

Uso de Probióticos en Acuicultura

F. J. Gatesoupe

Unité Mixte de Nutrition des Poissons INRA-IFREMER, Ifremer, Centre de Brest, BP 70, F-29280 Plouzané, France Tel 33 2 9822 4389, Fax 33 2 9822 4653, E-mail joel.gatesoupe@ifremer.fr

Resumen

Un número creciente de probióticos comerciales están siendo ofrecidos para satisfacer la demanda de prácticas ambientalmente amigables para el desarrollo de una acuicultura sustentable. Esta tarea ha sido principalmente empírica, pero la corroboración científica esta dándose. El concepto original de probiótico fue formulado en referencia a microorganismos vivos utilizados como suplementos alimenticios, los cuales mejoran la salud del hombre o del ganado. El primer punto esta dirigido hacia la pertinencia de la aplicación de este concepto a organismos acuáticos. Una característica importante es que estos tipos de microbiota son más dependientes del medio ambiente externo que los organismos terrestres. Una consecuencia práctica es que algunos productos diseñados para mejorar la calidad del agua, sean catalogados como probióticos, a pesar de que no se trata de suplementos dietarios. Entre los verdades aditivos alimentarios, los primeros probióticos evaluados fueron preparaciones comerciales para microbiota terrestre. Sin embargo, la principal atención esta puesta en probióticos autóctonos que puedan ser capaces de (1) antagonizar con patógenos; (2) colonizar el tracto gastrointestinal; (3) incrementar la resistencia del hospedero a enfermedades. Las prometedoras posibilidades de los probióticos están relacionadas con respecto a aplicaciones nutricionales y veterinarias, pero esto esta moderado por algunas recomendaciones de manejo cuidadoso e higiénico.

Introducción

El uso empírico de probióticos es tan viejo como los métodos prehistóricos de preservación de alimentos (Bengmark, 1998). El concepto científico de probióticos tiene solo 24 años de edad (Parker, 1974), e incluso este concepto ha sido discutido por muchos años. Para nuestro conocimiento, la primera aplicación empírica en acuicultura es relativamente reciente (Kozasa, 1986), y se puede esperar algo de soporte científico en este tema. Sin embargo, el interés en tratamientos amigables con el medio ambiente se esta incrementando rápidamente con la demanda de una producción sustentable, y el empleo empírico ha sido desarrollado antes de la racionalización científico. Un número creciente de probióticos comerciales han sido propuestos a los acuicultores, pero estos productos se consideran aun algo disparatados. Ahora es el momento para examinar el estado de arte, desde el uso empírico hasta el uso del método científico.

Los animales acuáticos y su medio ambiente son muy diferentes al paradigma original bajo el cual el concepto probiótico fue desarrollado. Esto plantea la interrogante de la pertinencia de la aplicación de probióticos para acuicultura, además no asegura la eficiencia de todos probióticos comerciales sobre el mejoramiento de la producción acuícola. Por el momento no hay una definición oficial de probiótico, aunque el concepto es ahora generalmente aceptado. Parker (1974) originalmente lo refirió como “organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal microbiano”. La definición fue entonces limitada a “un microbio vivo como complemento alimenticio el cual afecta benéficamente al animal hospedero mejorando el balance de los microbios intestinales” (Fuller, 1989).

Tannock (1996) se dio cuenta que el efecto sobre el “balance microbiano” no ha sido demostrado en muchos casos. El propuso referirse a “células microbianas vivas administradas como suplementos dietéticos con el fin de mejorar la salud”. Si se aplicará esta definición en el contexto acuático muchos de los llamados “probióticos” deberían ser excluidos, simplemente porque no pueden ser considerados como “suplementos dietéticos”. Sin embargo, lo siguiente mostrará que algunos de estos sustentan la relevancia del concepto original.

Es El Ambiente Intestinal Favorable Para Los Probióticos En Animales Acuáticos?

Desde un punto de vista taxonómico, organismos Gram-positivos obligados o anaerobios facultativos son dominantes en el tracto gastrointestinal del hombre y animales de crianza terrestre. La mayoría de los probiontes pertenecen a géneros dominantes o subdominantes en esa microbiota, por ejemplo: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. Organismos gram-negativos anaerobios facultativos predominan en el tracto digestivo de peces y crustáceos, y estos son comúnmente los probióticos más eficientes para acuicultura siendo diferentes de aquellos designados para especies terrestres.

Desde un punto de vista ontogénico, el hombre y los animales terrestres cultivados son amniotas, por ejemplo, ellos pasan su desarrollo embrionario en un amnio. En contraste, las formas larvales de peces y crustáceos son obligados a nadar y atrapar presas rápido, después de que salieron del huevo, incluso aunque su tracto digestivo no esta totalmente desarrollado. Estas formas larvales están altamente expuestas a desordenes de microbiota asociada, y a todo lo demás como a un sistema inmune que esta todavía en proceso de terminación. Sobre este concepto, se puede esperar una particular relevancia de tratamientos de probióticos durante los estadios larvales.

Desde un punto de vista ambiental, los microbios son residentes del tracto gastrointestinal del hombre y animales de crianza terrestres, donde se benefician de un hábitat bastante constante. La microflora es generalmente considerada como transitoria en organismos acuáticos. Estos animales son poiquiloterms, y su microbiota puede variar con los cambios de temperatura. Los cambios de salinidad también pueden influenciar la microbiota, y esto mismo obliga a los organismos juveniles marinos a beber agua constantemente para prevenir la pérdida de agua del cuerpo. Este flujo continuo incrementa la influencia del medio que lo rodea, de igual manera que en organismos cuya alimentación es por filtración, por ejemplo bivalvos, larvas de camarón y organismos utilizados como alimento vivo. Por lo tanto, el aislamiento de la microbiota intestinal acuática no está tan desarrollada como en las especies terrestres, aún así algunas cepas de microorganismos han sido probados para colonizar el intestino de los animales acuáticos.

Aplicaciones Del Concepto “Probiótico” En Un Sentido Amplio.

Las consideraciones ambientales precedentes pueden legitimar la extensión del concepto de probiótico para preparaciones de microbios vivos que han sido designados para tratar estanques acuícolas, sin ser administrados como complemento dietético. Es común que microbios introducidos dentro del agua de crianza pueden entrar al tracto digestivo mientras el animal esté bebiendo o filtrando el agua.

En 1991, Porubcan reportó intentos para mejorar la calidad del agua y rendimiento de producción de *Penaeus monodon*. En un primer experimento (Porubcan, 1991a), utilizó biofiltros flotantes preinoculados con una bacteria nitrificante que disminuyó las cantidades de amonio y nitritos en el agua, mientras que la sobrevivencia del camarón fue mejorada. En otro experimento (Porubcan, 1991b), introdujo *Bacillus* spp en aereadores de estanques cerrados. Este tratamiento redujo la demanda química de oxígeno e incrementó la cosecha del camarón.

Actualmente, hay algunos productos comerciales que están basados en la misma idea que el uso de bacterias, las cuales mejoran la calidad del agua y que pueden beneficiar la salud del animal. Esos productos son nombrados como “probióticos” y muchos de ellos contienen bacterias nitrificantes y/o *Bacillus* spp. Hay una tendencia a amalgamar estos tratamientos con bacterias, aunque ellos sean totalmente diferentes desde un punto de vista de probiótico. Una bacteria nitrificante tiene estrictos nichos ecológicos, y no pueden influenciar directamente sobre la microbiota digestiva. Es poco probable que las cepas de *Bacillus* spp. puedan colonizar el tracto digestivo, sin embargo, estas pueden ser activas durante el tránsito intestinal, y tales cepas transitorias son usadas como probióticos en organismos de crianza terrestres. Queiroz y Boyd (1998) han confirmado el efecto benéfico de preparaciones conteniendo *Bacillus* spp. en la producción de bagre. Moriarty (1998) seleccionó cepas de *Bacillus* spp. que producen antibióticos contra el *Vibrio* sp luminiscente. La adición de esas cepas de *Bacillus* dentro de estanques acuícolas de peneidos disminuyó la proporción del patógeno luminoso *Vibrio* spp., especialmente en los sedimentos, mientras que la producción de camarón mejoró. Aunque el mecanismo de acción no ha sido elucidado aun, se ha propuesto la exclusión competitiva (Moriarty, 1998). Este principio sugiere que en un ambiente relativamente uniforme en el cual las especies están compitiendo por los mismos recursos, el mejor competidor para un recurso crítico deberá dominar a la comunidad. Por lo tanto, el uso de *Bacillus* spp. como complemento en estanques parece oportunamente asimilado con los tratamientos con probióticos. Otra terminología debería referirse a la aplicación de bacterias nitrificantes que están relacionadas al concepto de la bioremediación. Este concepto se refiere a el tratamiento de contaminantes o desechos por el uso de microorganismos que rompen las sustancias indeseables. El mismo concepto es algunas veces mencionado como bioaumentación (Moriarty, 1997).

Además de los probióticos, un caso de inhibición competitiva, la llamada “estrategia r/K”, ha sido también propuesta para control de la microbiota acuática (Vadstein *et al.*, 1993). La bacteria oportunista, incluyendo los patógenos potenciales, son r-estratégicos que crecen rápidamente tanto como el suministro del recurso no sea restringido. Su crecimiento puede ser inhibido por la competición con estrategias-K que dominan bajo condiciones de recurso limitando. Desafortunadamente, el recurso suministrado es raramente el factor limitante en acuicultura, y en principio debería aplicarse solamente al periodo inicial de colonización bacteriana en unidades de cultivo. La idea original fue dejar madurar un biofiltro que pudiera dificultar el crecimiento de las bacterias oportunistas, y que mejorara el crecimiento y sobrevivencia de las larvas de peces planos (Skjermo *et al.*, 1997). También se ha sugerido la

aplicación de este principio al cultivo de *Artemia* (Verschuere, 1997). Los probióticos seleccionados están lejos de ser estrategias-r, pero la combinación de ambos conceptos debería ser considerada para restringir el alimento disponible para los patógenos.

Por último, *Bacillus* spp. aislado de una capa externa de lodo parece tener la capacidad de proteger al pez de una infección dermal (Douillet, 1998). Ellos no son verdaderos probióticos, ya que no involucra al tracto gastrointestinal, pero el principio es bastante similar. Este aspecto merece atención adicional, con respecto a la importancia del mucus externo en peces que son sujetos a manipulaciones frecuentes.

EL USO DE PROBIOTICOS EN EL SENTIDO ESTRICTO

Aplicación de productos comerciales designados para organismos de crianza terrestre.

En los primeros experimentos de incorporación de probióticos en alimentos para acuicultura se utilizaron preparaciones comerciales diseñadas para organismos de crianza terrestres. El primero en ser evaluado fue el *Bacillus toyoi*. Esas esporas mejoraron la tasa de sobrevivencia de la anguila japonesa y la tasa de crecimiento del jurel (Kozasa, 1986), así como la tasa de crecimiento de larvas de turbot (gurrubata) (Gatesoupe, 1989). Otras esporas del *Bacillus* incrementaron la resistencia de la larva de gurrubata al patógeno *Vibrio* sp. (Gatesoupe, 1993). El uso de bacterias ácido lácticas fue también eficiente para mejorar la producción de rotíferos, y la tasa de crecimiento de larvas de lenguados (Gatesoupe *et al.*, 1989; Gatesoupe, 1990). También estos bacilos mejoraron la tasa de crecimiento de la carpa Israelí (Noh *et al.*, 1994). Bogut *et al.* (1998) confirmaron este efecto con el *Streptococcus faecium* sobre el crecimiento de la carpa, además de que observaron algunos efectos sobre la microbiota intestinal.

La sobrevivencia de estas cepas comerciales en el tracto gastrointestinal de peces es incierto, y solo algunas colonias de *Bacillus* sp. pudieron recuperarse en larvas de gurrubata (Gatesoupe, 1993). La producción hipotética de sustancias inhibitorias o sustancias promotoras del crecimiento de/por los probióticos puede ser propuesta para explicar sus efectos benéficos. Sin embargo, estos efectos parecen limitar generalmente el crecimiento, aunque se observaron beneficios en la salud en algunos casos. Los probióticos aislados del ambiente acuático pueden ser más potentes que aquellos productos comerciales.

La búsqueda de probióticos acuáticos autóctonos

La primer historia exitosa en la selección de probióticos del medio acuático ha sido lograda con larvas de crustáceos. En Japón. Nogami y Maeda (1992) aislaron una cepa bacteriana que reprime el crecimiento del *Vibrio* spp. patógeno, e incrementa la producción de la larva del cangrejo *Portunus trituberculatus*. En laboratorios de crianza ecuatorianos, Griffith (1995) reportó que larvas de camarón fueron afectadas por una enfermedad bacteriana caracterizada por un descenso en cantidades de *Vibrio alginolyticus* y el incremento de *V. parahaemolyticus*. Esta cepa de *V. alginolyticus* fue exitosamente empleada para curar la enfermedad. Después, el efecto de este probiótico fue investigado por Austin *et al.*, (1995) quienes observaron que (1) el sobrenadante del cultivo inhibió a los patógenos de los peces *in vitro*; (2) el probionte sobrevivió en el intestino del salmón Atlántico después de tres semanas; (3) un baño preliminar con el probionte mejoró la sobrevivencia del salmón puesto a prueba con patógenos. Este es un buen ejemplo de lo que podría ser esperado de los probióticos, por

ejemplo, (1) antagonismo a patógenos, (2) colonización del intestino, con posible adhesión al mucus, (3) mejoramiento de la sobrevivencia.

(1) El antagonismo parece ser común entre bacterias marinas. Por ejemplo, más del 60% de las bacterias aisladas del zooplancton fueron bacteriolíticas (Nair *et al.*, 1985). Más del 75% de las bacterias aisladas de esponjas producen componentes antibacteriales (Marty y Martin, 1992). Más del 100% de las aisladas durante la primera alimentación de larvas de mero inhibieron al *Vibrio* sp. patógeno (Bergh, 1995). La mayoría de las cepas marinas antagónicas pertenecen a los grupos de *Pseudomonas-Alteromonas* y/o *Vibrio* (Lemos *et al.*, 1985; Nair *et al.*, 1985). La actividad antibacteriana también es común en la microbiota de agua dulce (Sugita *et al.*, 1996). Algunas bacterias ácido lácticas como *Carnobacterium divergens* y *Lactobacillus* sp. son antagónicas a patógenos de peces (Strøm, 1988; Byun *et al.*, 1997; Jöborn, 1997). Sugita *et al.*, (1998) aisló una cepa de *Bacillus* sp. que fue antagónica al 63% de las aisladas del intestino de peces. Las pruebas *in vitro* generalmente tienen como objetivo cepas patógenas de *Vibrio* o *Aeromonas*, pero algunos otros patógenos de peces son también sensibles al antagonismo, por ejemplo *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia ruckeri* (Dopazo *et al.*, 1988; Byun *et al.*, 1997). Algunas bacterias también son antagónicas a virus (ej., Kamei *et al.*, 1987; Okamoto *et al.*, 1988).

(2) Después de la crianza, el bacalao y el mero son colonizados por *Pseudomonas*, y/o grupos de *Cytophaga/Flexibacter/Flavobacterium* (Strøm y Ringø, 1993; Bergset *et al.*, 1994). Sin embargo en larvas de bacalao, esta microbiota normal puede ser artificialmente dominada por más del 70 % del total, por bacterias ácido lácticas aisladas del intestino del bacalao y añadidas al agua (Strøm y Ringø, 1993). Los grupos de *Vibrio/Aeromonas* llegan a ser dominantes después de la primera alimentación (Bergh *et al.*, 1994). En este estadio, la dominancia artificial de algunos candidatos a probióticos fue obtenida en larvas de gurrubata, ej. *Carnobacterium* sp. (Gatesoupe, 1994); *Aeromonas* sp. (Munro *et al.*, 1995), *Vibrio* sp. (Gatesoupe, 1997a), *Vibrio pelagius* (Ringø y Vadstein, 1998). La colonización artificial de juveniles de peces también ha sido alcanzada: en la gurrubata y el lenguado con aislamientos intestinales (Olsson *et al.*, 1992); en trucha arcoiris y gurrubata con levaduras (Andlid *et al.*, 1995); en el salmón del Atlántico con *Vibrio alginolyticus* (Austin *et al.*, 1995) y con *Carnobacterium divergens* (Gildberg *et al.*, 1995). La última aislada también colonizó el intestino de larvas de mero (Gildberg *et al.*, 1997). Otra bacteria ácido láctica, *Lactobacillus* sp., colonizó al rodaballo japonés (Byun *et al.*, 1997).

La adhesión es reconocida como el primer paso de la colonización microbiana. Pruebas *in vitro* indican que

Carnobacterium sp. se adhiere no-específicamente al mucus intestinal de la trucha arcoiris (Jöborn *et al.*, 1997). Las levaduras también se adhieren a este mucus (Vázquez-Juárez *et al.*, 1997), pero se ha demostrado la implicación de adhesinas específicas (Vázquez-Juárez, 1996). La levaduras como probióticos para acuicultura deberían merecer más atención hasta obtener algún éxito con ellas (Intriago *et al.*, 1998).

(3) Hay todavía pocas investigaciones del efecto de probióticos en pruebas de reto desarrollados *in vivo*. En 1989, Gil-Turnes *et al.*, demostraron que había una simbiosis entre *Alteromonas* sp. que protegió a *Palaemon macrondactylus*, cuando el embrión del camarón fue infectado con el hongo patógeno, *Lagenidium callinectes*. *Alteromonas haloplanktis* limitó la mortalidad de la almeja *Argopecten purpuratus* causado por una infección experimental con *Vibrio anguillarum* (Riquelme *et al.*, 1996). Un baño preliminar con *Pseudomonas fluorescens* mejoró la resistencia del salmón del Atlántico a *Aeromonas salmonicida* (Smith y Davey,

1993). El mismo efecto fue observado con un baño preventivo de *Vibrio alginolyticus*, el cual también protegió al salmón contra *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalii* (Austin *et al.*, 1995). Larvas de gurrubata tratadas con bacterias ácido lácticas, u otras especies de *Vibrio*, o *Pseudomonas*, incrementaron su resistencia al realizar pruebas con un *Vibrio* sp. patógeno (Gatesoupe, 1994; 1997a,b). El *Vibrio pelagius* parece ser que protegió a larvas de gurrubata contra *Aeromonas caviae* (Ringø y Vadstein, 1998). *Carnobacterium divergens* mejoró la resistencia de los juveniles de bacalao expuestos a *Vibrio anguillarum* (Gildberg *et al.* 1997). Una cepa de *Lactococcus lactis* mejoró la tasa de producción de rotíferos expuestos a *Vibrio anguillarum* (Shiri Harzevili *et al.*, 1998).

PERSPECTIVAS DE DESARROLLO

Aspectos Nutricionales

La introducción benéfica de bacterias en el medio de organismos filtradores como bivalvos puede ser totalmente relevante para el concepto de probióticos (Riquelme *et al.*, 1996), que también puede contribuir directamente a la nutrición del hospedero (Douillet, 1994). La combinación de ambos papeles puede ser altamente valioso.

La exclusión competitiva ha sido mencionada anteriormente como posible mecanismo para efectos probióticos. La disponibilidad de nutrientes es efectivamente vital para los probiontes y patógenos, así como para el hospedero. Hasta ahora la atención ha sido enfocada sobre la disponibilidad del hierro. Smith y Davey (1993) sugirieron que la inhibición del crecimiento de *Aeromonas salmonicida* en un medio de cultivo agotado por *Pseudomonas fluorescens* fue dado por la competencia por el hierro libre. La relación entre la acción inhibitoria y la producción de siderophoros (pequeños compuestos excretados por la bacteria) parece ser efectivamente común para muchas *Pseudomonas* spp. (Gram, 1993). La incorporación de hierro parece estar también ligada con la competencia que hay entre *Vibrio* spp. (Pybus *et al.*, 1994), y los siderophoros purificado de una bacteria puede parcialmente imitar el efecto probiótico en larvas de gurrubata (Gatesoupe, 1997a). La actividad antibacterial de *Bacillus* sp. aislada por Sugita *et al.* (1998) fue también atribuida, al menos parcialmente, a los siderophoros. Aunado a el tratamiento probiótico, la dieta debe tomar en cuenta no solamente los requerimientos del animal, sino también aquellos de los probiontes contra los patógenos. En particular, la limitación del hierro tiene un efecto significativo sobre la microbiota de larvas de lobina (Gatesoupe *et al.*, 1997). Otros nutrientes de peces parecen afectar la flora, ej. ácidos grasos poliinsaturados en salmónidos (Ringø, 1993). Generalmente, cada suministro de nutrientes debe ser ajustado para satisfacer pero no exceder los requerimientos del hospedero y los probióticos.

Otras manipulaciones dietéticas para aumentar probióticos deberían estar basadas en el concepto de probiótico propuesto por Gibson y Roberfroid (1995). El probiótico ha sido definido por esos autores como "Un ingrediente alimenticio no digerible que afecta benéficamente al hospedero por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, y por lo tanto mejora la salud del hospedero".

Aspectos Veterinarios

Diversos mecanismos de acción pueden ser esperados de probióticos, pero aún no han sido demostrados en ambientes acuáticos. Por ejemplo, la adhesión al mucus intestinal es particularmente importante entre los factores ecológicos y los probióticos con fuerte potencial de adhesión pueden competir y obstruir la ruta de infección intestinal. Otro ejemplo es la

posible implicación de probióticos en inmunoestimulación. Muchos inmunoestimulantes han sido probados en peces, y algunos de ellos originados de microbios, ej. muramil dipéptido, glucanos, lipopolisacáridos (Anderson, 1992). Es común que inofensivos microbios vivos también realcen el sistema inmune del hospedero.

Conclusión

La perspectiva de los probióticos muestra una considerable promesa, pero debemos tener cuidado del triunfalismo. A pesar del creciente número de pruebas exitosas en acuicultura, esos tratamientos con probióticos no son todavía un asunto de rutina. Puede ser prudente recordar algunas reglas básicas, con optimismo obviamente para todos. El uso preventivo de preparaciones de probióticos comerciales es comúnmente seguro, pero su protección puede fallar y el acuicultor debería primeramente llamar al veterinario en caso de que comenzaran a enfermar. Además, estos tratamientos deben ser reforzados con cuidado e higiene durante el manejo, ya que los probióticos forman parte del intento para el control de otros microbios acuáticos, a los cuales debe aplicárseles el "sistema 3K (3M)". Con la finalidad de preservar el alimento libre de microbios para que no se echen a perder, este sistema propone: "(1) Mantenerlos fuera. (2) Matarlos si se puede. (3) Mantener al resto creciendo" (Foster, 1989). Estos objetivos deberían ser cumplidos respetando los principios de conservación del ambiente, evitando en particular el abuso de antibióticos y la liberación de desinfectantes contaminantes.

Referencias:

- Anderson, D.P.** (1992) Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases 2, 281-307.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R. and Gustafsson, L.** (1995) Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Microbial Ecology 30, 321-334.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I. and Griffith, D.R.W.** (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases 18, 93-96.
- Bengmark, S.** (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Gut 42, 2-7.
- Bergh, Ø., Naas, K.L. and Harboe, T.** (1994) Shift in the intestinal microflora of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae during first feeding. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 51, 1899-1903.
- Bergh, Ø.** (1995) Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. Journal of Fish Diseases 18, 31-40.
- Bogut, I., Milakovic, Z., Bukvic, Z., Brkic, S. and Zimmer, R.** (1998) Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). Czech Journal of Animal Science 43, 231-235.
- Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y. and Oh, T.K.** (1997) Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal of General and Applied Microbiology 43, 305-308.
- Douillet, P.A.** (1994) Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thundberg). Aquaculture 119, 25-40.
- Douillet, P.A.** (1998) Bacterial probiotic for water quality and disease control. In: World Aquaculture '98, Nevada (USA), February 15-19, 1998, World Aquaculture Society, Baton Rouge LA, USA, p. 152.
- Dopazo, C.P., Lemos, M.L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J.L. and Toranzo, A.E.** (1988) Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology 65, 97-101.
- Foster, E.M.** (1989) A half century of food microbiology. Food Technology 43, 208-216.

- Fuller, R.** (1989) Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- Gatesoupe, F.J.** (1989) Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. In: *Aquaculture - A Biotechnology in Progress* (eds N. De Pauw, N., E. Jaspers, H. Ackefors and N. Wilkins) European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, pp. 721-730.
- Gatesoupe, F.J., Arakawa, T. and Watanabe, T.** (1989) The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 83, 39-44.
- Gatesoupe, F.J.** (1990) The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture* 89, 139-148.
- Gatesoupe, F.J.** (1993) *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: Improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. In: *Fish Nutrition in Practice* (eds S.J. Kaushik and P. Luquet) Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, Les Colloques 61, pp. 561-568.
- Gatesoupe, F.J.** (1994) Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic Living Resources* 7, 277-282.
- Gatesoupe, F.J.** (1997a) Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources* 10, 239-246.
- Gatesoupe, F.J.** (1997b) Metal chelation and the dietary value of rotifers for turbot larvae. 2. The interaction with bacteria. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on: Research for Aquaculture: Fundamental and Applied Aspects*, Barcelona, Spain, 24-27 Aug 1997, European Society for Comparative Physiology and Biochemistry, p. 221.
- Gatesoupe F.J., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C. and Quazuguel, P.** (1997) Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158, 117-127.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, B.** (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- Gil-Turnes, M.S., Hay, M.E. and Fenical, W.** (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* 246, 116-118.
- Gildberg, A., Johansen, A. and Bøgvold, J.** (1995) Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 138, 23-34.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringø E.** (1997) Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352, 279-285.
- Gram, L.** (1993) Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied Environmental Microbiology* 59, 2197-2203.
- Griffith, D.R.W.** (1995) Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: *Larvi'95 - Fish & Shellfish Larviculture Symposium* (eds P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants) European Aquaculture Society, Special Publication 24, Gent, Belgium, p. 478.
- Intriago, P., Krauss, E. and Barniol, R.** (1998) The use of yeast and fungi as probiotics in *Penaeus vannamei* larviculture. In: *World Aquaculture '98*, Nevada (USA), February 15-19, 1998, World Aquaculture Society, Baton Rouge LA, USA, p. 263.
- Jöborn, A., Olsson, C., Westerdahl, A., Conway, P.L. and Kjellberg, S.** (1997) Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extract by *Carnobacterium* sp. strain K. *Journal of Fish Diseases* 20, 383-392.
- Kamei, Y., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T.** (1987) Screening of bacteria with antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from estuarine and marine environments. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 53, 2179-2185.
- Kozasa, M.** (1986) *Toyocerin (Bacillus toyoi)* as growth promotor for animal feeding. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 4, 121-135.
- Lemos, M.L., Toranzo, A.E. and Barja, J.L.** (1985) Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds *Microbial Ecology* 11, 149-163.
- Marty, P. and Martin, Y.** (1992). Bactéries hétérotrophes aérobies isolées d'invertébrés benthiques des eaux côtières méditerranéennes: caractéristiques des souches, production d'exoenzymes et d'agents antibactériens. *Marine Life* 1, 1-8.

- Moriarty, D.J.W.** (1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151, 333-349.
- Moriarty, D.J.W.** (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351-358.
- Munro P.D., Barbour, A. and Birkbeck, T.H.** (1995) Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Applied Environmental Microbiology* 61, 4425-4428.
- Nair, S., Tsukamoto, K. and Shimidu, U.** (1985) Distribution of bacteriolytic bacteria in the coastal marine environment of Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51, 1469-1473.
- Nogami, K. and Maeda, M.** (1992) Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2373-2376.
- Noh, S.H., Han, K., Won, T.H. and Choi, Y.J.** (1994) Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. *Korean Journal of Animal Sciences* 36, 480-486.
- Okamoto, N., Hirotani, H., Sano, T. and Kobayashi, M.** (1988) Antiviral activity of the crude extracts of phototrophic bacteria to fish viruses. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 54, 2225.
- Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L. and Kjelleberg, S.** (1992) Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied Environmental Microbiology* 58, 551-556.
- Parker, R.B.** (1974) Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition and Health* 29, 4-8.
- Porubcan, R.S.** (1991a) Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using floating biofilters containing processed diatomaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria. In: Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition, San Juan (Puerto Rico), June 16-20, 1991, World Aquaculture Society.
- Porubcan, R.S.** (1991b) Reduction in chemical oxygen demand and improvement in *Penaeus monodon* yield in ponds inoculated with aerobic *Bacillus* bacteria. In: Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition, San Juan (Puerto Rico), June 16-20, 1991, World Aquaculture Society.
- Pybus, V., Loutit, M.W., Lamont, I.L. and Tagg, J.R.** (1994) Growth inhibition of the salmon pathogen *Vibrio ordalii* by a siderophore produced by *Vibrio anguillarum* strain VL4355. *Journal of Fish Diseases* 17, 311-324.
- Queiroz, J.F. and Boyd, C.E.** (1998) Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 67-73.
- Ringø E.** (1993) Does dietary linoleic acid affect intestinal microflora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)? *Aquaculture and Fisheries Management* 24, 133-135.
- Ringø E. and Vadstein, O.** (1998) Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology* 84, 227-233.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. and Ishida, Y.** (1996) Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research* 15, 369-374.
- Shir Harzevili, A.R., Van Duffel, H., Dhert, P., Swings, J. and Sorgeloos, P.** (1998) Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquaculture Research* 29, 411-417.
- Skjermo, J., Salvesen, I., Øie, G., Olsen, Y. and Vadstein, O.** (1997) Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture International* 5, 13-28.
- Smith, P. and Davey, S.** (1993) Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases* 16, 521-524.
- Strøm, E.**, 1988. Melkesyrebakterier i fisketarm. Isolasjon, karakterisering og egenskaper. M. Sc. thesis, The Norwegian College of Fishery Science, 88 pp.
- Strøm, E. and Ringø E.** (1993) Changes in bacterial flora in developing cod, *Gadus morhua* (L.), larvae after inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the water. In : *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development* (eds B. Walther and H.J. Fyhn) University of Bergen, Norway, pp. 226-228.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y.** (1996) Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145, 195-203.

- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N. and Deguchi, Y.** (1998) Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165, 269-280.
- Tannock, G.W.** (1996) Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal microbes and host interactions* (eds R.I. Mackie, B.A. Witte and R.E. Isaacson) Chapman & Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, pp. 434-465.
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I., Skjermo, J. and Skjåk-Bræk, G.** (1993) A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: *Fish Farming Technology* (eds H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen and K. Tvinnereim) A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands, pp. 69-75.
- Vazquez-Juarez, R.** (1996) Factors involved in the colonization of fish intestine by yeasts. Ph. D. thesis, Göteborg University, Sweden, 134 pp.
- Vazquez-Juarez, R., Andlid, T. and Gustafsson, L.** (1997) Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6, 64-71.
- Verschuere, L., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Verstraete, W.** (1997) Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *Journal of Applied Microbiology* 83, 603-612.