

Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio

Jorge Günther¹ & Ricardo Jiménez-Montealegre²

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. A.P. 86-3000; Fax: +506+2376427.

1. jgunther@una.ac.cr, 2. rjimenez@una.ac.cr

Recibido 20-XI-2003. Corregido 21-VII-2004. Aceptado 28-VIII-2004.

Abstract: Effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on the growth and food utilization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under laboratory conditions. Three experiments were conducted to analyze the effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on the growth of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). The experiments were conducted under laboratory conditions, minimizing the indirect effects of the probiotic on the water quality and leaving only the possible bactericidal and digestion-support effects. A model of stress was also designed in tilapia to compare the effect with tilapia under normal conditions. The dose in the food was 0.1 % of the probiotic (5×10^8 CFU/g and 99.9 % maltrine) in the dry diet. Every 14 days the animals were weighed in group (tilapias ± 0.1 g, prawns ± 0.001 g) to estimate average body weight. In the first experiment (tilapia) the specific growth rate (SGR) and the feed conversion ratio (FCR) were bad in relation with the factor probiotic, but the differences were not significant. In the second experiment (tilapia) both the SGR and the FCR deteriorated with the addition of *B. subtilis* to the diet; the difference was significant to 94%. The stress factor, on the contrary, caused a notable worsening of both the growth and the food utilization. In the experiment with prawns the addition of *B. subtilis* caused a light deterioration of the growth and of the food utilization, with a statistical probability of mistake of 10% in case of the growth. During the experiment the direct effects over the digestive system should have prevailed, either by the contribution of macro- and micronutrients, or by the enzymes that contribute to the digestion. The negative effect due to the addition of the probiotic to the food was small (about 10% in both the SGR and the FCR) being difficult to detect statistically. The reports on the positive action of probiotics on the growth in aquatic animals have been conducted mainly in ponds, and our information does not contradict directly a possible positive action of *B. subtilis* in this type of systems. Since the effect on the digestive system seems to be relatively small, in those environments the effect might be compensated by other positive effects on water quality, and by bactericidal effects on pathogenic bacteria. Rev. Biol. Trop. 52(4): 937-943. Epub 2005 Jun 24.

Key words: probiotics, *Bacillus subtilis*, aquaculture, laboratory conditions, *Oreochromis niloticus*, *Macrobrachium rosenbergii*.

El uso de probióticos –microorganismos benéficos para el cultivo– en acuicultura se ha intensificado en los últimos diez años (Verschuere *et al.* 2000). Una de las causas es probablemente la imitación de su uso en la alimentación de monogástricos y mascotas. Además, la misma intensificación de la acuicultura de peces y crustáceos (Gómez-Márquez 1998, Gómez-Márquez *et al.* 2003, Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez 2003, Campaña

Torres *et al.* 2003, Re-Araujo y Acosta Ruiz 2003) puede ser otro factor influyente, lo que aumenta los problemas con enfermedades o la calidad del agua.

El primer probiótico usado comercialmente ha sido una cepa no patógena de *Vibrio alginolyticus*, que ya desde 1992 ha permitido mejorar sustancialmente el rendimiento en viveros de camarones en Ecuador y México (Verschuere *et al.* 2000). Pese a los numerosos

trabajos publicados en los últimos años, el uso de los probióticos en acuicultura sigue siendo ampliamente empírico, y sólo en pocos casos se ha podido establecer el efecto real del agente probiótico en el cultivo. El aspecto más estudiado ha sido el mejoramiento de la salud de los animales por la inclusión de probióticos ya sea en el alimento o en el agua, demostrado generalmente por su mayor resistencia a infecciones por agentes patógenos (Gatesoupe 1999, Geiger 2001), aunque en algunos casos no se ha encontrado efecto (Geiger 2001), o incluso efectos negativos como un aumento de la mortalidad (Gildberg *et al.* 1995). Al menos un informe (Wang *et al.* 2000) ha asociado una infección cutánea del camarón *Penaeus monodon* con el uso del probiótico *Bacillus subtilis*. Otros trabajos informan sobre un mejoramiento de la calidad del agua debido a los probióticos (Hui-Rong *et al.* 1999) y un efecto positivo en el crecimiento de los organismos (Gatesoupe 1999).

El efecto benéfico de los probióticos se atribuye en general a tres mecanismos diferentes (Wang *et al.* 1998, Verschuer *et al.* 2000), que, a su vez pueden deberse a varias causas:

1. Mejoramiento de la calidad del agua, ya sea por metabolización de la materia orgánica o por interacción con algunas algas.
2. Exclusión competitiva de bacterias nocivas, ya sea por (a) competencia por nutrientes, (b) competencia por sitios de fijación en el intestino, o (c) aumento de la respuesta inmunológica del hospedero.
3. Aportes benéficos al proceso digestivo del hospedero, mediante (a) aporte de macro y micronutrientes para el hospedero o (b) aporte de enzimas digestivas.

Uno de los microorganismos más usados como probiótico es la bacteria *B. subtilis*. En 1941 el ejército alemán en Africa del Norte descubrió que los árabes se automedicaban la disentería ingiriendo excremento fresco de camello y verificaron que la ingestión de *B. subtilis* era la causa de esta mejoría, aplicando luego este

tratamiento (sin el excremento) con éxito a sus propias tropas (Rothschild 1993). *B. subtilis* se encuentra en todo el ambiente, sobre todo en el suelo. No muestra toxicidad hacia vertebrados, aunque la EPA (2000) solicitó más estudios acerca de su efecto en invertebrados y animales acuáticos. Muestra una marcada acción bactericida y fungicida por lo que se ha aprobado su uso como biopesticida en plantas (EPA 2000). *B. subtilis* es un ingrediente común en las mezclas de probióticos recomendadas para el uso en animales acuáticos.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del probiótico *B. subtilis* sobre el crecimiento de juveniles de tilapia nilótica y de langostino de agua dulce en laboratorio. En el sistema controlado de laboratorio se minimizan los efectos indirectos del probiótico sobre la calidad del agua quedando solo los posibles efectos bactericidas y de apoyo a la digestión. Como la empresa distribuidora recomienda al probiótico especialmente en situaciones de estrés, se diseñó un modelo de estrés para la tilapia para comparar el efecto con tilapias en situación normal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad experimental: Se utilizaron 20 peceras de 20 litros cada una, en sistema recirculado con temperatura parcialmente controlada y filtros biológicos. El flujo de agua fue de aproximadamente 1 L/min en cada pecera. Todas las peceras se limpiaron diariamente por sifoneo a las 8 a.m. La alimentación fue de aproximadamente 1/3 de la ración diaria, ofrecida a las 8 a.m., 12 m.d. y 4 p.m.

Animales: En los dos experimentos con tilapia se usaron juveniles de *Oreochromis niloticus*, sin sexar, provientes de estanques de cultivo en 28 Millas, Limón, y adaptados a las peceras al menos 2 semanas antes de iniciar el experimento. El primero experimento se realizó con tilapias individuales en cada pecera, con peso promedio inicial de 5.6 g, coeficiente de variación inicial 12%, el segundo con tilapias en grupos de 20, con peso promedio inicial de

0.4 g. Las postlarvas de langostino se usaron en grupos de 70 por pecera con un peso promedio inicial de 48.7 mg, coeficiente de variación inicial 30%.

Probiótico: se empleó el producto Aquabiotic (Loveland Industries Ltd, USA), compuesto de 0.1% *B. subtilis*, 5×10^8 CFU/g y 99.9% maltrina. La dosis en el alimento tratado fue de 0.1% del peso seco del alimento.

Alimento: Se utilizó alimento comercial extrusado para tilapia (Corporación As de Oros, Belén). Los gránulos se pulverizaron en molino de martillo, se mezcló con agua tibia y el probiótico requerido y se volvió a granular a diámetro de 2 mm y a secar posteriormente a 50°C. Ambos alimentos (con y sin probiótico) fueron tratados exactamente de la misma manera excepto por la adición del probiótico en uno de ellos. El cuadro 1 muestra el análisis proximal de los dos alimentos.

Tasa de alimentación: Se calcularon las dosis de alimentación diarias individuales para cada pecera a partir del peso promedio de los organismos, calculando incrementos diarios. Las dosis se reajustó cada 15 días tomando en cuenta los nuevos pesos promedio. En las tilapias se usó un coeficiente de crecimiento inicial $G = 0,4$ (Iwama and Tautz 1981) y un factor de conversión de 1.25. Para los langostinos se tomaron valores de $G = 0.2$ y $FC = 1.2$. La ración diaria se entregó en 3 porciones.

Diseño experimental: Se realizaron tres experimentos, dos con juveniles de tilapia y

uno con postlarvas de langostino. El primer experimento, con una tilapia por pecera, consistió de cuatro tratamientos: con y sin probiótico en el alimento, con y sin aplicación de estrés a los peces. Cada tratamiento se replicó cinco veces para un total de 20 peceras. El segundo experimento se realizó con 20 tilapias por pecera, y consistió únicamente de dos tratamientos: con y sin probiótico en la dieta. Cada tratamiento se replicó diez veces para un total de 20 peceras. El tercer experimento se realizó con 70 postlarvas de langostino por pecera y consistió de dos tratamientos: con y sin probiótico en la dieta. Cada tratamiento se replicó cuatro veces para un total de ocho peceras. La asignación de las peceras a los diversos tratamientos se hizo de forma aleatoria.

Aplicación del estrés: En el primer experimento los peces se estresaron extrayéndolos rápidamente con una red de mano del respectivo acuario y devolviéndolos inmediatamente después. En la primera quincena se aplicó este tratamiento dos veces por día, en la segunda quincena solamente una vez al día, ya que se observó que en la primera quincena algunos animales estaban perdiendo peso.

Datos físico-químicos: Temperatura y oxígeno disuelto se controlaron diariamente a las 8 a.m. y a las 4 p.m. El nitrato disuelto se controló ocasionalmente. La temperatura promedio en los tres experimentos fue de 27.5°C (valor máximo 29.9°C, valor mínimo 24.7°C). El oxígeno disuelto promedio fue de 6.5 ppm (valor mínimo 5.9, valor máximo 6.9 ppm). El nitrato disuelto nunca sobrepasó los 0.05 ppm.

Análisis de datos: Cada 14 días se pesaban en grupo y se contaban los animales de cada pecera (tilapias ± 0.1 g, langostinos ± 0.001 g) y se obtenía el peso promedio individual.

Tasa específica de crecimiento: $TEC = (\exp^g - 1) * 100$,
donde $g = (\ln Pf - \ln Pi) / 28$ y

Factor de conversión: $FC = \text{alimento seco entregado} / \text{crecimiento peso fresco}$.

A los resultados se les aplicó un análisis de varianza.

CUADRO 1

Análisis proximal de los alimentos experimentales como porcentaje de la dieta

TABLE 1

Proximate composition expressed as percentage of experimental diet

	Con Probiótico	Sin Probiótico
Humedad	9.03	8.87
Proteína	28.3	29.1
Grasa	5.94	6.19
Fibra cruda	1.12	1.53
Ceniza	8.42	8.48
Extr.libre N	47.2	45.8

RESULTADOS

Experimento 1: El crecimiento y la utilización del alimento fueron un poco peores en relación con el factor probiótico, pero las diferencias no son significativas (Cuadro 2).

El factor estrés por el contrario provocó un notable empeoramiento tanto del crecimiento (Fig. 1) como del factor de conversión.

Experimento 2: El cuadro 3 muestra los resultados del experimento 2. Tanto la tasa específica de crecimiento como el factor de conversión empeoraron con la adición de *B. subtilis* a la dieta. La diferencia es significativa al 94%, apenas por debajo del 95% que se utiliza por convención estadística.

La mortalidad en los dos tratamientos fue relativamente alta y similar en ambos.

Experimento 3: El cuadro 4 muestra los resultados obtenidos con larvas de langostino *Macrobrachium rosenbergii* en un ensayo de crecimiento de 14 días. También en este caso, la adición de *B. subtilis* a la dieta provocó un ligero deterioro del crecimiento y de la utilización del alimento, con una probabilidad de error menor del 10% en el caso del crecimiento.

En este caso la mortalidad fue mayor con la dieta sin probiótico, con una probabilidad de error menor al 10%.

CUADRO 2

Crecimiento y utilización del alimento en la tilapia en dependencia de adición de B. subtilis a la dieta y aplicación de estrés

TABLE 2

Multifactor ANOVA analysis of growth and feed utilization in Tilapia in dependence of B. subtilis addition in diet and stress application

Factor		TEC	FC
Probióticos	Sin	2.33 a	6.97 a
	Con	2.10 a	9.95 a
Estrés	Sin	3.80 a	1.77 a
	Con	0.63 b	15.15 b

TEC: Tasa específica de crecimiento. FC: Factor de conversión alimenticia. Pares de datos con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

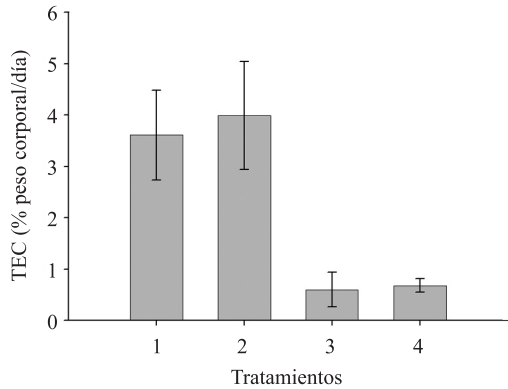


Fig. 1. Crecimiento de jóvenes de tilapia en dependencia del probiótico y de estrés. Tratamientos 1 y 2 sin, 3 y 4 con estrés. Tratamientos 1 y 3 con, 2 y 4 sin probiótico en la dieta.

Fig. 1. Growth of tilapia juveniles in dependence of probiotic and stress application. Treatments 1 and 2 without, 3 and 4 with stress application. Treatments 1 and 3 with, 2 and 4 without probiotics on feed.

CUADRO 3

Crecimiento, utilización del alimento y mortalidad en alevines de tilapia alimentados con adición de B. subtilis

TABLE 3

Growth, feed conversion and mortality in tilapia fry fed with B. subtilis diet

	TEC	FC	Mortalidad (%)
Con probiótico	7.34	2.75	17.5
Sin probiótico	7.90	2.43	16.25
P ≤	0.059	0.06	0.91

TEC: tasa específica de crecimiento. FC: factor de conversión alimenticia. P: probabilidad de que los valores de las columnas sean iguales.

DISCUSIÓN

La inclusión de bacterias benéficas en las dietas para animales acuáticos puede tener efectos muy variados con la última consecuencia de un mejoramiento de la salud y/o del crecimiento de los animales, aunque este último puede ser en parte una consecuencia del primero. La mayoría de los estudios realizados en peces han revelado una acción protectora de

CUADRO 4

Crecimiento, utilización del alimento y mortalidad en post-larvas de langostino alimentadas con adición de B. subtilis

TABLE 4

Growth, feed conversion and mortality in freshwater prawn postlarvae fed with B. subtilis diet

	TEC	FC	Mortalidad (%)
Con probiótico	6.14	3.46	19.3
Sin probiótico	6.79	3.19	27.1
P ≤	0.096	0.16	0.08

TEC: tasa específica de crecimiento. FC: factor de conversión alimenticia. P: probabilidad de que los valores de las columnas sean iguales.

los probióticos ante tratamientos con agentes patógenos, a través de los mecanismos anteriormente mencionados (punto 2) (Verschuere *et al.* 2000, Geiger 2001). En este caso, la acción protectora de los probióticos puede redundar en una mejoría del crecimiento de los animales, al librarlos de la acción patógena. Con la inclusión de los probióticos en estanques y un posible mejoramiento de la calidad del agua (punto 1) se podría también esperar un efecto benéfico indirecto sobre el crecimiento de los animales (Jory 1998, Queiroz y Boyd 1998). Un efecto directo sobre el crecimiento y la utilización del alimento tras la adición de probiótico a la dieta, se podría esperar por los mecanismos de acción antes nombrados (punto 3).

Las condiciones experimentales de este trabajo eliminan prácticamente los efectos indirectos por acción bactericida o por alteración de la calidad del agua. Todos los animales del ensayo estaban saludables y no fueron sometidos a la acción de agentes patógenos. El tratamiento de estrés en el primer experimento habría podido debilitar los animales estresados y aumentar su riesgo de infección, pero no parece probable que esto haya sido significativo en el periodo de solamente 28 días que duró el experimento. La calidad del agua no mostró ninguna alteración en los parámetros medidos (oxígeno y nitrito disuelto), y en cualquier caso, al tratarse de un sistema recirculado, todos los tratamientos recibían la misma agua. En nuestras condiciones experimentales debieron prevalecer los

efectos directos sobre el sistema digestivo de los animales experimentales, ya sea por aporte de macro- y micronutrientes o de enzimas que contribuyan a la digestión.

Los informes sobre la acción benéfica de los probióticos sobre el crecimiento se han realizado generalmente en estanques o en cultivos masivos (Gatesoupe *et al.* 1989 y Gatesoupe 1991 en *Scophthalmus*; Rengpipat *et al.* 1998 en *Penaeus monodon*; Noh *et al.* 1994 y Bogut *et al.* 1998 en *Cyprinus*; Queiroz y Boyd 1998 en *Ictalurus*; Hui-Rong *et al.* 1999 en *Penaeus japonicus*), situaciones en que varios mecanismos de acción pueden estar activos. En condiciones de laboratorio Gildberg *et al.* (1995) no encontró ningún efecto sobre el crecimiento de juveniles de salmón alimentados con el probiótico *Lactobacillus plantarum*, mientras que Ashraf (2000) informó un incremento del crecimiento de *Salvelinus alpinus* con una mezcla de bacterias de la familia Rhodospirillaceae.

Inesperadamente, en nuestros tres ensayos, el crecimiento disminuyó y la utilización del alimento empeoró ligeramente tras la adición de *B. subtilis* a la dieta. El efecto es pequeño (alrededor de un 10% en TEC y FC) y por ello difícil de detectar. El resultado no fue significativo con animales aislados, pero sobrepasó el margen de certidumbre del 90% cuando se midió con animales en grupo. En el caso de las tilapias en grupo (experimento 2) la mortalidad fue similar en ambos tratamientos y no ha podido interferir con los datos de crecimiento. El experimento con langostinos es menos concluyente, ya que, al haber una diferencia notable en la mortalidad de ambos tratamientos, no se puede excluir un efecto indirecto de la mortalidad sobre los resultados de crecimiento.

A pesar de estas limitaciones concluimos que el efecto es real, aunque liviano y que la adición de *B. subtilis* a la dieta de tilapias y langostinos probablemente afectó negativamente los procesos digestivos en estos organismos. *B. subtilis* ha sido descrita como productora de enzimas como proteasas y amilasas (Kim y Kim 2002), que, en principio, deberían contribuir a los procesos digestivos del hospedero. Por otra parte, *B. subtilis* no es una bacteria

propia del ambiente acuático, sino del suelo. Aunque otras bacterias telúricas como *B. toyoi* han dado buenos resultados (Geiger 2001), Gatesoupe (1999) advierte sobre la necesidad de trabajar con bacterias autóctonas que estén adaptadas al medio intestinal del hospedero. La relación entre los microorganismos autóctonos y la función intestinal es sumamente compleja (Hooper y Gordon 2001) y no se pueden excluir efectos nocivos por la inclusión masiva de una bacteria exógena con poderes bactericidas y fungicidas. Estas relaciones deben ser investigadas cuidadosamente.

Nuestros datos, sin embargo no contradicen directamente una posible acción benéfica de *B. subtilis* en cultivos a nivel de estanques. Como el efecto sobre el sistema digestivo aparenta ser relativamente modesto, en aquellos ambientes podría ser compensado por otros efectos benéficos sobre la calidad del agua y el efecto bactericida sobre otras bacterias exógenas de naturaleza patogénica.

RESUMEN

Se realizaron tres experimentos para analizar el efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de juveniles de tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) y de langostino de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*). Los experimentos se realizaron en condiciones de laboratorio, minimizando de esta manera los efectos indirectos del probiótico sobre la calidad del agua y manteniendo únicamente los posibles efectos bactericidas y de apoyo a la digestión. También se diseñó un modelo de estrés en tilapia para comparar el efecto con individuos en situación normal. La dosis del probiótico en el alimento tratado en todos los casos fue de 0.1% (5×10^8 CFU/g y 99.9% maltrina) en la dieta seca. Cada 14 días se pesaron en grupo y se contaron los animales de cada acuario (tilapias ± 0.1 g, langostinos ± 0.001 g) obteniéndose el peso promedio individual. En el primer experimento (tilapias) el crecimiento y la utilización del alimento fueron un poco peores en relación con el factor probiótico, pero las diferencias no fueron significativas. En el segundo experimento (tilapias) tanto la tasa específica de crecimiento como el factor de conversión empeoraron con la adición de *B. subtilis* a la dieta; la diferencia fue significativa al 94%, apenas por debajo del 95% que se utiliza por convención estadística. El factor estrés, por el contrario, provocó un notable empeoramiento tanto del crecimiento como del factor de conversión. En el experimento con langostinos la adición de *B. subtilis* a la dieta provocó un ligero deterioro del crecimiento y de

la utilización del alimento, con una probabilidad de error menor del 10% en el caso del crecimiento. Durante el experimento debieron prevalecer los efectos directos sobre el sistema digestivo de los animales experimentales, ya sea por aporte de macro- y micronutrientes o de enzimas que contribuyen a la digestión. El efecto negativo por la inclusión del probiótico fue pequeño (alrededor de un 10% en la tasa específica de crecimiento y en el factor de conversión alimenticia) y por ello difícil de detectar. Los informes sobre la acción benéfica de los probióticos sobre el crecimiento se han realizado generalmente en estanques o en cultivos masivos y nuestros datos no contradicen directamente una posible acción benéfica de *B. subtilis* en cultivos a nivel de estanques. Como el efecto sobre el sistema digestivo aparenta ser relativamente modesto, en aquellos ambientes podría ser compensado por otros efectos benéficos sobre la calidad del agua y el efecto bactericida sobre otras bacterias exógenas de naturaleza patogénica.

Palabras clave: probióticos, *Bacillus subtilis*, acuicultura, laboratorio, *Oreochromis niloticus*, *Macrobrachium rosenbergii*.

REFERENCIAS

- Ashraf, A. 2000. Probiotics in fish farming. Evaluation of a candidate bacterial mixture. Tesis de Licenciatura, SLU, Suecia.
- Bogut, I., Z. Milakovic, Z. Bukvic, S. Brkic & R. Zimmer. 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). J. Animal Sci. 43: 231-235.
- Briones-Fourzán, P. & E. Lozano-Álvarez. 2003. Factors affecting growth of the spiny lobsters *Panulirus gracilis* and *Panulirus inflatus* (Decapoda: Palinuridae) in Guerrero, México. Rev. Biol. Trop. 51: 165-174.
- Campana Torres, A., H. Villarreal Colmenares, R. Civera Cerecedo & L.R. Martínez Córdova. 2003. Efecto del nivel proteico de la dieta sobre el desarrollo de juveniles de la langosta australiana *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). Rev. Biol. Trop. Vol. 51: 749-752.
- EPA (US. Environmental Protection Agency). 2000. Biopesticide registration action document: *Bacillus subtilis*. 10 p.
- Gatesoupe, F.J., T. Arakawa & T. Watanabe. 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. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus*

- plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96: 335-342.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Geiger, F. 2001. Untersuchungen ueber die wirkung oral verabreichter β -glukane und probiotika bei zierfischen gegeneuber infektionen durch fakultativ pathogene bakterien. Tesis de Doctorado, Escuela Veterinaria Hannover. 115 p.
- Gildberg, A., A. Johansen & J. Bogwald. 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.
- Gómez-Márquez, J.L. 1998. Age and growth of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) in Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 46: 929-936.
- Gómez-Márquez, J.L., B. Peña-Mendoza, I.H. Salgado-Ugarte & Guzmán-Arroyo. 2003. Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 51: 221-228.
- Hooper, L.V. & J.I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.
- Iwama, G.K. & A.F. Tautz. 1981. A simple growth model for salmonids in hatcheries. *Canadian J. Fish and Aquatic Sci.* 38: 649-656.
- Jory, D.E. 1998. Use of probiotics in penaeid shrimp growout. *Aquac. Mag.* 24: 62-67.
- Kim, S.M. & W.J. Kim. 2002. Purification and characteristics of *Bacillus subtilis* JM-3 salt- and acid-tolerant protease derived from anchovy sauce. Annual Meeting and Food Expo, Anaheim, California. 2 p.
- Noh, S.H., K. Han, T.H. Won & Y.J. Choi. 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on growth performance of Israeli carp. *Korean J. Animal Sci.* 36: 480-486.
- Queiroz, J. & C. Boyd. 1998. Effect of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J. World Aquaculture Soc.* 29: 67-73.
- Re-Araujo, A.D. & M. de J. Acosta Ruiz. 2003. Ensayo de diferentes lecitinas en la dieta de juveniles de *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Rev. Biol. Trop.* 51: 743-748.
- Rengpipat, P., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.
- Verschuere L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Mol. Micr. Biol. Rev.* 64: 651-671.
- Wang, Y.G., K.L. Lee, M. Najjah, M. Shariff & M.D. Hassan. 2000. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Dis. Aquatic Organisms* 41: 9-18.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Hui-Rong, Li, Yu Yong, Ji Wei-Shang & Xu Huai-Shu. 1999. The Effect of Alken Clear-Flo 1200 used in grow-out ponds of *Penaeus japonicus*. Alken Murray Corporation. (Consultado: February, 26, 2002, <http://www.alken-murray.com/China99.htm>).
- Rothschild, P. 1993. The *Bacillus subtilis* story. (Consultado: May, 6, 2002, <http://www.absolutehealth.org/crit2.html>).
- Wang, Xiang-Hong, Li Jun, Ji Wei-Shang & Xu Huai-Shu. 1998. Application of probiotics in Aquaculture. Alken Murray Corporation. (Consultado: February, 26, 2002, <http://www.alken-murray.com/China98.htm>).

