R. S., H. Van Duffel, T. Defoort, P. Dher, P. Sogerloos y J. Swings. 1998. The influence of a selected bacterial strain *Vibrio anguillarum* TR 27 on the growth rate of rotifers in different culture conditions. *Aquacult. Int.*, 5: 183-188.
- Hektoen, H., J. A. Berge, V. Hormazabal y M. Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133: 175-184.
- Hjelm, M., A. Riaza, F. Formoso, J. Melchiorson y L. Gram. 2004. Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and *Vibrionaceae* strains in a turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 7288-7294.
- Hirata, H., O. Murata, S. Yamada, H. Ishitani y M. Wachi. 1998. Probiotic culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 387/388: 495-498.
- Holzappel, W. H. P., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger y J. H. J. Huis in't Veld. 1998. Over view of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 41 (2): 85-101.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Advanced Applied Microbiology*, 27: 85-123.

- Imada, C. M., M. Maeda y N. Taga. 1985. Purification and characterization of the protease inhibitor "monastatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish. *Can J Microbiol.*, 31: 1089-1094.
- Irianto, A. y B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.*, 25: 633-642.
- Jory, D. 1998. Use of probiotics in penaeid shrimp growout. *Aquac. Manag.*, 24: 62-67.
- Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura y T. Kimura. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.*, 32: 67-73.
- Kihara, M. y T. Sakata. 1997. Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 118: 1201-1207.
- Kim, J. K., K. J. Park, K. S. Cho, S. Nam, T. Park y R. Bajpai. 2005. Aerobic nitrification - denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresour. Tech.*, 96: 1897-1906.
- Kirjavainen, P. V., H. S. El-Nezami, S. J. Salminen, J. T. Ahokas y P. F. A. Wright. 1999a. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, 2: 131-135.
- Kirjavainen, P. V., H. S. El-Nezami, J. T. Salminen, J. T. Ahokas y P. F. A. Wright. 1999b. Effects of orally administered viable *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium freudenrichii* subsp. *shermanii* JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6: 799-802.
- Klaenhammer, T. R. 1998. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 70: 337-349.
- Kontula, P., J. Jaskari, L. Nolle, I. De Smet, A. Von Wright, K. Poutanen y T. Mattila-Sandholm. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. *Appl. Microbiol. Biot.*, 50: 246-252.
- Laloo, R., S. Ramchuran, D. Ramduth, J. Gorgens y N. Gardiner. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Jour. Appl. Microbiol.*, 103: 1471-1479.
- Lewus, C. B., A. Kaiser y T. J. Montville. 1991. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Microbiology*, 57: 1683-1688.
- Li, K., T. Zheng, Y. Tian, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang y H. Hong. 2007. Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol Lett.*, 4: 525-30.
- Lightner, D. V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases in penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE. UU. 305 p.
- Lin, C. K. 1995. Progression of intensive marine shrimp culture in Thailand. 12-23. En: Hopkins, S. J. (Eds.). Proceedings of the special session on shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE. UU. 1323 p.
- Lin, Y., S. Tanaka y H. Kong. 2006. Characterization of a newly isolated heterotrophic nitrifying bacterium. *Water Pr. Tech.*, 10: 22-166.
- Lindgren, S. y G. Clevström. 1978. Antibacterial activity of Lactic acid bacteria. *Swed. J. Agr. Res.*, 8: 61-66.

- Liu, W. y J. N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2551-2558.
- Maeda, M. 1994. Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., 1: 71-74.
- Maeda, M., K. Nogami, M. Kanematsu y K. Hirayama. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. Hydrobiologia, 358: 285-290.
- Martínez-Silva, M., A. Devia, A. Ospina, C. Reyes y L. Villamil. 2008a. Nuevos indicios sobre la idoneidad de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* como probióticos en el cultivo de tilapia nilótica. Rev. Colomb. Cienc. Pecu., 21: 493-494.
- Martínez-Silva, M., A. Devia, A. Ospina, C. Reyes y L. Villamil. 2008b. Relación entre el uso de *Bacillus* y *Lactobacillus* y el nivel de supervivencia de tilapia nilótica durante desafíos experimentales con bacterias patógenas. Rev. Colomb. Cienc. Pecu., 21: 499.
- Midolo, P. D., J. R. Lambert, R. Hull, F. Luo y M. L. Grayson. 1995. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCNT 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol., 79: 475-479.
- Moriarty, D. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. 217-222. En: Lesel, R. (Ed.). Microbiology in poecilothers. Elsevier, Amsterdam. 282 p.
- Moriarty, D. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, 164: 351-358.
- Moriarty, D. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Microbial interactions in aquaculture. 237-243. En: Bell, C. R., M. Brylinsky y P. Johnson-Green (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canadá.
- Naidu, A. S., W. R. Bidlack y R. A. Clemmens. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 39: 13-26.
- Nair, S. K., K. Tsukamoto y U. Shimidu. 1985. Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environments of Japan. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 51: 1469-1473.
- Netherwood, T., H. J. Gilbert, D. S. Parker y A. G. O'Donnell. 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol., 5134-5138.
- Nikoskelainen, S., A. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen y E. M. Lilius. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunol., 15: 443-452.
- Noh, S. H., K. Han, T. H. Won y Y. J. Choi. 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. Korean J. Anim. Sci., 36: 480-486.
- Nunan, L. M., D. V. Lightner, M. A. Oduori y G. E. Gasparich. 2005. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55: 2317-22.
- Ottesen, O. y J. Olafsen. 2000. Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae following microflora manipulation. Aquaculture, 187: 225-238.
- Paillard, C., F. Le Rox y J. J. Borrego. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquat. Living Resour., 17: 447-498.

- Preetha, R., N. S. Jayaprakash y I. S. Singh. 2007. *Synechocystis* MCCB 114 and 115 as putative probionts for *Penaeus monodon* post-larvae. *Dis Aquat Organ.*, 3: 243-247.
- Prieur, D. 1981. Experimental studies of trophic relationships between bacteria and bivalve mollusks. *Kiel. Meeresforsch. Sonderh.*, 5: 376-383.
- Prieur, D., G. Mével, J. L. Nicolas, A. Plusquellec y M. Vigneulle. 1990. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in marine environments. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 28: 227-352.
- Pruzzo, C., G. Gallo y L. Canesi. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ. Microbiol.*, 7 (6): 761-772.
- Queiroz, J. F. y C. E. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J. World Aquacult. Soc.*, 29: 67-73.
- Ramírez, C., A. Bolívar, G. A. Ciffoni, E. Pancheniak y E. Soccol. 2006. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. *La alimentación latinoamericana*, 264: 70-78.
- Ravi, A. V., K. S. Musthafa, G. Jegathammbal, K. Kathiresan y S. K. Pandian. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2: 219-223.
- Reitan, K. I., J. R. Rainuzzo, G. Øie y Y. Olsen. 1993. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Aquaculture*, 118: 257-275.
- Reitan, K. I., J. R. Rainuzzo, G. Øie y Y. Olsen. 1997 A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155: 207-221.
- Rengpipat, S., A. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul y P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167: 201-313.
- Rengpipat, S., A. Tunyanun, A. W. Fast, S. Piyatiratitivorakul y P. Menasveta. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis. Aquat. Organ.*, 8 (2): 169-73.
- Ringø, E. 1999. Does *Carnobacterium divergens* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., colonize the gut of early developing turbot, *Scophthalmus maximus* L., larvae? *Aquacult. Res.*, 30: 229-232.
- Ringø, E. y F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- Ringø, E. y E. Strøm. 1994. Microflora of Atlantic charr, *Salvelinus alpinus* (L.); gastrointestinal flora microflora of free-living fish, and effect of diet and salinity on the intestinal microflora. *Aquacult. Fish. Manage*, 25: 623-629.
- Ringø, E., P. D. Sinclair, H. Birkbeck y A. Barbour. 1992. Production of eicosapentaenoic acid (20:5n-3) by *Vibrio pelagius* isolated from Turbot (*Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3777-3778.
- Ringø, E., H. R. Bendisken, S. J. Gausen, A. Sundsfjord y R. E. Olsen. 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Atlantic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Appl. Microbiol.*, 85: 855-864.
- Riquelme, C., R. Araya y R. Escribano. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*, 181: 25-36.

- Robertson, L. A. y J. G. Kuenen. 1990. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57: 139-152.
- Robertson, P. A. W., C. O'Dowd, C. Burrells, P. Williams y B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185: 235-243.
- Sakai, K., Y. Ikehata, Y. Ikenaga y M. Wakayama. 1996. Nitrite oxidation by heterotrophic bacteria under various nutritional and aerobic conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 82: 613-617.
- Sakai, K., K. Nakamura, M. Wakayama y M. Moriguchi. 1997. Change in nitrite conversion direction from oxidation to reduction in heterotrophic bacteria depending on the aeration conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 86: 47-52.
- Salminen, S., E. Isolauri y E. Salminen. 1996. Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 5: 53-56.
- Santos, J., T. López-Díaz, M. García-Fernández y A. García-Otero. 1996. Effect of lactic starter culture on the growth and protease activity of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 13-18.
- Severina, E., A. Severin y A. Tomasz. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 41: 341-347.
- Smith, P., M. P. Hiney y B. D. Samuelsen. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev. J. Fish. Dis.*, 4: 273-313.
- Spanggaard, B., I. Huber, J. Nielsen, E. B. Sick, C. B. Pipper, T. Martinussen, W. J. Slierendrecht y L. Gram. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.*, 3 (12): 755-765.
- Strøm, E. y J. A. Olfasen. 1990. The indigenous flora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. 181-185. En: Lèsel, R. (Ed.). *Microbiology in poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam. 282 p.
- Subasinghe, R. 1997. Fish health and quarantine. En: FAO (Ed.). *Review of the state of the world aquaculture*. Fisheries circular no. 886, Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, Roma. 163 p.
- Tinh, N. T. N., K. Dierckens, P. Sorgeloos y P. Bossier. 2007. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food Chain. *Mar. Biotechnol.*, 10 (1): 1-12.
- Tsoumas, A., D. J. Alderman y C. J. Rodgers. 1989. *Aeromonas salmonicida*: development of resistance to 4-quinolone antimicrobials. *J. Fish Dis.*, 12: 493-507.
- Vaseeharan, B. y P. Ramasamy. 2003 Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36: 83-87.
- Vázquez, J. A., M. P. González y M. A. Murado. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149-161.
- Vázquez, J. A., S. F. Docasal, J. Mirón, M. P. González y M. A. Murado. 2006. Proteases production by two *Vibrio* species on residuals marine media. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33 (8): 661-668.
- Verschuere, L., J. Dhont, P. Soggerloos y W. Verstrate. 1997. Monitoring biolog patterns and r/K strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 603-612.
- Verschuere, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhont, P. Soggerloos y W. Verstrate. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through pre-emptive colonisation by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2527-2533.

- Verschuere, L., H. Heang, G. R. Criel, P. Soggerloos y W. Verstrate. 2000a. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 : 1139-1146.
- Verschuere, L., G. Rombaur, P. Soogerloos y W. Verstrate. 2000b. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 4 (64): 655-671.
- Villamil, L., C. Tafalla, A. Figueras y B. Novoa. 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of some lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin. Diagn. Labor. Immun.*, 9 (6): 1318-1323.
- Villamil, L., A. Figueras y B. Novoa. 2003a. Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immun.*, 14: 157-164.
- Villamil, L., A. Figueras, A. Toranzo, M. Planas y B. Novoa. 2003b. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* like strain associated to mass mortalities of turbot *Scophthalmus maximus* (L), larvae. *J. Fish Dis.*, 26: 293-303.
- Villamil, L., A. Figueras, M. Planas y B. Novoa. 2003c. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219: 43-56.
- Vine, N. G., W. D. Leukes y H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30 (3): 404-427.
- Wallace, R. J. y C. J. Newbold. 1992. Probiotics for ruminants. 317-353. En: Fuller, R. (Ed.). *Probiotics: the scientific basis*. Chapman and Hall, London.
- Wang, X., H. Li, X. Zhang, Y. Li, W. Ji y H. Xu. 2000. Microbial flora in the digestive tract of adult penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *J. Ocean. Univ. Qingdao*, 30: 493-498.
- Watanabe, K., K. Sezaki, K. Yazawa y A. Hino. 1992 Nutritive fortification of the rotifer *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid-producing bacteria. *Nippon Suisan Gakk.*, 58: 271-276.
- Williams, S. T. y J. C. Vickers. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microbiol. Ecol.*, 12: 43-52.
- Yazawa, K. 1996. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. *Lipids*, 31: 297-300.

FECHA DE RECEPCIÓN: 17/10/08

FECHA DE ACEPTACIÓN: 01/10/09

