



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES**

TESIS

**EFFECTO DE LOS PROBIÓTICOS ENRIQUECIDOS CON CURCUMINA SOBRE
LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LA TILAPIA**

PRESENTA

M.C. DAVID IBARRA MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

ASESORES

DR. ANDRÉS QUINTANAR STEPHANO

DR. MATÍN HUMBERTO MUÑOZ ORTEGA

Aguascalientes, Aguascalientes a 24 de marzo de 2022



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA VOTO APROBATORIO

M.C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Como miembros del Comité Tutoral designado del estudiante David Ibarra Martínez con ID 99878 quien realizo la tesis titulada EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS ENRIQUECIDOS CON CURCUMINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*), un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, damos nuestro consentimiento de que la versión final presentada ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente. Por lo que, nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO para que el interesado proceda a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del Grado. Adicionalmente, los resultados de este trabajo se han publicado en el artículo: Antibacterial activity of supernatants of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* and curcumin against *Aeromonas hydrophila*. In vitro study, en la revista Veterinary Research Communications, el cual ha sido publicado con fecha de enero 2022, clave de identificación doi.org/10.1007/s11259-021-09871-7

Ponemos lo anterior a su consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Javier Ventura Juárez Tutor	
Dr. Andrés Quintanar Stephano Asesor	
Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega Asesor	Martín Humberto Muñoz O.

Aguascalientes, Aguascalientes a 17 días de marzo de 2022



DICTAMEN DE LIBERACION ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 04-may-22

NOMBRE: DAVID IBARRA MARTÍNEZ **ID** 99878

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** PROTEÍNAS EN LA RESPUESTA INMUNE Y LA SECRECIÓN NEURAL

TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo práctico

TÍTULO: EFFECTO DE LOS PROBIÓTICOS ENRIQUECIDOS CON CURCUMINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LA TILAPIA

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

CONTRIBUYE AL CULTIVO EFICIENTE DE TILAPIA Y A SU MEJORAMIENTO INMUNITARIO

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI
No _____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. DANIEL CERVANTES GARCÍA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDEE MARTÍNEZ RIVAS GABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



Antibacterial activity of supernatants of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* and curcumin against *Aeromonas hydrophila*. In vitro study

David Ibarra-Martínez¹ · Martín Humberto Muñoz-Ortega² · Andrés Quintanar-Stephano³ · Sandra Luz Martínez-Hernández⁴ · Manuel Enrique Ávila-Blanco¹ · Javier Ventura-Juárez¹ 

Received: 17 June 2021 / Accepted: 30 November 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Secretions of beneficial intestinal bacteria can inhibit the growth and biofilm formation of a wide range of microorganisms. Curcumin has shown broad spectrum antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial potential. It is important to evaluate the influence of these secretions with bioactive peptides, in combination with curcumin, to limit growth and inhibit biofilm formation of pathogenic bacteria of importance in aquaculture. In the present study, the supernatants of *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Pediococcus pentosaceus* NCDO 990, and curcumin (0, 1, 10, 25 and 50 µM) were used to evaluate their efficacy in growth, inhibition biofilm and membrane permeability of *Aeromonas hydrophila* CAIM 347 (*A. hydrophila*). The supernatants of probiotics and curcumin 1, 10 and 25 µM exerted similar effects in reducing the growth of *A. hydrophila* at 12 h of interaction. The supernatants of the probiotics and curcumin 25 and 50 µM exerted similar effects in reducing the biofilm of *A. hydrophila*. There is a significant increase in the membrane permeability of *A. hydrophila* in interaction with 50 µM curcumin at two hours of incubation and with the supernatants separately in the same period. Different modes of action of curcumin and bacteriocins separately were demonstrated as effective substitutes for antibiotics in containing *A. hydrophila* and avoiding the application of antibiotics. The techniques implemented in this study provide evidence that there is no synergy between treatments at the selected concentrations and times.

Keywords Curcumin · Probiotics · *Aeromonas hydrophila* · Aquaculture · Biofilm · Membrane permeability

Introduction

According to Food and Agriculture Organization (FAO) statistics (2012), aquaculture is the fastest growing productive food sector of animal origin, with an average annual increase of 6% in the period from 1990 to 2010 (Reverter et al. 2014).

In the last 30 years, aquaculture has been the fastest growing sector worldwide (Acar et al. 2015). However, mortality due to infectious diseases represents the greatest economic loss in the aquaculture industry (Guimarães et al. 2014). Such is the case of *A. hydrophila*, one of the most predominant pathogens in aquaculture and the cause of significant economic losses in the industry (Tellez-Bañuelos et al. 2010). *A. hydrophila* is a gram-negative bacterium and shows motility (Wang et al. 2019). *Aeromonas* pathogenesis is complex and multifactorial, this includes O antigen, lipopolysaccharide capsule, S layer, constitutive polar flagellum, inducible lateral flagellum and iron-binding system and multiple regulatory mechanisms for biofilm formation (Allan and Stevenson 1981; Dooley and Trust 1988; Zhang et al. 2002; Rasmussen-Ivey et al. 2016). It has a great variety of virulence factors such as: adhesins, hemolysins, lipases, and proteases, including the cytotoxic enterotoxin A (Act), which is a substrate for the type 2 secretion system (T2SS) and enzymes such as ADP-ribosyltransferases and DNases (Chopra and

✉ Javier Ventura-Juárez
jventur@correo.uaa.mx

¹ Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad 940, Colonia Ciudad Universitaria, Edificio 202, 20100 Aguascalientes, Mexico
² Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico
³ Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico
⁴ Departameto de Microbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el apoyo a través de la beca 666132 y la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el financiamiento parcial.

Gracias al Comité Tutorial por su acompañamiento en la dirección y las facilidades brindadas para la culminación exitosa de este proyecto.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. La acuicultura	10
1.2. Situación actual del cultivo de la Tilapia.....	11
1.3. Mercado y comercio	12
1.4. Biología de la especie	13
1.5. Historia de la tilapia en México.....	14
1.6. Inmunidad peces	15
1.7. Inmunoestimulantes	15
1.8. Cúrcuma.....	16
1.9. Probióticos y respuesta inmune contra microorganismos patógenos.....	17
1.10. Clasificación de los probióticos.....	19
1.11. <i>Lactobacillus</i>	20
1.12. <i>Lactococcus</i>	22
1.13. <i>Pediococcus</i>	23
1.14. Principales enfermedades	24
1.14.1. Aeromoniasis.....	25
1.15. Sanidad	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. METODOLOGÍA.....	29
5.1. Diseño metodológico	29
5.2. Población bajo estudio.....	30
5.2.1. Características generales.....	30

5.2.2. Ubicación espacio temporal	30
5.2.3. Los peces.....	31
5.3. Calidad del agua	31
5.4. Cepas	31
5.5. Preparación de sobrenadantes de los probióticos libre de células (CFS) 32	
5.6. Curcumina.....	32
5.7. Pruebas de antagonismo.....	32
5.8. Crecimiento de los probióticos a diferente ph 33	
5.9. Adhesión al mucus intestinal	33
5.9.1 Obtención de mucus intestinal de tilapia	33
5.9.2. Adhesión al mucus (in vitro).....	33
5.10. Aislamiento y purificación parcial de bacteriocinas	34
5.11. SDS-PAGE	34
5.12. Inhibición del crecimiento de <i>A. hydrophila</i> por los sobrenadantes de probióticos y la curcumina.....	35
5.13. Inhibición de la formación de biopelícula de <i>A. hydrophila</i>	35
5.14. Permeabilidad de la membrana	36
5.15. Microscopía electrónica de transmisión	37
5.16. Citotoxicidad de la curcumina en epitelio intestinal de la tilapia.....	38
5.16.1. Obtención de enterocitos de tilapia... 38	
5.16.2. Cultivo primario de enterocitos	38
5.16.3. Ensayos de MTT.	39
5.17. Preparación del alimento con probióticos	40
5.18. Parámetros productivos.....	40
5.18.1. Factor de conversión alimenticia (FCA)	40
5.18.2 Tasa específica de crecimiento (TEC)	41
5.19. Expresión génica	41
5.20. Análisis histológico.....	43
5.20.1. Mucosustancia... ..	43
5.21. Estimulación de leucocitos de tilapia	44

5.21.1 Obtención de leucocitos de riñón cefálico	44
5.21.2. Actividad de la mieloperoxidasa	44
5.21.3. Actividad del estallido respiratorio	44
5.21.4. Marcaje fluorescente de bacterias	44
5.21.5. Ensayo de fagocitosis	45
5.22. Análisis estadístico	46
6. RESULTADOS	47
6.1. Antagonismo	47
6.2. Crecimiento a diferente pH	48
6.3. Adherencia al intestino	50
6.4. SDS-PAGE	51
6.5. Inhibición del crecimiento de <i>A. hydrophila</i> por los sobrenadantes de probióticos y curcumina.	52
6.6. Inhibición de la biopelícula	55
6.7. Permeabilidad de la membrana	59
6.8. Microscopia electrónica de transmisión	63
6.9. Citotoxicidad de la curcumina	65
6.10. Viabilidad en alimento	66
6.11. Parámetros productivos	66
6.12. Expresión génica	69
6.12.1. Intestino	69
6.12.2. Bazo	71
6.12.3. Piel	73
6.13. Análisis histológico	75
6.13.1. Intestino	75
6.13.2. Bazo	78
6.14. Estimulación de leucocitos	79
6.14.1. Estallido respiratorio	79
6.14.2. Mieloperoxidasa (MPO)	79
6.14.3. Fagocitosis	81
7. DISCUSIÓN	82
7.1.	

Antagonismo.....	82
7.2. Crecimiento a diferente ph.....	82
7.3. Adherencia a mucus.....	82
7.4. SDS-PAGE	83
7.5. Inhibición del crecimiento	83
7.6. Inhibición del biofilm	84
7.7. Permeabilidad de membrana.....	85
7.8. Microscopia electrónica de transmisión.....	86
7.9. Citotoxicidad de curcumina	88
7.10. Viabilidad de los probióticos en el alimento.....	89
7.11. Parámetros de crecimiento	89
7.12. Genes relacionados con la inmunidad.....	90
7.12.1. Intestino	90
7.12.2. Bazo.....	95
7.12.3. Piel.....	96
7.13. Parámetros histológicos	97
7.13.1 Intestino	97
7.13.2. Bazo.....	97
7.14. Estimulación de leucocitos	99
7.14.1. Estallido respiratorio y mieloperoxidasa.....	99
7.14.2. Fagocitosis	99
8. CONCLUSIONES	101
9. REFERENCIAS.....	102
10. ANEXOS.....	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1

Secuencias primers

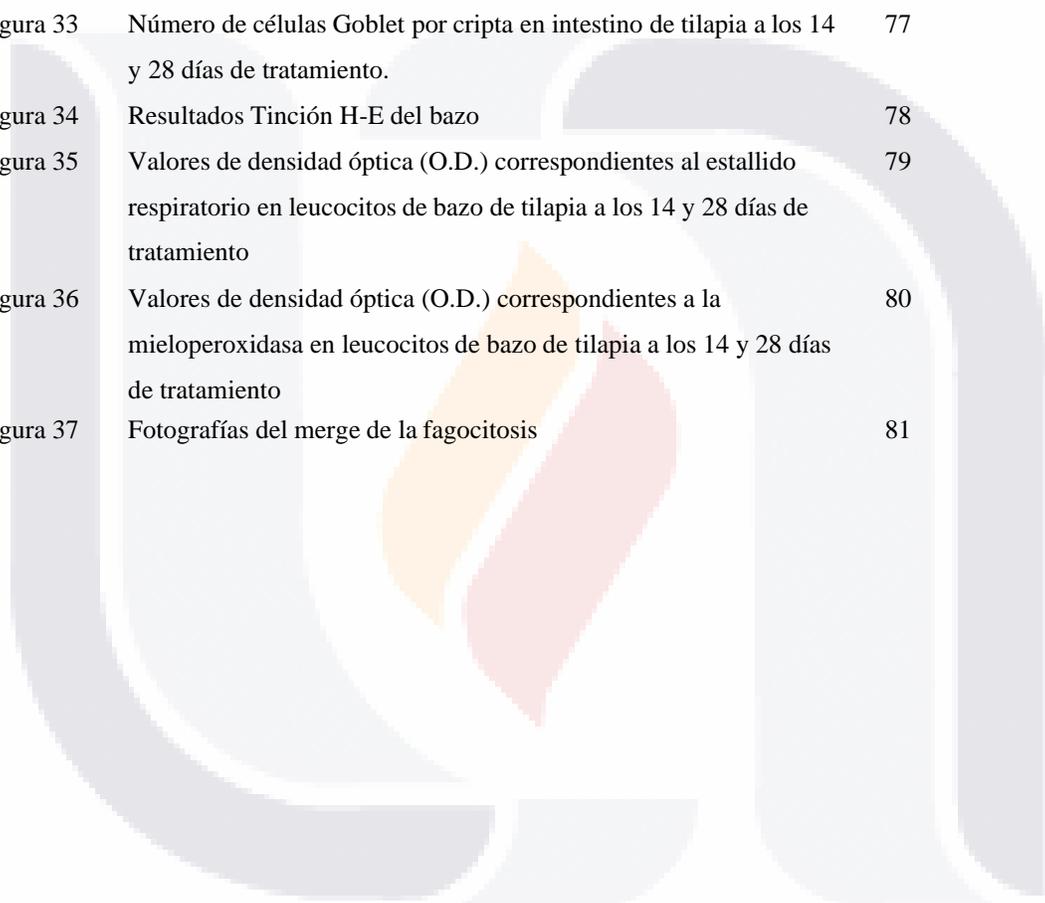
Página 41



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Producción global de <i>Oreochromis niloticus</i>	12
Figura 2	Ciclo de cultivo de tilapia	14
Figura 3	Estructura química de la curcumina	16
Figura 4	Mecanismo de acción de los probióticos	19
Figura 5	Clasificación de los principales grupos de agentes infecciosos en tilapia	24
Figura 6	Sistema Cerrado de Recirculación	31
Figura7	Placas de agar sembradas con las cepas probióticas retadas entre ellas mediante la técnica de agar plug diffusion	47
Figura 8	Cinética del crecimiento de <i>L. lactis</i> en diferentes pH	48
Figura 9	Cinética del crecimiento de <i>P. pentosaceus</i> en diferentes pH	49
Figura 10	Cinética del crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> en diferentes pH	49
Figura11	Adhesión de las cepas probióticas al mucus del intestino de tilapia	50
Figura 12	Resultados SDS-PAGE y placa con inhibición de <i>A. hydrophila</i> por bacteriocinas.	51
Figura 13	Fotografía de la zona de inhibición de <i>A. hydrophila</i> por bacteriocinas bajo microscopía de luz de contraste de fase	52
Figura 14	Cinética de crecimiento de <i>A. hydrophila</i> en medio suplementado con curcumina y sobrenadantes de los probióticos	53
Figura 15	Inhibición del biofilm de <i>A. hydrophila</i> en medio suplementado con curcumina y sobrenadantes de los probióticos	56
Figura 16	Permeabilidad de la membrana de <i>A. hydrophila</i> en medio suplementado con curcumina y sobrenadantes de los probióticos	60
Figura 17	Fotos de TEM del daño en <i>A. hydrophila</i> por curcumina y sobrenadantes probióticos.	63
Figura 18	Porcentaje de células dañadas por curcumina y sobrenadantes probióticos.	64
Figura 19	Resultados de los ensayos MTT	65
Figura 20	Viabilidad de probióticos en alimento	66
Figura 21	Porcentaje de ganancia de peso a los 28 días de tratamiento	67
Figura 22	Tasa específica de crecimiento a los 28 días	67
Figura 23	Factor de conversión alimenticia a los 28 días de tratamiento	68
Figura 24	Expresión génica intestino 14 días	69
Figura 25	Expresión génica intestino 28 días	70

Figura 26	Expresión génica bazo 14 días	71
Figura 27	Expresión génica bazo 28 días	72
Figura 28	Expresión génica piel 14 días	73
Figura 29	Expresión génica piel 28 días	74
Figura 30	Resultados Tinción AB-PAS del grupo control a los 14 y 28 días	75
Figura 31	Resultados Tinción AB-PAS del grupo probióticos a los 14 y 28 días	76
Figura 32	Resultados Tinción AB-PAS del grupo curcumina a los 14 y 28 días	76
Figura 33	Número de células Goblet por cripta en intestino de tilapia a los 14 y 28 días de tratamiento.	77
Figura 34	Resultados Tinción H-E del bazo	78
Figura 35	Valores de densidad óptica (O.D.) correspondientes al estallido respiratorio en leucocitos de bazo de tilapia a los 14 y 28 días de tratamiento	79
Figura 36	Valores de densidad óptica (O.D.) correspondientes a la mieloperoxidasa en leucocitos de bazo de tilapia a los 14 y 28 días de tratamiento	80
Figura 37	Fotografías del merge de la fagocitosis	81



RESUMEN

A nivel mundial, la acuicultura es una actividad preponderante para reducir la pobreza y mitigar la escases de alimento en países en vías de desarrollo. El crecimiento de esta actividad ha propiciado la utilización de cultivos a gran escala, entre ellos el de la tilapia debido a su versatilidad. Sin embargo, las altas densidades de población generan estrés que deriva en brotes epidemiológicos que traen consigo pérdidas económicas sustanciales y el riesgo de resistencia bacteriana por el uso indiscriminado de antibióticos. El presente trabajo incluye el estudio *in vitro* de los efectos de la curcumina y de los probióticos *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO 990 sobre la inhibición del crecimiento, la inhibición de biopelícula y permeabilidad de la membrana de *Aeromonas. hydrophila*. La evaluación de toxicidad de la curcumina en enterocitos de la tilapia. Así como los efectos *in vivo* de la inclusión de los probióticos y curcumina en la dieta de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre la inmunidad, el crecimiento e histología. Nuestros resultados *in vitro* demostraron diferentes modos de acción de la curcumina y las bacteriocinas por separado como eficaces tratamientos en la contención de *A. hydrophila*. Así como evidencia robusta que no existe sinergia entre tratamientos. Por su parte, los ensayos *in vivo*, demuestran el efecto benéfico de la mezcla de *L.lactis*, *L. rhamnosus* y *P. pentosaceus* en los parámetros productivos de la tilapia y la respuesta innata celular. Mientras que curcumina mejoró significativamente la expresión de la mayoría de los genes relacionados con la inmunidad en el intestino, bazo y piel. Sugerimos la aplicación alternada de ambos tratamientos para mejorar el estado de salud de las tilapias.

Palabras clave: acuicultura, tilapia, probióticos, curcumina, *A. hydrophila*, inmunidad.

ABSTRACT

Around the world, aquaculture is a preponderant activity to reduce poverty and alleviate food shortages in developing countries. The growth of this activity has led to the use of large-scale farming, including tilapia due to its versatility. However, high population densities generate stress that led to epidemiological outbreaks that bring with them substantial costs and the risk of bacterial resistance due to the indiscriminate use of antibiotics. The present work includes the *in vitro* study of the effects of curcumin and the probiotics *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Pediococcus pentosaceus* NCDO 990 on growth inhibition, biofilm inhibition and membrane permeability of *Aeromonas. hydrophila*. The toxicity evaluation of curcumin in tilapia enterocytes. As well as the *in vivo* effects of the inclusion of probiotics and curcumin in the diet of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on immunity, growth, and histology. Our *in vitro* results demonstrated different modes of action of curcumin and bacteriocins separately as effective treatments in the containment of *A. hydrophila*. As well as robust evidence that there is no synergy between treatments. On the other hand, *in vivo* tests demonstrate the beneficial effect of the mixture of *L. lactis*, *L. rhamnosus* and *P. pentosaceus* on the productive parameters of tilapia and the innate cellular response. While curcumin significantly improved the expression of most genes related to immunity in the intestine, spleen, and skin. We suggest the alternate application of both treatments to improve the health status of tilapias.

Keywords: aquaculture, tilapia, probiotics, curcumin, *A. hydrophila*, immunity

1 INTRODUCCIÓN

1.1. La acuicultura

La acuicultura se define como el cultivo controlado de especies acuáticas (Allsopp et al., 2009). Según estadísticas de la FAO (2012), la acuicultura es el sector productivo de alimentos de origen animal de más rápido crecimiento, con un incremento medio anual del 6% en el periodo de 1990 a 2010 (Reverter et al., 2014) Desde 1990, la pesquería de peces se ha mantenido estable en alrededor de 90 millones de toneladas, mientras que, la acuicultura se ha revelado como la fuente principal para aumentar el suministro de pescado. En los últimos 30 años, la acuicultura es el sector de mayor crecimiento a nivel mundial (Acar, Kesbiç, Yılmaz, Gültepe, & Türker, 2015). Los peces y los mariscos representan una fuente valiosa de proteínas y micronutrientes esenciales para mantener una nutrición equilibrada y una buena salud. En la actualidad, se cultivan cerca de 200 especies de peces teleósteos y de mariscos al rededor del mundo, y su producción es más del doble que las pasadas dos décadas (Morrison & Nowak, 2002). En 2009, el pescado representó el 17 % de la ingesta de la población mundial de proteína animal y el 6.5 % de toda la proteína animal consumida. La producción acuícola mundial alcanzó 62 millones de toneladas en 2011 (con exclusión de las algas marinas y los productos no alimentarios), con un valor estimado de \$ 130 mil millones de dólares. El principal objetivo de la acuicultura es mantener a los peces saludables para obtener un mejor rendimiento (Acar et al., 2015).

A medida que la industria de la acuicultura se ha intensificado y diversificado, es natural que la domesticación de nuevas especies resulte en el reconocimiento de los "nuevos" agentes infecciosos y las enfermedades. La mortalidad debido a las enfermedades infecciosas representa la mayor pérdida económica en la industria acuícola (Guimarães et al., 2014) Tal es el caso de *Aeromonas hydrophila*, uno de los patógenos más predominantes en la acuicultura y causa de importantes pérdidas económicas en la industria (Tellez-Bañuelos et al., 2010) (Tellez-Bañuelos et al., 2010). El fuerte vínculo entre el estrés y la susceptibilidad a enfermedades en peces de cultivo ha sido reconocido desde tiempo atrás (Cnaani, Tinman, Avidar, Ron, & Hulata, 2004).

La sustentabilidad de la acuicultura depende del balance entre la salud y el crecimiento de los peces. El uso de quimioterapéuticos y de antibióticos para el combate de las enfermedades tiene el riesgo de generar la resistencia de los patógenos, la bioacumulación y la contaminación ambiental. Las vacunas comerciales son costosas y específicas contra un patógeno en particular (Cristea et al., 2012). Los antibióticos se utilizan comúnmente para controlar las enfermedades de los peces, mejorar su sistema inmunológico y como un promotor del crecimiento. Sin embargo, el uso de antibióticos se ha restringido en muchos países debido a la resistencia inducida a las bacterias (Acar et al., 2015).

1.2. Situación actual del cultivo de la Tilapia.

La Tilapia (*Oreochromis spp.*) está considerada como el pez de mayor producción en el mundo para la alimentación humana a través de la acuicultura (Nguyen et al., 2019). El cultivo de esta especie implica normalmente una alta densidad de la población en jaulas flotantes, en canales y en estanques de tierra (Mian et al., 2009). Es conocida como “gallina del agua” debido a su rápido crecimiento y a la alta sobrevivencia en aguas de pobre calidad (Abdullah et al., 2013). Tiene una carne blanca, su alimentación es versátil y es fácil de cultivar. Se considera que la tilapia, es relativamente resistente a enfermedades bacterianas, fúngicas, parasíticas y virales (Abdullah et al., 2013). No obstante, las enfermedades amenazan la producción de la tilapia, debido a las prácticas de cultivo intensivo, a las condiciones ambientales desfavorables como la temperatura, el nivel de oxígeno disuelto, el amoníaco no ionizado y los insecticidas. Las malas prácticas de manejo como la nutrición inadecuada y las elevadas densidades pueden estresar a la tilapia causando inmuno-supresión y un aumento en la susceptibilidad a las infecciones estreptocócicas (Wu et al., 2013).

Algunas de las especies de tilapia, han sido cultivadas en estanques desde el año 1,000 a.C. No obstante, no es sino hasta el presente siglo que se inicia su explotación intensiva a una escala mundial. Los primeros resultados del cultivo de esta especie obtenidos en Malasia, causaron grandes expectativas en relación con su potencial productivo y ello contribuyó a que de 1950 a 1970 la tilapia fuera distribuida al resto del mundo tanto en zonas tropicales

como subtropicales (Arredondo y Lozano, 2003). El cultivo de tilapia en México inicia en 1964 y para 1993 la producción nacional de la tilapia representó la quinta parte de la producción mundial (FAO, 1997).

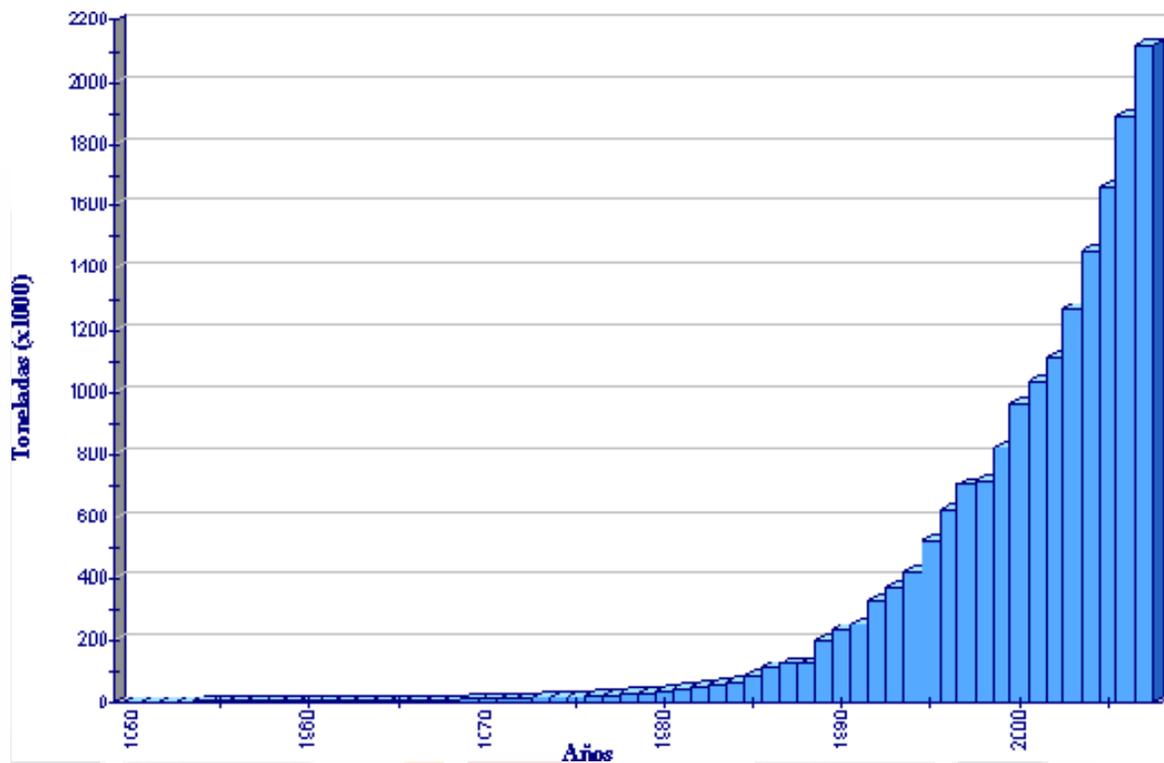


Figura 1. Producción global de acuicultura de *Oreochromis niloticus* (FAO Estadísticas pesqueras, 2022)

1.3. Mercado y comercio

La tilapia del Nilo se introdujo a los países en desarrollo y se cultivó a nivel de subsistencia con el fin de satisfacer los requerimientos locales de ingesta de proteínas. Al mejorar las técnicas de producción y el control de sabor del producto, la tilapia ingresó a los principales mercados de pescado de estos países. En los países altamente industrializados, los mercados pequeños de tilapia viva localmente producida o las importaciones de tilapia congelada se desarrollaron entre las comunidades de inmigrantes por sus precios accesibles, la posibilidad de ofrecerlo durante todo el año, su exquisito sabor y la flexibilidad para su preparación. Con la aparición de filetes de tilapia fresca producida en países tropicales, se

abrieron nuevos mercados en restaurantes de pescados y mariscos de alta categoría, restaurantes informales y supermercados. La mayoría de los países europeos apenas están “descubriendo” la tilapia, por lo que existe un alto potencial para la expansión de su mercado en Europa. China, un gran exportador de tilapia, tiene enorme potencial para desarrollar el abasto a los crecientes mercados de clases medias (FAO, 2022).

Un componente importante de la creciente industria de tilapia es la proliferación de presentaciones del producto. Las exportaciones de tilapia inicialmente fueron de pescado congelado entero procedente de la Provincia China de Taiwán, pero el mercado de los Estados Unidos tiene preferencia por el filete, que lo suministran Jamaica, Colombia y Costa Rica como producto fresco. Actualmente el filete fresco o congelado se puede obtener en diferentes tamaños y paquetes, con piel, sin piel, congelados individualmente, ahumado y en grado sashimi; reciben tratamiento de inmersión en monóxido de carbono o en ozono. Aún se puede obtener tilapia entera o eviscerada, pero en estas formas se vende principalmente en mercados locales. Recientemente han surgido interesantes subproductos tales como artículos de piel para ropa y accesorios, gelatina de la piel para medicamentos de lenta liberación y arreglos florales elaborados con escamas secas y teñidas de colores (FAO, 2022).

1.4. Biología de la especie.

La tilapia pertenece al grupo de los peces Cíclidos de la tribu *Tilapiini*, que son originarios de África Oriental. Son organismos euritérmicos, que resisten una amplia gama de temperatura del agua, con un intervalo de tolerancia desde los 12 a los 42°C. Se les considera especies eurihalinas, ya que pueden vivir en aguas continentales, salobres y marinas, con un intervalo de tolerancia que va desde agua de baja salinidad hasta 40%. Su fecundación es externa y el número de huevos producidos por hembra varía según la especie, la talla y el peso de los reproductores. El fotoperiodo, la temperatura (por arriba de los 24°C) y la presencia del sexo opuesto, son factores que influyen sobre la madurez sexual. Los organismos alcanzan la madurez sexual a una edad temprana, a partir de los dos ó tres meses y a una longitud de 8 a 16 cm. La frecuencia de desove varía considerablemente dependiendo de los factores climáticos, pudiendo ser desde seis a 16

veces al año. La tilapia se caracteriza por hacer nidos y cuidado a sus crías (Arredondo y Lozano, 2003).

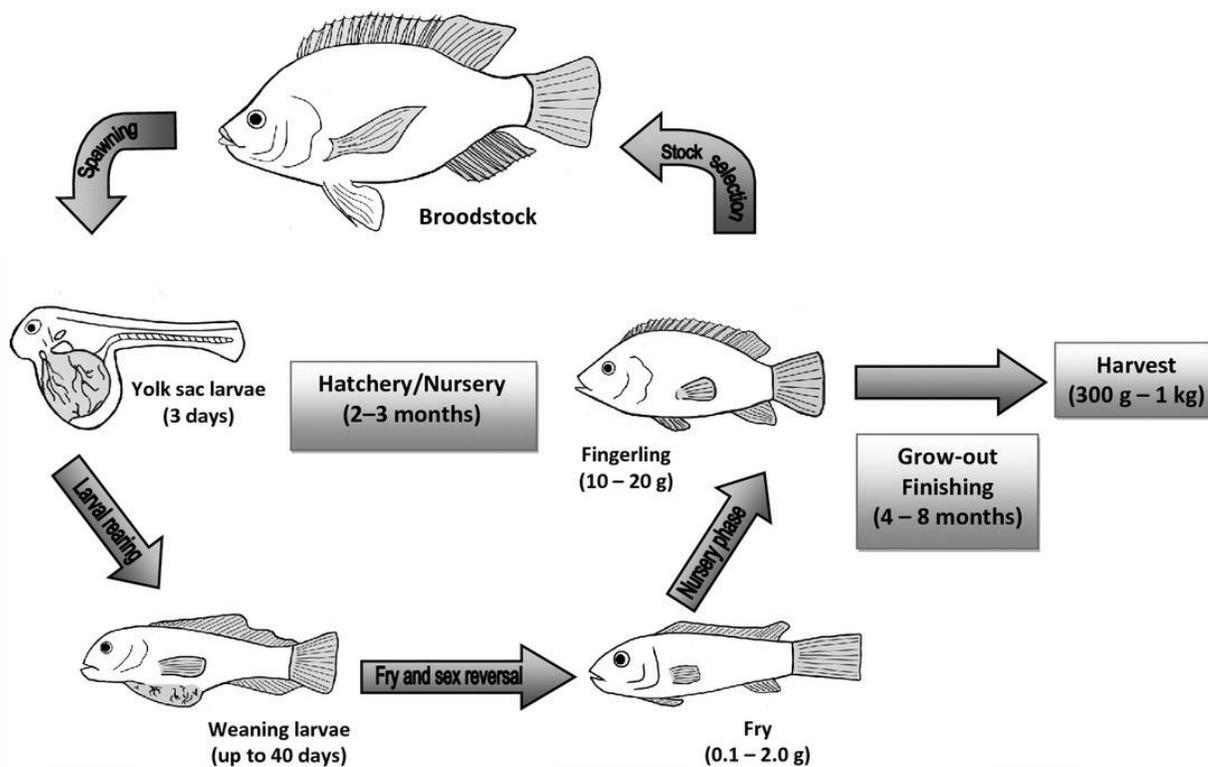


Figura 2. Ciclo de cultivo de tilapia. Desde reproductores hasta tamaño de mercado (las etapas de los peces no están dibujadas a escala). El contenido nutricional de la dieta y el manejo de la alimentación influirán en gran medida en la duración de cada etapa (Ng & Romano, 2013).

1.5. Historia de la tilapia en México

El cultivo de tilapia en México inicia en 1964, con la importación de los primeros ejemplares procedentes de la Universidad de Auburn, Alabama, EUA, los cuales fueron depositados en la estación piscícola de Temascal, Oaxaca, los cuales fueron distribuidas ampliamente en una gran cantidad de cuerpos de agua en las zonas tropical y templada del país, constituyendo así las primeras acciones de fomento para su cultivo (Arredondo & Lozano, 2003). En 1978, se introdujo la tilapia del Nilo (*O. niloticus*) procedente de Panamá. En 1987, tanto el gobierno a través de la entonces Secretaría de Pesca, Gobiernos de los Estados así como algunos productores introducen las variedades como la tilapia

híbrido rojo, procedente de Puerto Rico, la tilapia blanca conocida como Rocky Mountain, traída de los EUA, entre otras (Arredondo & Lozano, 2003). En 1993 la producción nacional de la tilapia representó la quinta parte de la producción mundial (según FAO, 1997).

1.6. Inmunidad peces

Filogenéticamente, los peces son el grupo más primitivos de los vertebrados que poseen un sistema inmune adaptativo y generan una respuesta de anticuerpos efectiva ante los desafíos patogénicos (Morrison & Nowak, 2002). El sistema inmune de los peces es similar al de los vertebrados superiores, ambos tienen dos componentes. El primer componente es el innato, o defensa no específica formada por una serie de compuestos celulares, y el segundo es el adquirido o específico, caracterizado por la respuesta humoral a través de la producción de anticuerpos mediada por linfocitos T. La primera línea de defensa contra la invasión de patógenos está mediada por el sistema innato, formado por macrófagos, monocitos, granulocitos y elementos humorales como el complemento y la lisozima (Cristea et al., 2012). La detección de los niveles de anticuerpos específicos ha sido utilizada como una herramienta para la detección de la salud de los peces (Morrison & Nowak, 2002). En los peces, la IgM es la clase de anticuerpo más importante (Girón-Pérez et al., 2009).

1.7. Inmunoestimulantes.

En la acuicultura, uno de los más promisorios métodos para el fortalecimiento de los mecanismos de defensa en el manejo de las enfermedades, es la administración profiláctica de inmunoestimulantes. Avances recientes sobre la inmuno-nutrición revelan que algunos nutrientes están ligados al estado inmunológico de los peces. Esto despertó el interés de los nutricionistas en el valor de la inmuno-protección de los peces además del efecto sobre el crecimiento (Cristea et al., 2012) Hoy en día, los probióticos son bastante comunes en los "alimentos funcionales" que promueven la salud de los seres humanos, así como también los suplementos terapéuticos, profilácticos y de crecimiento en la producción animal

(Pandiyani et al., 2013).

1.8. Cúrcuma

Curcuma es uno de los géneros más grandes de la familia de las *Zingiberaceae*, existen aproximadamente 100 especies de cúrcuma. Se encuentra en toda Asia tropical desde la India hasta el sur de China, el sudeste de Asia, Papua Nueva Guinea y el norte de Australia. La palabra “cúrcuma” se deriva de la palabra árabe “kurkum”, que significa color amarillo. Las especies de cúrcuma se originan en la región indo-malaya y están muy extendidas en Asia, África y Australia (Yuandani et al., 2021). La cúrcuma también se usa comúnmente como aditivo para alimentos en la producción animal. Su actividad de alivio de la inflamación intestinal y su potente actividad antiviral, antibacteriana y antifúngica se utilizan con éxito en la producción a gran escala, ya que mejoran el estado de salud de los animales y estimulan una mayor eficiencia productiva (Al-yasiry et al., 2017). Las plantas del género *Curcuma* han sido intensamente estudiadas por su contenido fitoquímico y bioactividad debido a sus enormes potenciales etnofarmacológicos y terapéuticos. La fórmula molecular de la curcumina es $C_{21}H_{20}O_6$, que luego se identificó como diferuloilmetano. El nombre IUPAC de la curcumina es (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxi-fenil) hepta-1, 6-dieno-3, 5-diona) y su estructura química se describe en la Figura 3 (Jagetia & Aggarwal, 2007).

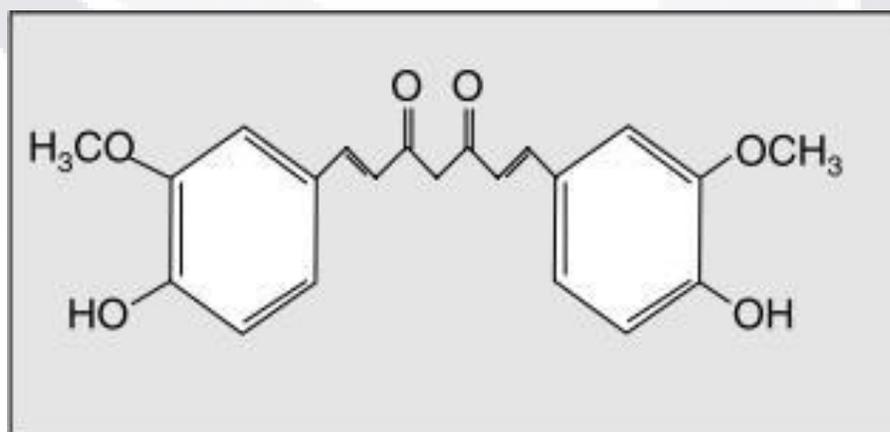


Figura 3. Estructura química de la curcumina (diferuloilmetano) (Nelson et al., 2017) .

Los principales constituyentes de la cúrcuma son los diarilheptanoides, que se encuentran en una mezcla denominada curcuminoides que generalmente constituyen aproximadamente del 1 al 6 % de la cúrcuma en peso seco. La mayoría de los extractos crudos preparados a partir de la cúrcuma, e incluso algunos materiales refinados de "curcumina", contienen tres compuestos principales: curcumina: 1,6-heptadieno-3,5-diona, típicamente 60-70% de un extracto crudo, demetoxicurcumina (20-27%) y bisdemetoxicurcumina (10-15%), junto con numerosos y menos abundantes metabolitos secundarios (Nelson et al., 2017).

1.9. Probióticos y respuesta inmune contra microorganismos patógenos.

Muchos estudios han demostrado que los probióticos mejoran la salud y el crecimiento de los peces, vinculados con mejoras ambientales, contribuyendo al desarrollo sostenible de la acuicultura. Numerosas investigaciones señalan que el uso de los probióticos tiene beneficios en la prevención y control de las infecciones bacterianas de humanos y ganado (Kiron, 2012). En años recientes se ha puesto atención al rol de los probióticos en el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la inmunidad de los organismos acuáticos y el desarrollo sustentable de la acuicultura (Welker & Lim, 2015). Muchas cepas bacterianas, dosis y tipo de administración han sido evaluadas. Sin embargo, se requieren más estudios para entender claramente la influencia benéfica de los probióticos demostrar la modulación de la respuesta inmune innata en el intestino de la tilapia (*Oreochromis spp.*) inducida por los probióticos.

La utilización de bacterias intestinales benéficas, como las bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés) que colonizan el tracto gastrointestinal han demostrado efectos positivos de la inclusión de estos microorganismos como probióticos en la dieta de peces en el contexto de un mejor rendimiento del crecimiento y salud (Doan, Hossein, Khanongnuch, & Kanpiengjai, 2018). El sistema inmune de los peces y de los vertebrados superiores son similares y ambos tienen dos componentes integrales: 1) el sistema de defensa innato, natural o inespecífico formado por una serie de componentes celulares y

humorales, y 2) el sistema inmunitario adaptativo, adquirido o específico caracterizado por la producción de anticuerpos y por la respuesta inmune celular que está mediada por linfocitos T, capaces de reaccionar específicamente con antígenos. La microbiota normal en el ecosistema gastrointestinal influye en el sistema inmune innato, que es de vital importancia para la resistencia a las enfermedades de los peces y se divide en barreras físicas, componentes humorales y celulares. Los parámetros humorales innatos incluyen péptidos antimicrobianos, lisozima, componentes del complemento, transferencia, pentraxinas, lectinas, antiproteasas y anticuerpos naturales, mientras que las células citotóxicas inespecíficas y los fagocitos constituyen efectores inmunes celulares innatos. Las citocinas son un componente integral de la respuesta inmune adaptativa e innata, particularmente IL-1 β , interferón, factor de necrosis tumoral- α , factor de crecimiento transformante- β y varias citocinas regulan la inmunidad innata. El sistema inmune inespecífico puede ser estimulado por los probióticos. Se ha demostrado que la administración oral de la bacteria *Clostridium butyricum* a la trucha arco iris aumentó la resistencia de los peces a la vibriosis, al aumentar la actividad fagocítica de los leucocitos. Fernandes y Kerkar (2019) mencionaron que el uso de *Bacillus sp.* S11 proporcionó protección contra la enfermedad al activar las defensas inmunes tanto celulares como humorales en el camarón tigre (*Penaeus monodon*). Pérez-Sánchez et al. (2011) mencionan que la administración de una mezcla de cepas bacterianas (*Bacillus* y *Vibrio sp.*) influyó positivamente en el crecimiento y la supervivencia de juveniles de camarones blancos y presentó un efecto protector contra el sistema inmune, al aumentar la fagocitosis y la actividad antibacteriana (Pandiyan et al., 2013).

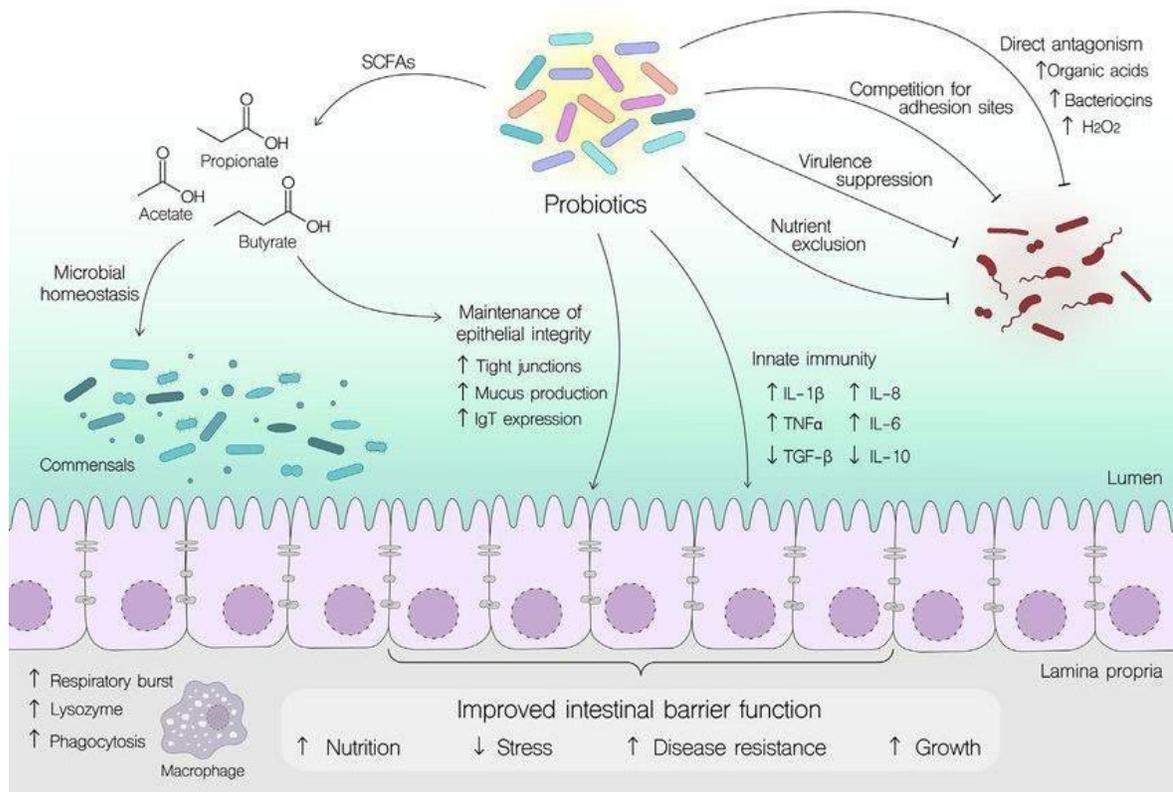


Figura 4. Mecanismo de acción concertado de los probióticos en peces. Los microorganismos probióticos promueven la aptitud del huésped principalmente a través de la modulación directa de la inmunidad innata y a través del mantenimiento de la integridad epitelial. Los mecanismos indirectos incluyen la producción de metabolitos, como ácidos grasos de cadena corta (SCFA), que promueven la homeostasis en la comunidad comensal intestinal y la inhibición del crecimiento de patógenos y la expresión de factores de virulencia. El efecto armonizado es la mejora en la función de barrera intestinal, que a su vez tiene beneficios fisiológicos sustanciales para el huésped. (Langlois et al., 2021).

1.10. Clasificación de los probióticos

Los probióticos comúnmente utilizados en la acuicultura pertenecen al género *Bacillus spp.* y bacterias productoras de ácido láctico (LAB), que incluyen: *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici* (Doan et al., 2018). Los LAB se clasifican en filo *Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Latobacillales*. Son grampositivos, no endosporizantes, con morfología en forma de bastón o coccidios, son catalasa y oxidasa negativos y la mayoría de ellos no son móviles. El crecimiento óptimo de LAB

generalmente es de pH 5.5–5.8, y tienen requerimientos nutricionales complejos. Se dividen en homofermentativo y heterofermentativo; los homofermentativos producen ácido láctico a partir de azúcares, mientras que los heterofermentativos producen ácido láctico, ácido acético o alcohol y dióxido de carbono. Un rasgo favorable de LAB es que producen sustancias inhibitoras del crecimiento tales como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacilos, etc.; prevenir la proliferación de bacterias patógenas y de descomposición en los alimentos, así como la adherencia y colonización de patógenos en el tracto digestivo (Ringø et al., 2018).

1.11. Lactobacillus

Los lactobacillus son anaerobios facultativos tolerantes a los ácidos, y son homo o heterofermentativos. Kraus (1961) llevó a cabo el primer estudio que el arenque (*Clupea harengus L.*), contenía lactobacilos en el tracto gastrointestinal. Desde que se realizó este estudio, varias revisiones revelaron especies de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal de varias especies de peces muestra que *Lactobacillus* spp., *Lb. aviarius*, *Lb. aviarios subsp. arafinosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. crispatus / Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, *Lb. colinoides*, *Lb. coryniformis*, *Lb. farciminis*, *Lb. gallinarum*, *lb. johnsonii*, *Lb. reuteri* y *Lb. sakei* se han reportado en el tracto gastrointestinal de varias especies de peces durante los últimos 3 años. Lyons y col (2016) investigaron la caracterización del microbioma GI de la trucha arcoiris tanto de la granja como del acuario y notaron diferencias en la comunidad microbiana dentro del intestino de ambas poblaciones, donde el Phylum Firmicutes fue ligeramente más prominente en los peces criados en acuario, y dentro de las principales unidades taxonómicas se identificaron como *Lactobacillus*, *Acetanaerobacterium*, *Catelicoccus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella* y *Bacillus*. En el estudio de Lyons et al. (2017a), los autores revelaron que *Lactobacillus* estaba presente en muy baja abundancia (0.1%), pero la microbiota alóctona mostró una mayor proporción (1.15%) de *Lactobacillus* en tracto GI de la trucha arcoiris. En un estudio reciente, H. Liu et al. (2016) evaluaron el efecto de las cepas de *Lactobacillus* adhesivas intestinales y el efecto combinado de los fructo-oligosacáridos de cadena corta (scFOS) en el rendimiento del crecimiento, las bacterias adhesivas intestinales y la resistencia a enfermedades de los juveniles de tilapia y concluyó que scFOS aumentó la abundancia

relativa de las cepas de *Lactobacillus*. El efecto del óxido crómico (Cr_2O_3), uno de los indicadores más utilizados para la determinación de la digestibilidad de nutrientes en los peces se investiga poco en los peces. En tres estudios que utilizaron *Salvelinus alpinus* L. (Ringø, 1993, 1994) reveló que la inclusión de 1% (Cr_2O_3) aumentó el nivel de población de *Lactobacillus* y *Streptococcus* cultivables. En contraste, Serra et al. (2018) utilizaron el método DGGE para evaluar la microbiota intestinal del juvenil de dorada (*Sparus aurata*) no mostró ningún efecto del nivel de inclusión de 0,5% de Cr_2O_3 en el número de unidades taxonómicas operativas, la riqueza de microbiota, la diversidad y los índices de similitud.

1.11.1. *Lactobacillus rhamnosus*

En un estudio con anguila europea (*Anguilla anguilla*), Vílchez et al. (2015) administraron tres dosis (10^3 , 10^5 y 10^6 UFC/g) de *Lb. rhamnosus* en la dieta y monitoreó los posibles efectos sobre el proceso de espermatogénesis. Después de 63 días de administración oral, la regulación positiva de genes relacionados con la reproducción, como activina, receptores de andrógenos α y β (ara y $\text{ar}\beta$), receptor de progesterona 1 (pr1), proteína morfogenética ósea 15 (bmp15) y receptor de FSH (fshr) fue notado. Estos cambios a niveles moleculares correspondieron con los cambios observados en la calidad y cantidad de espermatozoides. Los autores concluyeron que *Lb. rhamnosus* confiere el proceso de espermatogénesis en anguila europea (Li et al., 2016). Dawood et al. (2017) también realizó una investigación sobre los efectos de *Lb. rhamnosus* (ya sea solo o combinado con *Lb. lactis*) sobre el rendimiento del crecimiento y los parámetros inmunes de la dorada, y mostró un aumento de los parámetros inmunes y la defensa antioxidante en los peces alimentados con dieta suplementada. Se reveló un mayor efecto cuando las dos cepas se usaron simultáneamente. Se observaron efectos similares en el rendimiento del crecimiento y la utilización del alimento. Además, la administración de probióticos disminuyó los niveles de colesterol total y triglicéridos. El mismo grupo de investigación evaluó en otro estudio los efectos de dosis variables (1×10^2 , 1×10^4 y 1×10^6 células g^{-1}) de *Lb. rhamnosus* en la dorada roja (Dawood et al., 2017), mostró un aumento significativo de los parámetros plasmáticos y mucosos (proteína total, actividad mieloperoxidasa mucosa y secreción mucosa), y concluyó que los resultados son una señal de efectos beneficiosos sobre las respuestas fisiológicas del huésped. En un estudio con trucha arcoiris, Popovic et al. (2017) investigaron el efecto de la dieta *Lb.*

rhamnosus (10^7 y 10^8 UFC g^{-1}) sobre microbiota intestinal e histología, parámetros bioquímicos y defensa antioxidante en un ensayo de alimentación de 6 semanas. Si bien la alimentación con probióticos no tuvo efectos significativos sobre la defensa antioxidante, los parámetros bioquímicos se vieron afectados. Además, las investigaciones histológicas revelaron una mejora de la longitud de las microvellosidades en el intestino proximal (IP), así como un mayor número de células caliciformes en IP y el intestino distal de peces alimentados con probióticos. Los autores concluyeron que *Lb. rhamnosus* era un aditivo alimenticio prometedor, capaz de mejorar la salud de la trucha arcoiris (Popovic et al., 2017).

1.12. **Lactococcus**

El género *Lactococcus* está incluido dentro de la familia *Streptococcaceae*, y se describió por primera vez en 1985 después de la división del género *Streptococcus*, que incluía un grupo de microorganismos conocidos como estreptococos lácticos representados por agentes aislados de material vegetal, ganado lechero y productos lácteos. (Schleifer et al., 1985). *Lactococcus* produce L-lactato a partir de glucosa en comparación con *Leuconostoc* que produce D-lactato a partir de glucosa. Cai et al. (1999) revelaron uno de los primeros estudios que aislaron el género *Lactococcus* de la carpa común (*Cyprinus carpio*), pero más tarde el género ha sido aislado del tracto gastrointestinal de varias especies de peces (Merrifield et al., 2010), y durante los últimos años, numerosos estudios han revelado *Lactococcus spp.*, *L. lactis garvieae*, *L. lactis subsp. cremoris*, *L. piscium* y *L. raffinolactis* en el tracto gastrointestinal de peces. En su estudio con rodaballo (*Scophthalmus maximus*); microbiota autóctona en todo el intestino, Y. Dong et al. (2018) revelaron que la estaquirosa en la dieta aumentó significativamente la abundancia de *Lactococcus* y *Carnobacterium*, *Pediococcus* y *Enterococcus*.). Gan et al. (2015) utilizaron técnicas dependientes de cultivo e independientes de cultivo para investigar las comunidades bacterianas autóctonas en todo el intestino de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) y revelaron siete cepas cultivables que muestran alta similitud (99%) con *L. raffinolactis* y una UTO similar a *L. raffinolactis*. Lyons y col. (2017) revelaron que tanto el *Lactococcus* autóctono como el alóctono estaban presentes en muy baja abundancia (0.2 y 0.23%, respectivamente) en el GI de la trucha arcoiris de cultivo.

1.13. *Pediococcus*

Los pediococos generalmente se encuentran en pares o tétradas, y se divide a lo largo de dos planos de simetría, y son puramente homofermentativos. Hasta donde sabemos, los primeros estudios para aislar *Pediococcus* del intestino de los peces fueron realizados a finales de los años 90 por Cai et al. (1999) y Halami et al. (1999) Durante los últimos 3 años, solo un estudio ha revelado *Pediococcus* en el intestino de rodaballo, evaluando el efecto de la estaquiosa en la dieta; Se reveló una mayor abundancia significativa de *Pediococcus* en la dieta alimentada con peces con 5% de estaquiosa añadida (Yang et al., 2018).

1.13.1. *Pediococcus pentosaceus*

Recientemente, *Pediococcus pentosaceus* ha recibido atención como probiótico, pero aún se dispone de información limitada sobre el uso de esta cepa. En un estudio de 56 días, se evaluaron los efectos de diferentes dosis (1.6×10^{10} , 1.6×10^{11} , 1.6×10^{12} y 3.2×10^{12} células g^{-1}) de *P. pentosaceus* inactivado en besugo (Dawood et al., 2016). La administración dietética de probióticos inactivados aumentó notablemente el rendimiento del crecimiento, así como la secreción de moco. Además, la mucosidad de la piel y los parámetros inmunes del suero mostraron un incremento después del tratamiento con probióticos. Además, los peces alimentados con dietas suplementadas con probióticos tenían una resistencia al estrés de baja salinidad notablemente más alta. Con base en estos resultados, los autores sugirieron que *P. pentosaceus* inactivado es un probiótico eficiente y seguro. Del mismo modo, Moslehi et al. (2016) informaron la modulación de la microbiota intestinal y la composición corporal en el esturión siberiano después de la administración dietética de una cepa de *P. pentosaceus* aislada del intestino del esturión persa. Además, Huang J.-B. et al. (2014) abordaron el efecto de *P. pentosaceus* como probiótico en mero naranja moteado (*Epinephelus coioides*). La bacteria probiótica fue aislada originalmente por los autores del intestino cobia (*Rachycentron canadum*). La cepa mostró efectos antagónicos contra patógenos en condiciones in vitro y en un experimento in vivo, la administración dietética de *P. pentosaceus* aumentó significativamente el rendimiento del

crecimiento, la expresión de genes relacionados con el sistema inmune y la resistencia a enfermedades.

1.14. Principales enfermedades

La tilapia puede verse afectada por una variedad de enfermedades que pueden tener efectos adversos en la salud de los peces y en la economía de los acuicultores (Rasmussen-Ivey et al., 2016) Los patógenos bacterianos son los más comunes e incluyen: *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae*, enfermedad columnaris (causada por *Flavobacterium columnaris*) y Franciselosis. Un nuevo virus similar al ortomixovirus, el virus del lago de la tilapia (TiLV), ha surgido recientemente en América del Sur e Israel. También se informaron otros virus, incluidos los megalocitovirus y los betanodavirus. En menor proporción, la tilapia también se ve afectada por mixozoos y otros parásitos (FAO, 2018) (Figura 5).

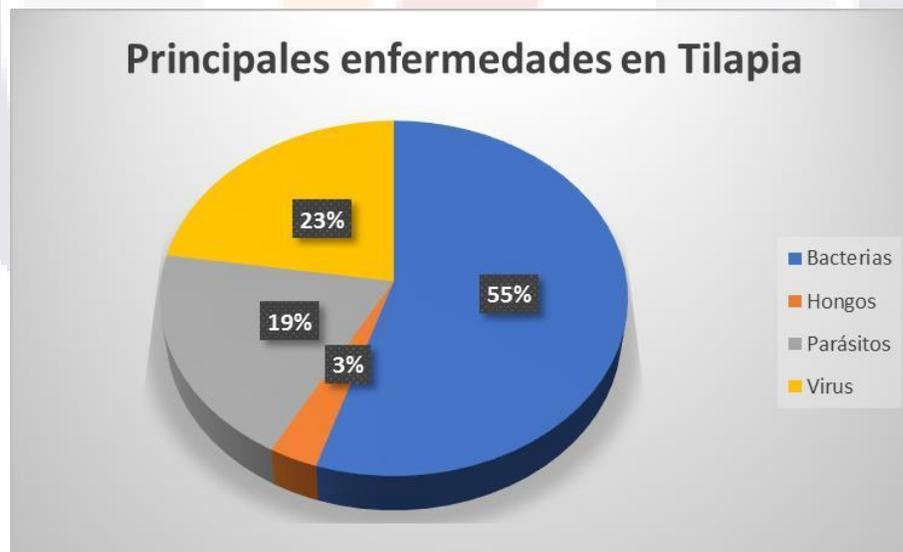


Figura 5. Clasificación de los principales grupos de agentes infecciosos en tilapia (modificado de FAO, 2018).

1.14.1. Aeromoniasis

Aeromonas hydrophila es una bacteria gram-negativa, presenta motilidad y es uno de los patógenos más predominantes en la acuicultura, conocida por provocar úlceras y comúnmente se le asocia por la pudrición de las aletas, septicemia hemorrágica y el síndrome ulcerativo epizootico. Es causa de importantes pérdidas económicas en la industria. *A. hydrophila* puede actuar como un patógeno primario específico en peces de agua dulce y marina y también es común encontrarle en alimentos. Esta bacteria también se comporta como oportunista atacando huéspedes inmunosuprimidos o estresados (Tellez-Bañuelos et al., 2010).

1.15. Sanidad

Al igual que todos los sistemas intensivos de producción de animales, el cultivo de la tilapia puede aumentar potencialmente el riesgo de brotes de enfermedades debido a la alta densidad de población. La acuicultura puede introducir enfermedades exóticas o puede aumentar los niveles de enfermedades que ocurren naturalmente dentro de un área determinada. Las enfermedades pueden reducir las ganancias de los acuicultores y afectar potencialmente a las especies autóctonas. Por lo tanto, es esencial adoptar las buenas prácticas de producción para minimizar y mitigar estos riesgos (Amal & Zamri-Saad, 2011).

La primera línea de defensa es el manejo eficaz de la bioseguridad y los planes de salud para minimizar la enfermedad y su propagación. Los elementos clave de la bioseguridad incluyen; controles legislativos, métodos adecuados de diagnóstico y detección de enfermedades infecciosas, métodos de desinfección y erradicación de patógenos y mejores prácticas de producción (Agnew & Barnes, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la acuicultura es una actividad preponderante para reducir la pobreza y mitigar la escases de alimento en países en vías de desarrollo. El crecimiento de esta actividad ha propiciado la utilización de cultivos a gran escala, entre ellos el de la tilapia debido a su versatilidad. Sin embargo, las altas densidades de población generan estrés que deriva en brotes epidemiológicos que traen consigo pérdidas económicas sustanciales y el riesgo de resistencia bacteriana por el uso indiscriminado de antibióticos. Por estos motivos, es de interés encontrar soluciones económicas y amigables con el ambiente para mejorar el rendimiento de los cultivos e incrementar la protección de las tilapias frente a los patógenos. De forma separada se han evaluado los efectos de diversas cepas probióticas y diversos fitobióticos como la curcumina para mejorar el estado de salud de los peces. En este contexto, se pretende aportar información sobre la combinación de las cepas *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO y curcumina como un tratamiento profiláctico efectivo para mejorar el estado de salud general de las tilapias.

3. HIPÓTESIS

¿Sí las mezclas multi-cepas de bacterias probióticas han demostrada efectos benéficos en la inmunidad y crecimiento de la tilapia, y la utilización de curcumina muestra modulación de la inmunidad y aumento en la ganacia de peso; la combinación de *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO con curcumina tendrán efecto modulador de la inmunidad y crecimiento de *Oreochromis niloticus*?



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Demostrar el efecto inmunomodulador y en el crecimiento de tilapia con la utilización de curcumina en combinación con los probióticos *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar *in vitro* la capacidad probiótica de *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO.
- Evaluar la citotoxicidad de curcumina en epitelio intestinal de tilapia.
- Evaluar dietas suplementadas con probióticos enriquecidos curcumina en tilapia y su efecto en piel, intestino y bazo
- Evaluar el efecto inmunoestimulante en leucocitos de peces estimulados con probióticos y curcumina

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño metodológico

El presente trabajo incluye el estudio *in vitro* de los posibles efectos sinérgicos de diferentes dosis de curcumina (1,10,25 y 50 μM) y los sobrenadantes de los probióticos *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO 990 sobre la inhibición del crecimiento, la inhibición de biopelícula y permeabilidad de la membrana de *A. hydrophila*. Así como la evaluación del efecto *in vitro* de toxicidad de la curcumina (1,10,25,50,100 y 200 μM) en enterocitos de la tilapia por medio de los ensayos de MTT. También se abordó el efecto *in vivo* de la inclusión de los probióticos (1×10^9 cél/g de alimento) y curcumina (40 mg/kg) en la dieta de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre la inmunidad, el crecimiento e histología. Para evaluar la respuesta inmune en 60 peces (10 peces por tratamiento) durante 28 días de experimento con tamaño de muestra $n=6$ por cada tratamiento con 2 periodos de evaluación: 14 y 28 días. Desde el inicio de los experimentos se registraron la talla y el peso de cada pez para calcular la ganancia de peso (GP), Factor de Conversión Alimenticia (FCA) y Tasa Específica de Crecimiento (TEC). En condiciones asépticas se colectó el intestino, el bazo y piel de cada organismo para efectuar los análisis de inmunidad, moleculares e histológicos. Se aislaron los leucocitos del bazo y se realizaron los ensayos de la actividad de la peroxidasa, estallido respiratorio y capacidad fagocítica contra *Aeromonas hydrophila*. En los tejidos colectados se evaluó la expresión relativa mediante q-PCR de los marcadores: IFN γ , IgM, IgT, IL-1 β , IL-10, TLR4, Mucina2, β -defensina y lisozima-C. También se evaluaron los cambios morfológicos y morfométricos a través de las tinciones H-E y AB-PAS.

5.2. Población bajo estudio

5.2.1. Características generales

Se utilizaron juveniles de tilapia (*Oreochromis spp*) cultivados en condiciones controladas y en aparente estado de salud óptimo.

5.2.2. Ubicación espacio temporal

La ubicación del sitio de interés se encuentra delimitada en el Estado de Aguascalientes, Municipio de Jesús María, en los invernaderos de producción acuícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

5.2.3. Los peces.

Se utilizaron un total de 300 tilapias (*O. niloticus*) con peso promedio 80g, colectados en el predio Acuícola Hernández, en el municipio de Aguascalientes, Estado de Aguascalientes. Los peces fueron divididos en grupos de 10 individuos, y colocados en 4 recipientes de plástico reforzado de 650 L, acoplados a un sistema cerrado de recirculación (SCR) bajo condiciones de invernadero (Figura 6). Previo al inicio del experimento, los peces fueron aclimatados durante 15 días.



Figura 6. Sistema cerrado de recirculación.

5.3. Calidad del agua.

La calidad de agua del SRC fue evaluada con el fotómetro modelo 83099 marca HANNA. La temperatura y oxígeno disuelto se monitorearon diariamente, el pH, el amoníaco, los nitritos y los nitratos se evaluaron una vez por semana. La dureza total y la alcalinidad total se registraron cada 14 días.

5.4. Cepas

Se utilizaron los probióticos: *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Pediococcus pentosaceus* NCDO 990 y la cepa patógena de *Aeromonas hydrophila* CAIM347 adquirida en el cepario del Centro de Investigación y Desarrollo (CIAD). Estas cepas se conservaron en medio M17 y glicerol a -80°C . El vial se re-suspendió en medio M17 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) con 0.05% de lactosa. Se incubó toda la noche a 30°C sin agitación. Del inóculo inicial, se tomó 1 ml y se sembró en 50 ml de M17 fresco y se incubó a 30°C con agitación (120 rpm).

5.5. Preparación de sobrenadantes de los probióticos libre de células (CFS)

Para el cálculo de la concentración bacteriana, se utilizó la siguiente relación: $1 \text{ D.O. }_{(600 \text{ nm})} = 8 \times 10^8 \text{ cel/ml}$. Una vez que las cepas de probióticos llegaron a $1 \times 10^9 \text{ cel/ml}$ se centrifugó el medio a $5000 \times g$ (15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, se filtró con membrana de nitrocelulosa de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore, Ireland). Los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su utilización.

5.6. Curcumina

Se preparó una solución stock 50 mM de curcumina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) (en etanol absoluto grado molecular (J. T. Baker, USA), de esta solución se ajustaron los volúmenes para tener concentraciones finales de: 1, 10, 25 y $50 \mu\text{M}$ en caldo M17 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

5.7. Pruebas de antagonismo

Para las pruebas de antagonismo entre las cepas de probióticos, se utilizó el método de “agar plug diffusion”. Este procedimiento es similar al utilizado en el método de difusión en disco. Se trata de hacer un cultivo de agar de la cepa de interés en su medio de cultivo adecuado mediante estrías compactas en la superficie de la placa. Durante su crecimiento, las células microbianas secretan moléculas que se difunden en el medio de agar. Después de la incubación, se corta asepticamente una parcela o cilindro de agar con un sacacorchos estéril y se deposita sobre la superficie de agar de otra placa previamente inoculada con el microorganismo de prueba. Las sustancias se difunden desde el tapón al medio de agar. Luego, la actividad antimicrobiana de las moléculas microbianas secretadas se detecta por la aparición de la zona de inhibición alrededor del tapón de agar.

5.8. Crecimiento de los probióticos a diferente pH

Se preparo 1 litro de medio M17 y se dividió en cuatro matraces de 250 ml, cada uno de los matraces se llevó hasta pH 2, 4,6 y 8 con HCl 1N. Una vez ajustado el pH se esterilizó el medio. Para evaluar el crecimiento de las cepas a los distintos pH se tomaron 50 ml de cada matraz y de forma separada se inocularon con 1 ml de medio con cada una de las cepas en fase exponencial y se registró la densidad óptica (600 nm) al tiempo 0, 24 y 48 horas. Cada experimento se realizó por duplicado.

5.9. Adhesión al mucus intestinal

Se utilizó el método del cristal violeta para determinar la capacidad de adhesión de las tres cepas seleccionadas siguiendo el método de Balakrishna (2013) con ligeras modificaciones.

5.9.1 Obtención de mucus intestinal de tilapia

Previo al ensayo, fue necesario suspender alimentación 48 horas. En condiciones asépticas, se removió el intestino de las tilapias y se colocó en una caja de Petri estéril. El moco fue colectado raspando la superficie interna del intestino con una espátula de plástico. El moco fue homogenizado en partes iguales de PBS estéril. Para remover las células y otras partículas, la mezcla se centrifugó a 10,000 xg por 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo Falcon estéril. En campana de flujo laminar, se forro una placa fondo plano para cultivo celular de 96 pozos con 150 µl por pozo del moco homogenizado y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se retiró el contenido de todos los pozos y se dejó secar aproximadamente por 3 horas dentro de la campana con el flujo encendido. Después se esterilizó dentro de la campana sin flujo mediante radiación UV por 30 min. La placa se cerró y se refrigeró hasta su utilización.

5.9.2. Adhesión al mucus (*in vitro*)

Se añadieron 100 µl a cada pocillo de los cultivos de las cepas a evaluar en la placa previamente recubierta moco intestinal de tilapia. Se utilizó un volumen mayor de moco en comparación con el volumen de bacterias añadidas para evitar el contacto directo de las bacterias con el poliestireno. Las células se dejaron adherir a 28 °C durante 1 hora, las

células no adherentes se eliminaron mediante tres lavados con 250 μ L de PBS estéril. Las células adheridas se fijaron a 60 °C durante 20 min y se tiñeron con cristal violeta (solución al 0,1 %, 100 μ l/pocillo) durante 45 min. Posteriormente, los pocillos se lavaron cinco veces con PBS para eliminar el exceso de colorante. El colorante unido a las células se liberó añadiendo 100 μ L de buffer de citrato (pH 4.3). Después de 45 min de incubación a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 655 nm utilizando el lector de placas. Como control negativo se usó moco teñido sin células. Cada experimento se realizó por triplicado. Las diferencias significativas se examinaron mediante ANOVA y la prueba de Dunnett, los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los resultados se expresaron dividiendo el valor de la absorbancia del tratamiento entre el valor de absorbancia del control.

5.10. Aislamiento y purificación parcial de bacteriocinas.

Se recogieron 30 ml de cada CFS y se mezclaron en una solución saturada de sulfato de amonio (50% p/v) y se dejó en agitación vigorosa durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, la diálisis de la solución se llevó a cabo en una membrana de corte de 2 kDa contra 1x PBS durante la noche. El producto recuperado se liofilizó y almacenó a -20 °C.

5.11. SDS-PAGE.

La concentración de proteína en el sobrenadante libre de células se determinó mediante espectrofotometría a 595 nm utilizando el reactivo de Bradford. Como patrón se utilizó nisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EE. UU.) 30 mM en solución de HCl 0,02 N. 10 mg/100 μ L de CFS liofilizado en agua Milli-Q sin calentar se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con gel al 15 % (Liu et al. 2016). La electroforesis migró a 100 V durante 2 horas (Abts et al., 2011). Para determinar la masa molecular aparente y la actividad biológica de las proteínas, el gel se cortó en dos partes verticales después de SDS-PAGE. La parte del gel que contenía el marcador de masa molecular y las muestras se tiñó con azul de Coomassie R-250, mientras que la parte restante, que contenía solo muestras, se lavó con agua estéril Milli-Q durante 1 hora. La segunda parte del gel se usó para la detección directa de la actividad antimicrobiana cubriendo con agar blando (0,8 %) sembrado con *A. hydrophila* CAIM347 e

incubando a 30 °C durante la noche. La formación de una zona de inhibición indicó la posición y el tamaño de la bacteriocina activa en el gel.

5.12. Inhibición del crecimiento de *A. hydrophila* por los sobrenadantes de probióticos y la curcumina

Se suplementó caldo M17 con curcumina 1, 10, 25 y 50 μM y el sobrenadante de cada una de las cepas *L.lactis* 0.257 mg/mL, *P. pentosaceus* 0.243 mg/mL y *L. rhamnosus* 0.207 mg/ mL, y sus respectivas combinaciones. En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 500 μL de medio con la concentración de curcumina y 500 μL con el sobrenadante de probiótico, con un inóculo inicial de 1×10^7 UFC/ml de *A. hydrophila* por tubo. Como control se utilizó medio sin suplementar inoculado con la misma concentración de bacteria. Para evaluar el crecimiento bacteriano, se transfirieron 200 μL por tubo a microplacas de 96 pozos y se midió la absorbancia a 600 nm a las 2, 4, 8 y 12 horas de cultivo. Se realizaron dos experimentos por duplicado por tratamiento en días diferentes.

5.13. Inhibición de la formación de biopelícula de *A. hydrophila*

El ensayo de cristal violeta en microplaca es uno de los métodos más populares para la cuantificación de biopelícula (Shukla & Rao, 2017) Este método indirecto, se basa en la capacidad de este colorante para teñir la matriz de polisacáridos (Corte et al., 2019). El potencial inhibitorio de la curcumina y probióticos contra *A. hydrophila* fue determinado en microplacas de 96 pozos siguiendo el método descrito por (Tanhay Mangoudehi et al., 2020). Se preparó el medio con las concentraciones antes mencionadas de curcumina, sobrenadante libre de células de cada probiótico y la combinación de ambos factores. Cada pozo fue inoculado con 1×10^6 UFC/ml de *A. hydrophila* y 200 μL del medio suplementado. Como control se utilizó medio sin suplementar inoculado con la misma concentración de bacteria. Las placas se incubaron a 30 °C por 48 h. sin agitación. Después, cuidadosamente se aspiró el contenido de cada pozo y se lavaron con PBS estéril dos veces. La placa se tiñó con cristal violeta al 0.1 % por 15 min. a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el colorante y se lavó la placa con PBS estéril dos veces. Finalmente, para revelar se agregó etanol al 95% a cada pozo y se registró la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas iMark TM (BIORAD, Japan). Se realizaron cinco experimentos en diferentes días, cada

tratamiento por quintuplicado. La inhibición se expresó como % y se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de Biofilm (\%)} = \frac{\text{D.O Control} - \text{D.O Tratamiento}}{\text{D.O.Control}} \times 100$$

5.14. Permeabilidad de la membrana

Para el ensayo de permeabilidad de la pared bacteriana se utilizó el protocolo propuesto por (Roth et al., 1997) con ligeras modificaciones. Se suplementó caldo M17 fresco con curcumina 1, 10, 25 y 50 μM y el sobrenadante de cada una de las cepas. En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 500 μL de medio con la concentración de curcumina y 500 μL con el sobrenadante de probiótico, con un inóculo inicial por tubo de $1 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$ de *A. hydrophila* cultivada en M17 a 30°C toda la noche. Entre cada paso las células fueron centrifugadas a 4000xg 3 min a 4°C y lavadas una vez con solución salina estéril. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante sin perturbar la pastilla. Posteriormente, se agregaron 50 μL de SYTOX® Green (invitrogen, Eugene, Oregon) diluido 1:30,000 en buffer TAE. Las muestras permanecieron en agitación y en obscuridad a 30°C durante 30 min. Después se centrifugo con las condiciones preestablecidas. Se realizó un lavado con solución salina estéril para eliminar el exceso del colorante. La pastilla se re-suspendió en un tubo en 200 μL de solución salina estéril. La lectura de fluorescencia se realizó a los 30, 60 y 120 min con el fluorómetro Quantus (Promega, USA) en el canal azul (excitación 470 nm, emisión 580 nm). Se realizaron seis experimentos en diferentes días, cada tratamiento por triplicado. El resultado se expresó como unidades relativas de fluorescencia (URF). El índice de permeabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de permeabilidad} = \frac{\text{URF tratamiento}}{\text{URF control}}$$

5.15. Microscopía electrónica de transmisión

Para demostrar los efectos de la curcumina y las bacteriocinas en la pared bacteriana de *A. hydrophila*, se utilizó el protocolo propuesto por (Mai et al., 2009) para microscopía electrónica de transmisión, con ligeras modificaciones. Se suplementó caldo M17 fresco con curcumina 1, 10, 25 y 50 μM y el sobrenadante de cada una de las cepas. En tubos Eppendorf de 2 mL se colocaron 500 μL de medio con la concentración de curcumina y 500 μL con el sobrenadante de probiótico, con un inóculo inicial por tubo de $1 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$ de *A. hydrophila* cultivada en M17 a 30°C toda la noche. El tiempo de interacción fue de 2 horas. Entre cada paso las células fueron centrifugadas a 4000xg 3 min a 4°C y lavadas con PBS 1X. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante sin perturbar la pastilla. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 4% mínimo 24 horas. Las pastillas se fijaron posteriormente en tetraóxido de osmio al 1% en PBS 1x, se deshidrataron en gradiente ascendente de etanol absoluto, se trataron con óxido de propileno y se embebieron en resina EPON (SIGMA, St Louis, Mo, USA). A continuación, se montaron secciones delgadas de cada muestra sobre rejillas de cobre de 300 mesh y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para microscopía electrónica de rutina.

5.16. Citotoxicidad de la curcumina en epitelio intestinal de la tilapia

5.16.1. Obtención de enterocitos de tilapia

Las tilapias utilizadas fueron sacrificadas de forma humanitaria mediante sobredosis por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. En condiciones asépticas, se abrió rápidamente la cavidad abdominal y se extrajo el intestino completo. El tejido se colocó en una caja Petri estéril y se lavó el contenido hasta vaciar con PBS frío varias veces. Se ató un extremo con hilo para sutura y se lavó con solución de citratos fría con 1 μ M de dithiothrietol (para remover el moco), una vez lleno se ató el otro extremo. El intestino con citrato en el interior se colocó en un matríz estéril con PBS y se incubó con agitación constante 10 min a 28°C. Después se recolectaron los citratos contenidos en el intestino y se refrigeraron en un tubo Falcon de 15 ml. Se volvió a llenar el intestino con citratos y se incubó 28°C por 10 min. El contenido se colectó en el mismo tubo Falcon. El intestino se llenó con PBS y se frotó como cilindro. Se repitió otra vez y se colectan en un nuevo tubo Falcón. Se centrifugó a 4000 rpm por 5 min a 4° C cada tubo (citratos y PBS) La pastilla se resuspendió en 1 mL de Solución Balanceada de Hank (HBSS). Todo el trabajo se realizó en frío y se adicionó mezcla de antibióticos (penicilina 10,000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml y anfotericina-B 25 μ g/ml) al 1% a las soluciones de PBS y citratos. Se realizó el conteo de viabilidad con el colorante vital azul tripan en cámara de Neubauer.

5.16.2. Cultivo primario de enterocitos

Las células de epitelio intestinal de tilapia fueron cultivadas en el Medio Eagle modificado por Dulbecco (SIGMA) con 20% de suero fetal bovino (FBS, MARCA) y 2% de L-glutamina (SIGMA) a 28°C y 5% CO₂. Para los ensayos de toxicidad se utilizaron placas de 96 pozos con 20,000 células por pozo, se alcanzó una confluencia cercana al 80% aproximadamente a las 12 horas de la siembra. Se reemplazó el medio viejo por medio suplementado con las concentraciones de curcumina a evaluar (0,1,10,25,50, 100 y 200 μ M) y se dejó incubando toda la noche.

5.16.3. Ensayos de MTT

Se preparó una solución stock de Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT, SIGMA), 5mg/ml en PBS 1X y se esterilizó por filtración. Se reemplazó el medio viejo (que contenía curcumina) por 90 μ l de medio nuevo sin curcumina ni SFB y se agregaron 10 μ l de la solución stock MTT cada pozo. Se incubó 4 horas a 28°C. Pasado este periodo, se removió cuidadosamente el medio. Para solubilizar los cristales de formazan se agregaron 100 μ l de DMSO (SIGMA) a cada pozo y se mezcló con la pipeta varias veces. Se incubó en la obscuridad en agitación por 15 minutos a 28°C. Como blanco se utilizó DMSO en un pozo sin células. Cada ensayo se realizó por triplicado con cinco réplicas por tratamiento. La densidad óptica fue medida usando un lector de microplacas (BioRad, USA) con lectura dual a 650 nm como filtro de referencia y 595nm. El porcentaje de viabilidad se calculó como sigue:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Abs del tratamiento} * 100}{\text{Abs del control}}$$

5.17. Preparación del alimento con probióticos

Para el cálculo de las dosis, se utilizará la siguiente relación:

$$1 \text{ D.O. } (600 \text{ nm}) = 8 \times 10^8 \text{ cel/ml}$$

Una vez que se obtuvo la concentración 1×10^9 g/alimento, se centrifugó para formar la pastilla y resuspendió en PBS 1X estéril con 0.5% de carboximetilcelulosa (CMC), La mezcla se aplicó por aspersión sobre el alimento (Hermosillo et al., 2012). Una vez seco, el alimento se guardó en un recipiente hermético a temperatura ambiente por dos semanas (Corcoran et al., 2005).

5.18. Parámetros productivos

Para hacer los cálculos del desempeño productivo, durante cada muestreo se pesaron y midieron los organismos. La longitud total (LT) fue evaluada mediante un ictiómetro graduado en cm. Para estimar el peso total (PT) se utilizó una balanza analítica y el valor se expresó en gr.

5.18.1. Factor de conversión alimenticia (FCA).

El Factor de Conversión alimenticia fue calculado como sigue:

$$\frac{\text{Alimento consumido (Kg)}}{\text{Ganancia de peso (Kg)}}$$

5.18.2 Tasa específica de crecimiento (TEC).

La Tasa de Crecimiento Específico se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\ln pf - \ln pi}{tiempo * 100}$$

5.19. Expresión génica

Para el diseño de primers se utilizó la base de datos del NCBI, posteriormente se utilizó el software primer 3 plus, para corroborar el correcto alineamiento se realizó una pcr virtual con el software priming blast del NCBI. Las muestras se preservaron en RNAlater a -80° C hasta su utilización. La extracción de RNA se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante. Se ajustó la concentración de RNA y se realizó la reto-transcripción siguiendo las especificaciones del fabricante. Para evaluar la expresión de los marcadores (tabla1) se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ con β -actina como “housekeeping” en el equipo para q-PCR StepOne (Applied Biosystem) con master mix SYB Green (TheroFisher) en las siguientes condiciones: holding 50°C 2 min, 95°C 3 min x1, cycling 95°C 15seg, 66°C 30 seg x 40, metl 95°C 15 seg, 63°C 60 seg 95°C 15 seg.

Tabla1.- Secuencias de primers

Marcador		Secuencia oligo (5' a 3')	Tamaño (pb)
β -defensina	F	GGTTGTTTTGGCACTTTTGG	20
	R	AGTGAGACACGCAACACAGG	20
IFN γ	F	GCTGAAGAAACACCGCTACC	20
	R	TCTGCGTCTCCTCTGGATCT	20
IgM	F	GGAAAAGGCACAACGGTCAC	20
	R	TGCCTTTCTGTACTGCAGGG	20

IgT	F	CTCAGTCAGTTCAGGGCAGG	20
	R	ACCATTGTGCCTTTTCCCA	20
IL-1 β	F	CTGAGGAATGGAGCCTCAAG	20
	R	TGTGCTCTTCCACAATGCTC	20
IL-10	F	GCTCTGCTTTGTGCTCTCCT	20
	R	AGGAGTCTTCGACGGACTGA	20
Lys-c	F	GTGACTGGGCCAAAAAGCTG	20
	R	GCCGAAGTCAGTGGATCCAT	20
Muc2	F	AGAGTGGATCCCCTTGTGTG	20
	R	TTCCTCTCGCTCCTGTTTGT	20
TLR4	F	CCCTTGGGAAGTGGACTCAC	20
	R	TGCAACCGTGAATCTCCCTC	20
β -actina	F	GACTTCGAGCAGGAGATGGG	20
	R	GACGTCGCACTTCATGATGC	20

5.20. Análisis histológico

Para el análisis histológico, las muestras de tejido recolectadas del intestino posterior y bazo se fijaron en formalina tamponada al 10 % durante 24 h, se deshidrataron en etanol absoluto, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes en el microtomo de 5 μm de espesor. Los cortes de tejido se tiñeron con el protocolo estándar para Hematoxilina-Eosina (H & E) ó Azul alcian-Ácido Periódico de Schiff (AB-PAS) y se observaron microscópicamente con un aumento de 10x, 20x y 40x.

5.20.1. Mucosustancia

Para la detección de mucina en el intestino se utilizó la combinación de las tinciones de Azul Alcian-Ácido (AB) Periódico de Schiff con el protocolo utilizado por Osho et al. (2017). Las muestras de intestino fueron desparafinizadas en gradiente descendente de xilol-alcohol Se preparó la solución de AB (1g de AB, ph 2.5 en 97 mL de agua destilada acidificada con 3 ml de ácido acético) por 30 min. Después se enjuagaron con agua corriente por 10 min, posteriormente se oxidaron en ácido periódico (5g/L) por 5 min y se enjuagaron en agua tibia por 10 min. Se contrastó con reactivo de Schiff por 10 min. Finalmente se deshidrató con gradiente ascendente de alcohol-xilol y se cubrieron con el medio de montaje Entellan (SIGMA). Las muestras fueron analizadas en el microscopio óptico y se las células mucosas por cripta fueron contabilizadas y graficadas.

5.21. Estimulación de leucocitos de tilapia

5.21.1 Obtención de leucocitos de riñón cefálico

Se utilizó el método de Reyes-Becerril et al. (2012) .El riñón cefálico fue disectado por incisión ventral en condiciones asépticas, cortado en pequeños fragmentos y transferido a 8 ml de RPMI con 2% de FBS. Inmediatamente los leucocitos fueron lavados y contados en cámara de Neubauer. La viabilidad se evaluó con azul tripan.

5.21.2. Actividad de la mieloperoxidasa

Colocar leucocitos de riñón cefálico a razón de 10^6 cel/mL en RPMI. Lisar con Triton 100X al 0.02%. Centrifugar 10 min, 400x g. Transferir 150 μ L del sobrenadante en placas de 96 pozos que contienen 25 μ L de OPD 10 mM y H_2O_2 5 mM. La reacción fue detenida después de 2 min agregando 50 μ L ácido sulfúrico 2M. Leer densidad óptica (DO) a 450 nm.

5.21.3. Actividad del estallido respiratorio

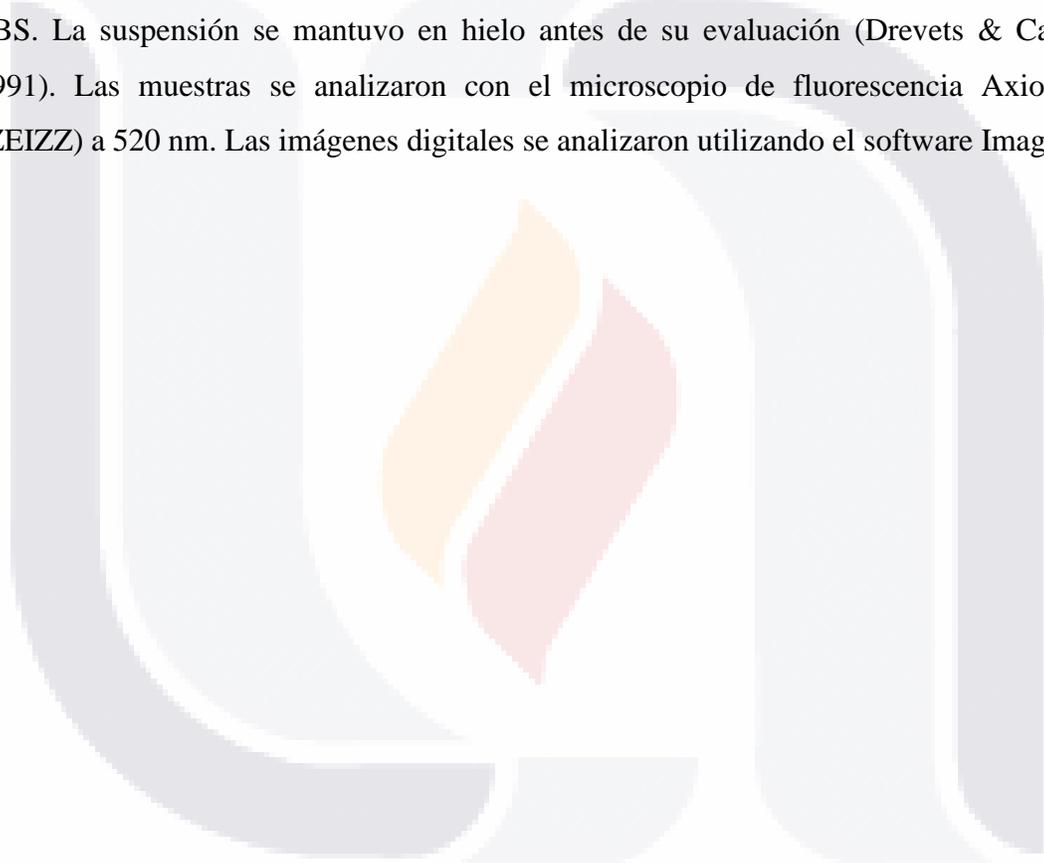
Aislar leucocitos (de bazo) y colocar 1×10^6 células por pozo con 25 μ L de nitroblue tetrazolium (NBT, 1 g/L) por 2 h a 28°C. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante, fijar las células en metanol 100% por 5 min. Cada pozo se lavó 2 veces con 125 μ L de metanol al 70% (v/v). Dejó secar durante 2 horas a 40°C. Disolvió el NBT reducido (como formazán) en 125 μ L de hidróxido de potasio (KOH) 2 N y 150 μ L de DMSO por pozo. La densidad óptica fue medida usando un lector de microplacas (BioRad, USA) a 650 nm Wu et al. (2016).

5.21.4. Marcaje fluorescente de bacterias

Aeromonas hydrophila inactivada por calor durante 5 minutos en agua hirviendo, fue lavada con PBS 1X estéril, después marcada con fluoresceína sódica 0.1 mg/ml por 60 min. Se formó el pellet de bacterias centrifugando $12,500 \times g$ por 5 min, después se lavó con PBS para retirar el fluorocromo sin unir y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

5.21.5. Ensayo de fagocitosis

Se utilizó 2.5×10^6 leucocitos y 2.5×10^7 bacterias marcadas con fluoresceína, la mezcla se ajustó a 1 mL volumen final de RPMI con FBS 5%. La mezcla se mantuvo en agitación por 30 min a 28°C, después se centrifugó a $300 \times g$ por 10 min a 4°C. Para remover las bacterias no fagocitadas se lavaron 3 veces con HBSS frío. Los núcleos de los leucocitos se tiñeron con Hoechst 1x durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se realizó un lavado con HBSS frío. Las células se re-suspendieron en 1.0 ml de HBSS con 5% de FBS. La suspensión se mantuvo en hielo antes de su evaluación (Drevets & Campbell, 1991). Las muestras se analizaron con el microscopio de fluorescencia Axios Cop4 (ZEISS) a 520 nm. Las imágenes digitales se analizaron utilizando el software ImageJ.



5.22. Análisis estadístico

Los datos de todas las variables fueron capturados y ordenados en una hoja electrónica de Microsoft Excel®. Se utilizó MINITAB® 17 para comprobar el supuesto de normalidad con la prueba de Shaphiro Wilks y el supuesto de homocedasticidad con la prueba de Levene. Para las variables que no cumplieron estos supuestos, fue necesario utilizar análisis no paramétrico (Kruskal Wallis). Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) mediante el procedimiento para modelos lineares generales (GLM) y se utilizó el método Dunnett para comparaciones múltiples respecto al control. Para calcular la dosis letal 50 (DL₅₀) de curcumina en los enterocitos se utilizó un modelo no lineal de dosis-respuesta con una pendiente variable (4 parámetros). Para la expresión génica se utilizará el modelo $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se consideró un nivel de probabilidad $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Antagonismo

Los experimentos con la técnica de agar plug diffusion demostraron que las 3 cepas seleccionadas pueden coexistir, ya que ninguna cepa inhibió el crecimiento de la otra durante 48 horas de incubación a 36.5 °C en agar MRS y M17 (Figura 7).

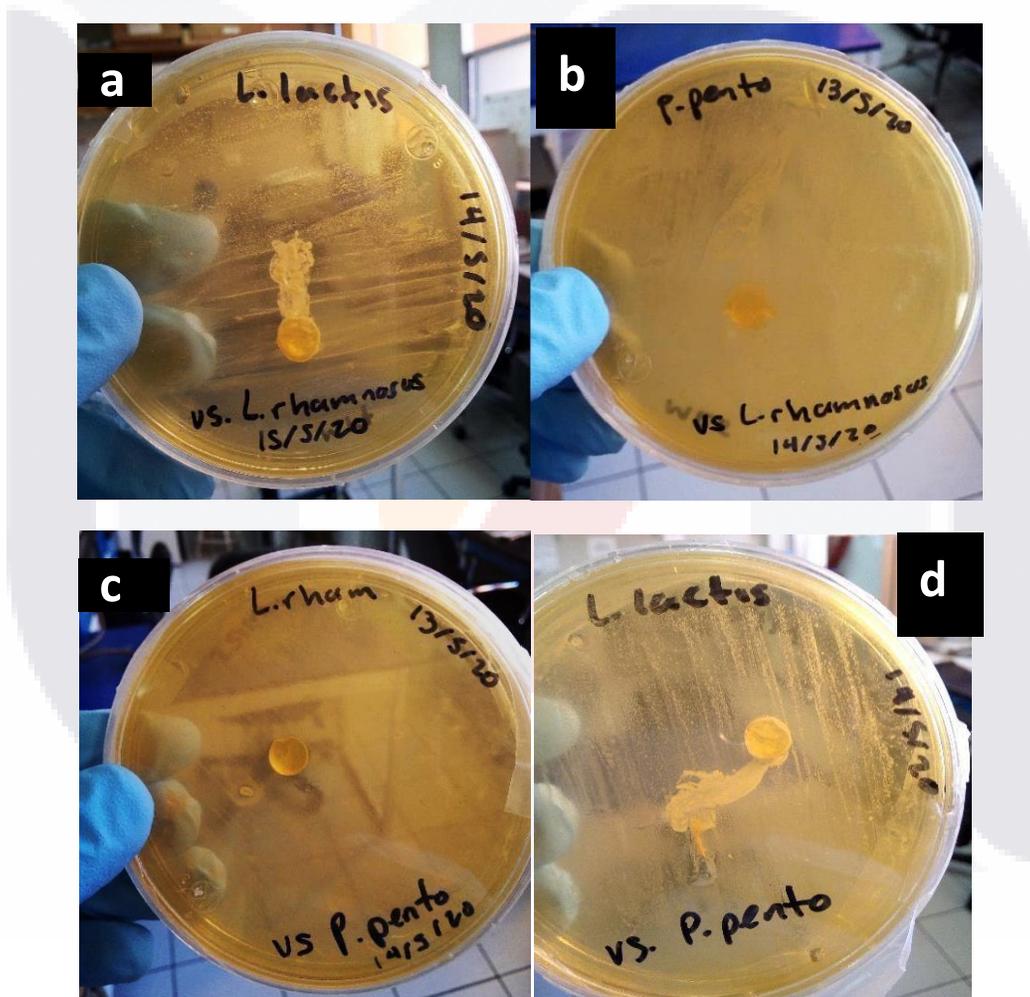


Figura 7. Placas de agar sembradas con las cepas probióticas retadas entre ellas mediante la técnica de agar plug difusión. a) Placa con *L. lactis* contra *L. rhamnosus* donde se aprecia que no existen zonas de inhibición. b) Placa con *P. pentosaceus* contra *L. rhamnosus* donde se aprecia que no existen zonas de inhibición. c) Placa con *L. rhamnosus* contra *P. pentosaceus* donde se aprecia que no existen zonas de inhibición. d) Placa con *L. lactis* contra *P. pentosaceus* donde se aprecia que no existen zonas de inhibición.

6.2. Crecimiento a diferente pH.

Lactococcus lactis NZ9000 presentó el mayor crecimiento a pH 6 y 8, a pH 4 el crecimiento fue limitado, mientras que a pH 2 no hubo crecimiento (Figura 8). En el caso de *P. pentosaceus* NCDO 990 presentó el mayor crecimiento a pH 6 y 8, mientras que a pH 2 no hubo crecimiento (Figura 9). *L. rhamnosus* presentó un crecimiento mayor a pH 4, contrario a lo observado en las cepas anteriores. Mientras que a pH 6, 8 y 2 se observó el mismo patrón que las otras cepas (Figura 10).

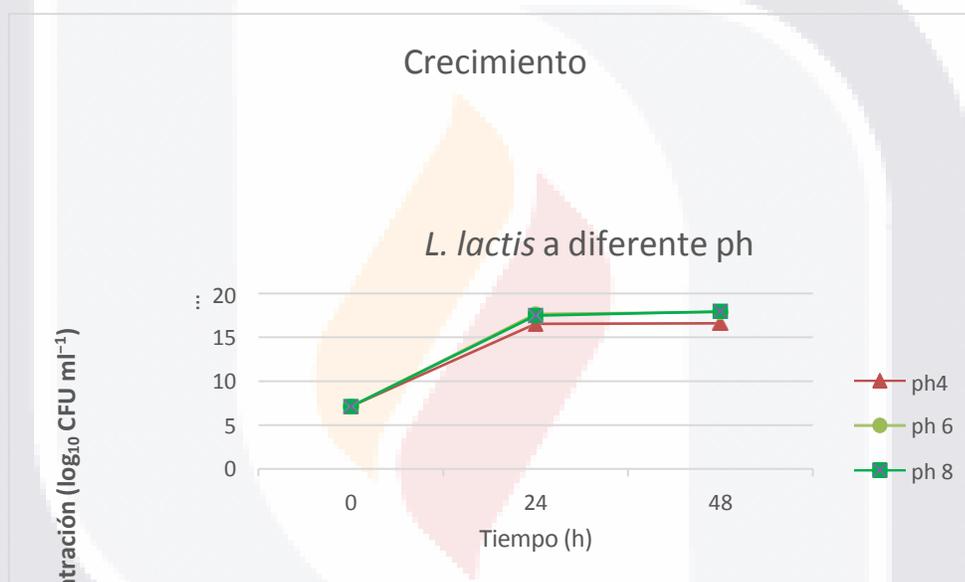


Figura 8. Cinética del crecimiento de *L. lactis* durante 48 horas en medio acidificado.n=2

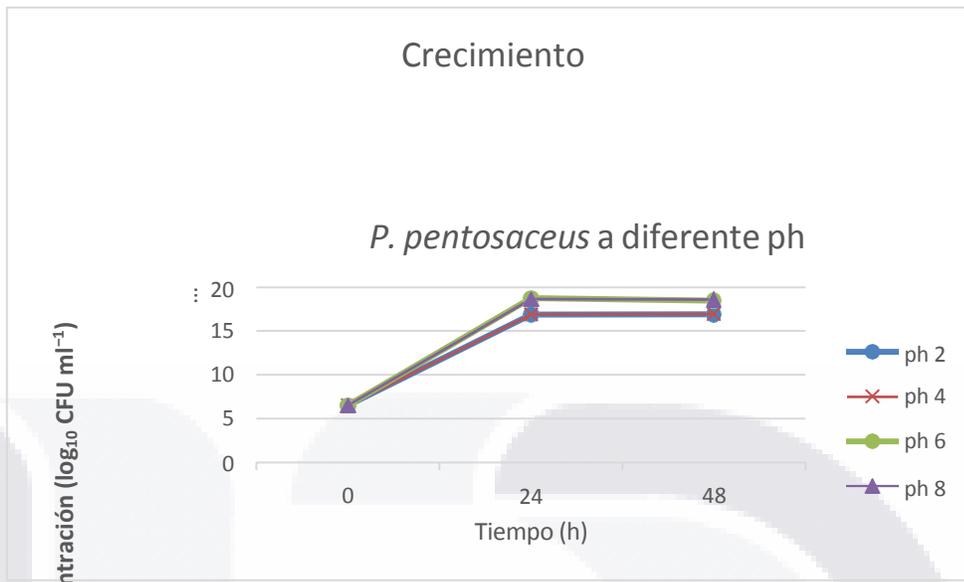


Figura 9. Cinética del crecimiento de *P. pentosaceus* durante 48 horas en medio acidificado. n=2

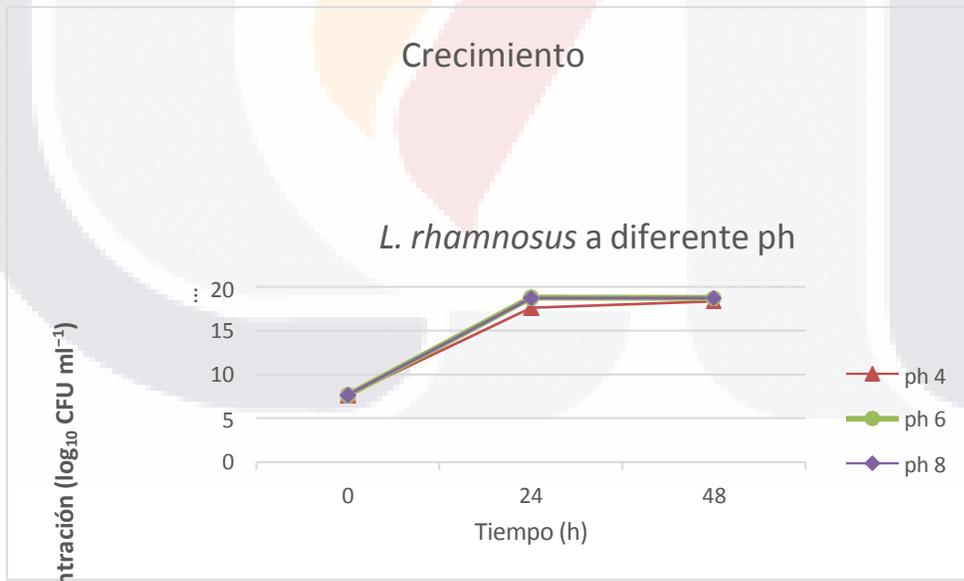


Figura 10. Cinética del crecimiento de *L. rhamnosus* durante 48 horas en medio acidificado. n=2

6.3. Adherencia al intestino

Las tres cepas evaluadas presentaron capacidad (*in vitro*) para adherirse al moco intestinal (Figura 11). El mejor tratamiento resulto ser *L. rhamnosus* (3.93 ± 0.23) con un incremento significativo ($P=0.0001$). Por su parte *P. pentosaceus* presentó una adherencia que se incrementó casi tres veces arriba del control (2.80 ± 0.07). Mientras que, *L. lactis* presentó una pobre adherencia (0.43 ± 0.03) en comparación con las otras cepas evaluadas.

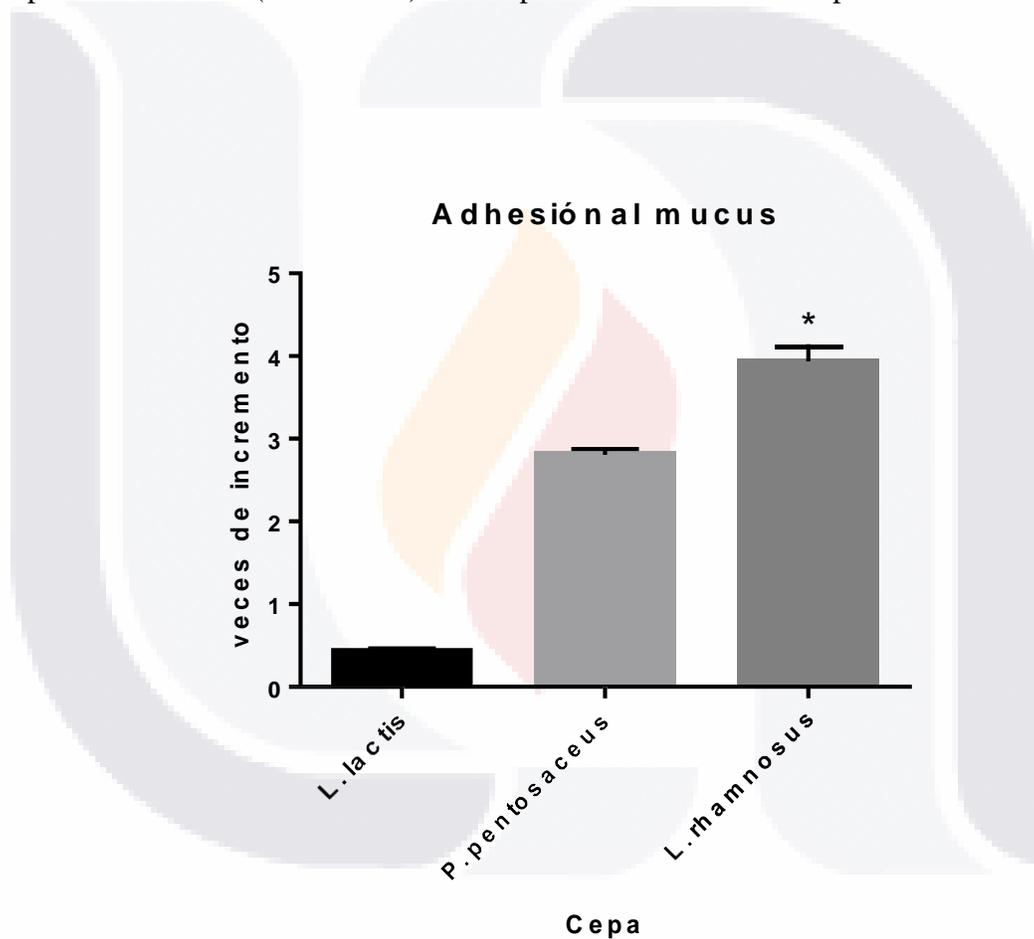


Figura 11. Adhesión de las cepas probióticas al mucus del intestino de tilapia. La adhesión es expresada como la turbidez causada por la unión de las bacterias al mucus teñido por el cristal violeta. Las Barras verticales representan el error estándar de la media (ESM) ($P<0.05$, $n=5$).

6.4. SDS-PAGE

La concentración final de proteínas se cuantificó con la técnica de Bradford con los siguientes resultados: *L.lactis* 0.257 mg/mL, *P. pentosaceus* 0.243 mg/mL y *L. rhamnosus* 0.207 mg/ mL Con la electroforesis realizada, se demostró la presencia de proteínas de bajo peso molecular inferior a 10 kDa correspondientes a bacteriocinas secretadas por cada una de las cepas evaluadas (Figura.12a). La parte superpuesta del gel muestra que el CFS de tres cepas probióticas es activo contra *A. hydrophila* (Fig. 12b y Fig. 13).

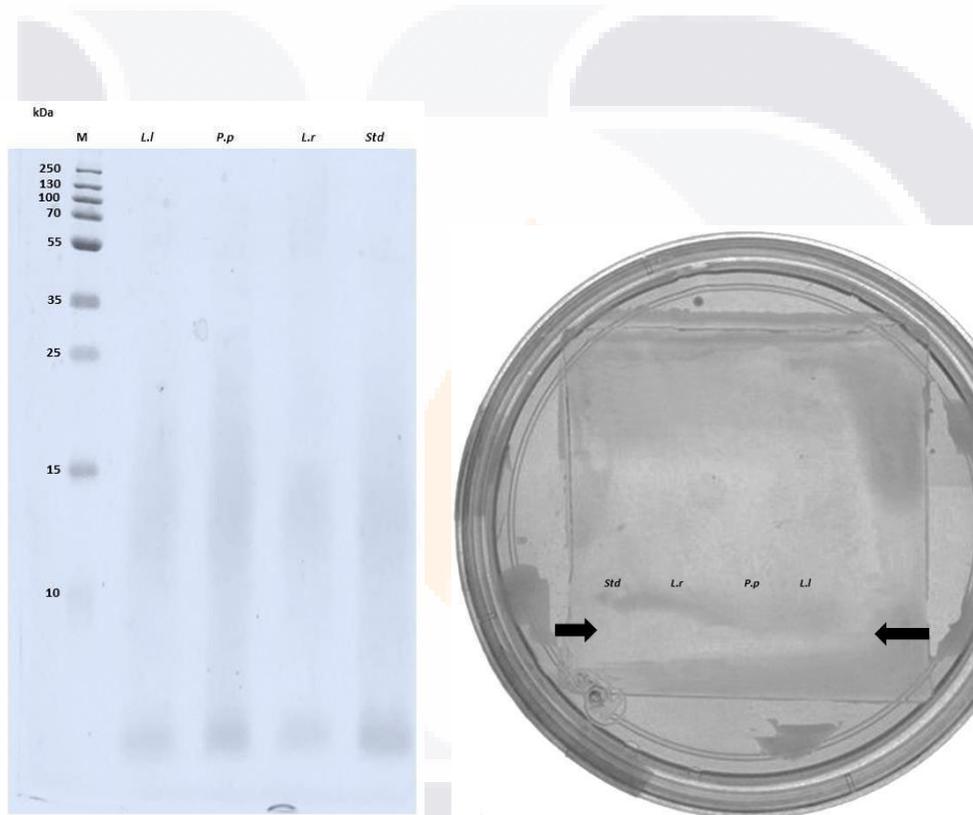


Figura 12. a) SDS-PAGE para la detección de bacteriocinas (izquierda-derecha) Carril 1 (M) marcador de peso molecular, Carril 2 (*L.l*) sobrenadante de *L. lactis*, Carril 3 (*P.p*) sobrenadante de *P. pentosaceus*, Carril 4 (*L.r*) sobrenadante de *L. rhamnosus*, y Carril 5 (Std) nisina 30 mM. b) Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la zona de inhibición frente a *A. hydrophila* por las bacteriocinas. Las flechas delimitan la zona de inhibición.

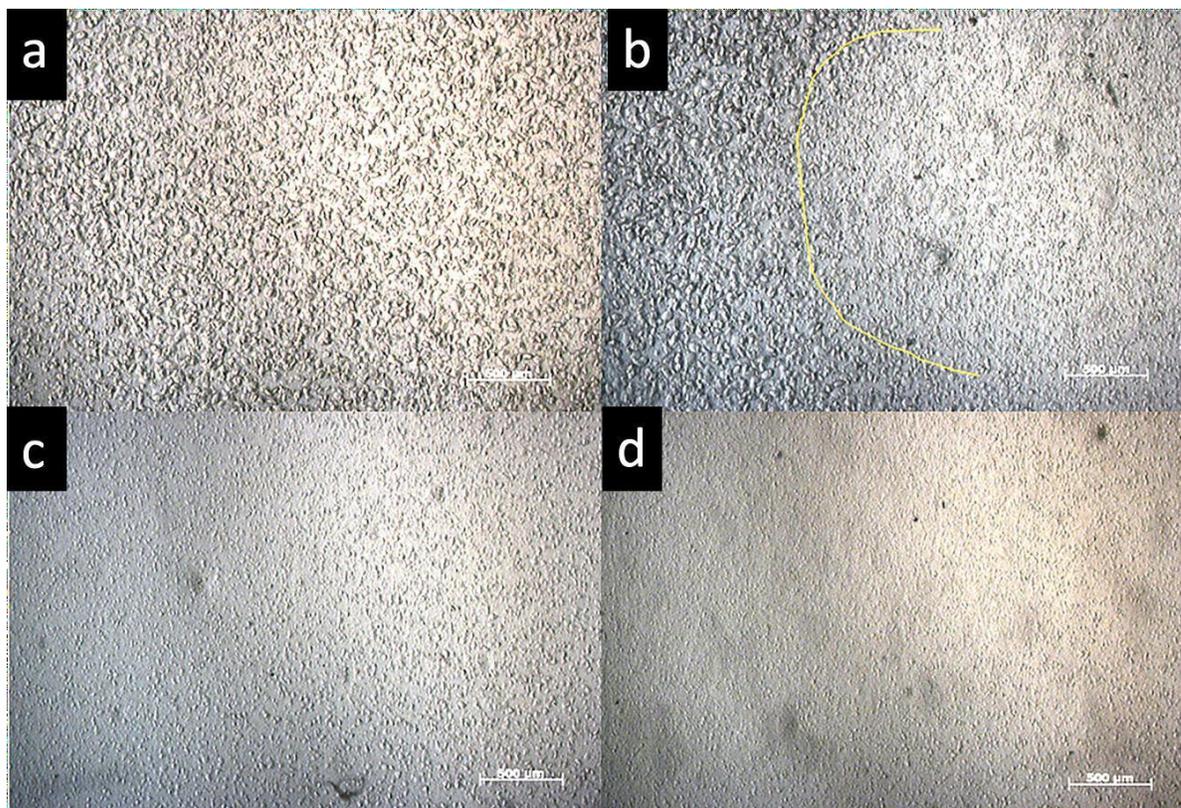
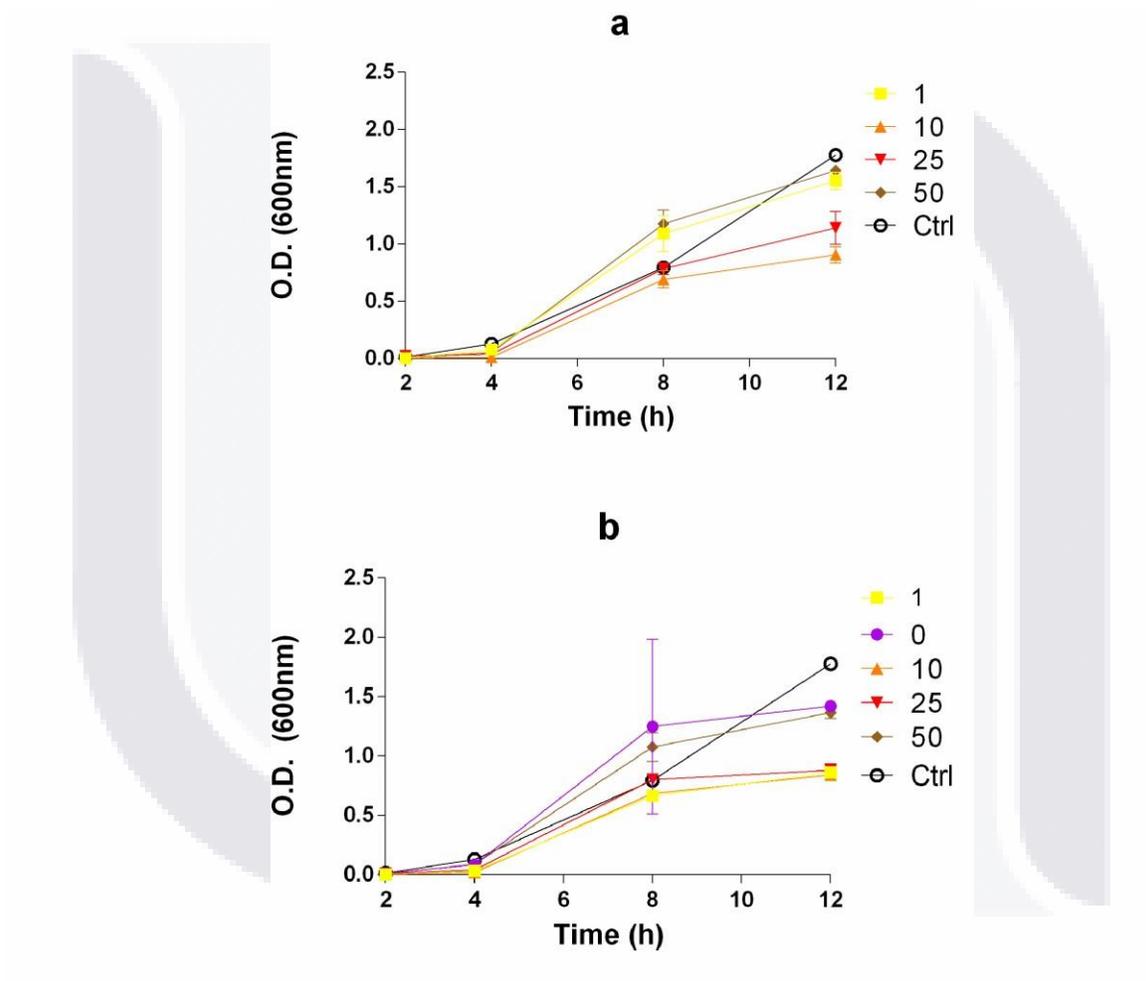


Figura 13. Fotografía de la zona de inhibición de *A. hydrophila* por bacteriocinas bajo microscopía de luz de contraste de fase a 2,5x. a) placa inoculada con *A. hydrophila* sin inhibición, b) línea amarilla indica zona de transición entre cultivo sin estimulación, y el área de inhibición por *L. rhamnosus* (Lr), c) zona de inhibición por *P. pentosaceus* (Pp), d) zona de inhibición por *L. lactis* (LL).

6.5. Inhibición del crecimiento de *A. hydrophila* por los sobrenadantes de probióticos y curcumina.

Se puede apreciar que, curcumina en las concentraciones de 1 y 50 μM tiene un ligero estímulo sobre crecimiento de *A. hydrophila* con valores de densidad óptica similares al control, mientras que 10 y 25 μM reducen el crecimiento a una cantidad cercana a la mitad de densidad óptica del control (Fig. 14a). Por su parte, el medio suplementado con curcumina y el sobrenadante de *L. lactis* presentó una disminución importante en la densidad óptica respecto al control, con las concentraciones 1, 10 y 25 μM de curcumina (Fig.14b). La combinación del sobrenadante de *P. pentosaceus* con diferentes concentraciones de curcumina, muestran un descenso en la densidad óptica en los tratamientos con 1, 10 y 25 μM de curcumina (Fig. 14c). El crecimiento de *A. hydrophila* en medio suplementado con curcumina y el sobrenadante de *L. rhamnosus* muestra un

patrón similar al observado en el tratamiento con el sobrenadante de *L. lactis* y *P. pentosaceus* (Fig. 14d). En lo que respecta a la sinergia de los sobrenadantes de las tres cepas, se observan patrones similares a los observados con los sobrenadantes por separado de las tres cepas (Fig. 14e).



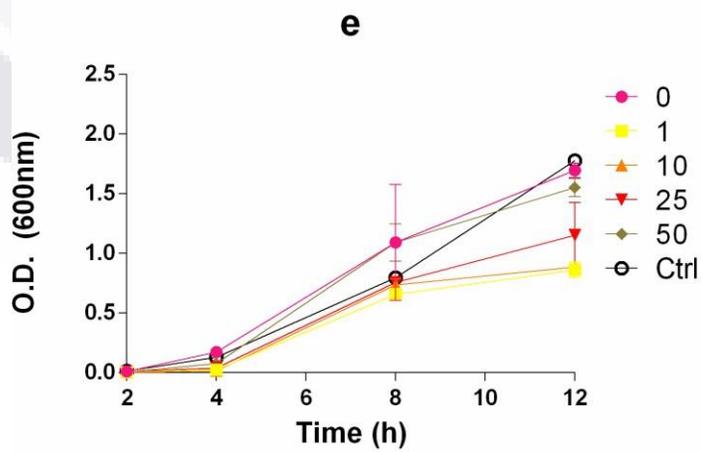
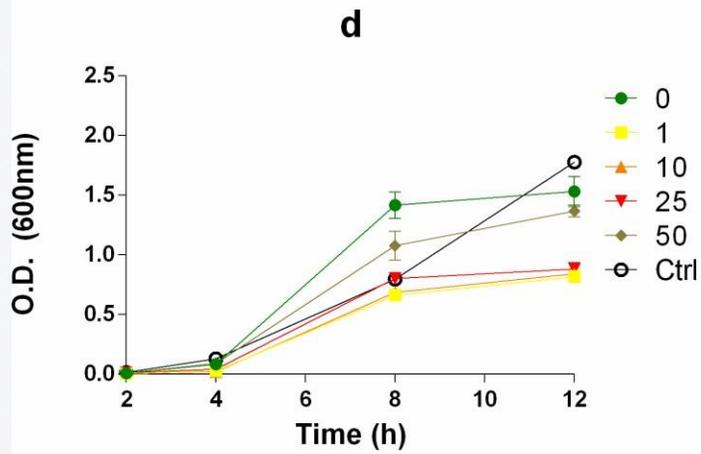
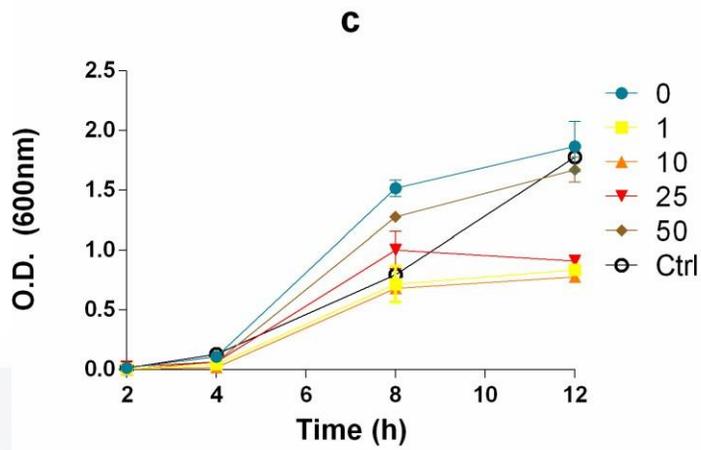
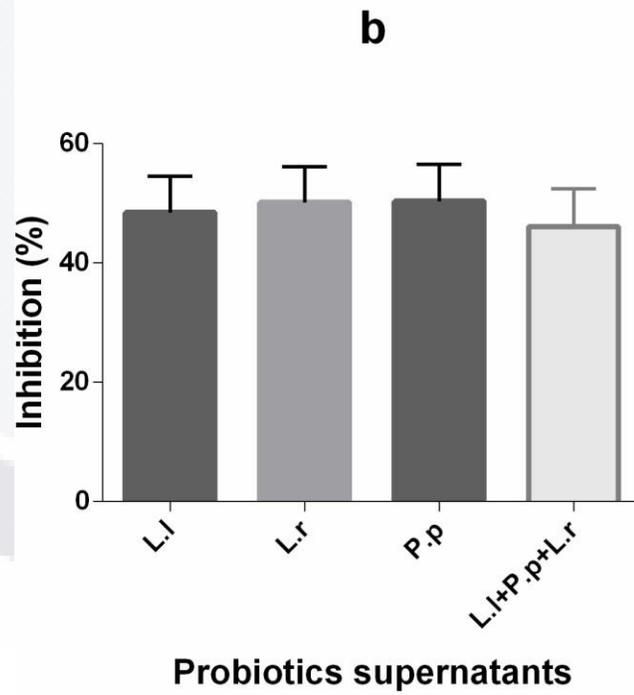
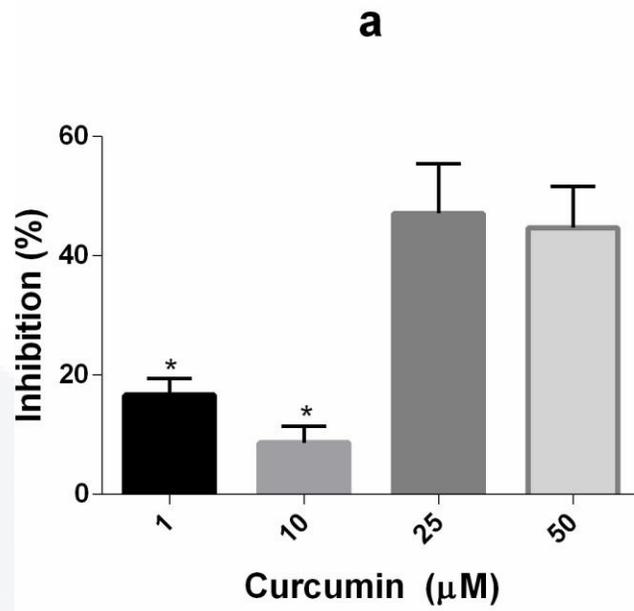
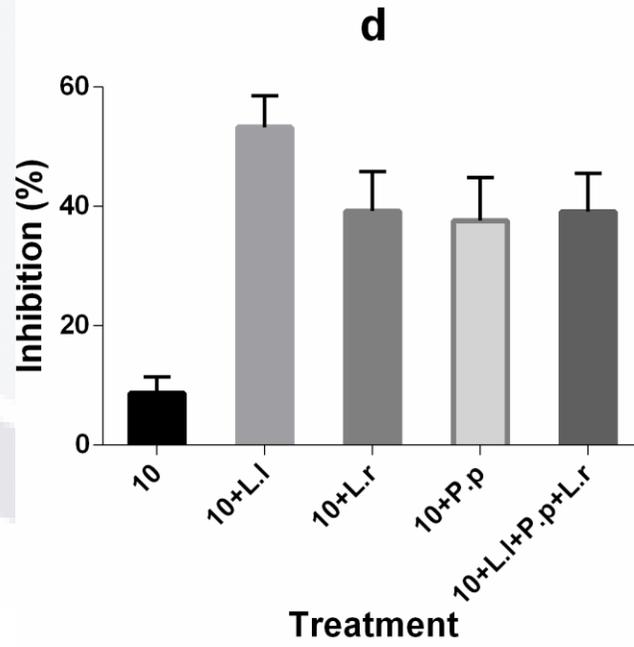
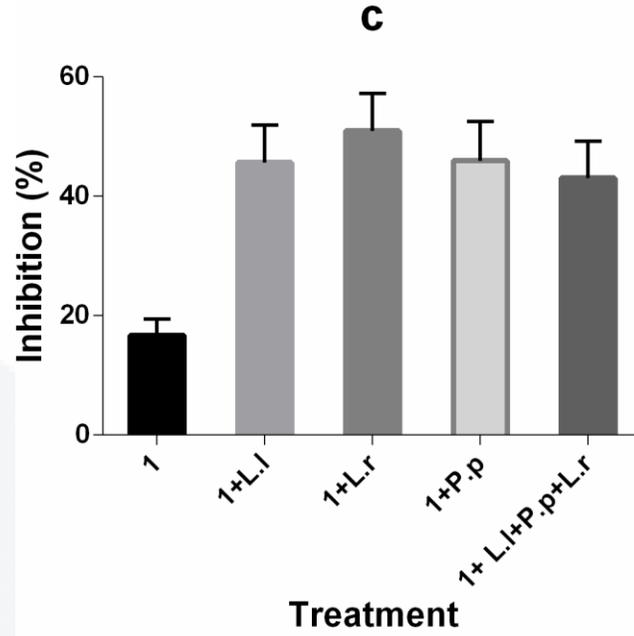


Figura 14. Cinética del crecimiento de *A. hydrophila*. a ensayo de la cinética del crecimiento de *A. hydrophila* en diferentes concentraciones (μM) de curcumina ($P < 0.05$, $n=2$). Figura 14 b ensayo de la cinética del crecimiento de *A. hydrophila* en diferentes concentraciones (μM) de curcumina en combinación con sobrenadante de *L. lactis* ($P < 0.05$, $n=2$). Figura 14 c ensayo de la cinética del crecimiento de *A. hydrophila* en diferentes concentraciones (μM) de curcumina en combinación con sobrenadante de *P. pentosaceus* ($P < 0.05$, $n=2$). Figura 14 d ensayo de la cinética del crecimiento de *A. hydrophila* en diferentes concentraciones (μM) de curcumina en combinación con sobrenadante de *L. rhamnosus* ($P < 0.05$, $n=2$). Figura 14 e ensayo de la cinética del crecimiento de *A. hydrophila* en diferentes concentraciones (μM) de curcumina en combinación con los tres sobrenadantes ($P < 0.05$, $n=2$).

6.6. Inhibición de la biopelícula

Los ensayos de inhibición del biofilm de *A. hydrophila* muestran que las concentraciones de curcumina de 25 (47,10 % de inhibición) y 50 μM (44,71 %) inducen una mayor inhibición del biofilm con diferencias significativas ($p = 0,0004$) en comparación con las concentraciones 1 (16,69 %) y 10 μM (8,67 %) (Fig. 15a). Por otro lado, los tratamientos con el sobrenadante de *L. lactis* (48,44 %), *L. rhamnosus* (50,16 %) y *P. pentosaceus* (50,37 %) solos o en combinación (46,10 %), inhibieron el biofilm en porcentaje similar comparado con la curcumina 25 y 50 μM sin diferencia estadística (Fig. 15b). Mientras que la interacción de la curcumina 25 y 50 μM (Fig. 15e, 15f) con los sobrenadantes probióticos no logró superar el efecto de los sobrenadantes y la curcumina sola. Por el contrario, la combinación de curcumina 1 y 10 μM (Fig 15c, 15d) con los sobrenadantes incrementó con diferencia estadística la inhibición del biofilm en estos tratamientos con respecto a la curcumina sola en las mismas concentraciones, con porcentajes como los obtenidos. con las dosis más altas de curcumina y sobrenadantes. Múltiples comparaciones mostraron que no existe diferencia entre los sobrenadantes de cada una de las cepas solas o en combinación en partes iguales.





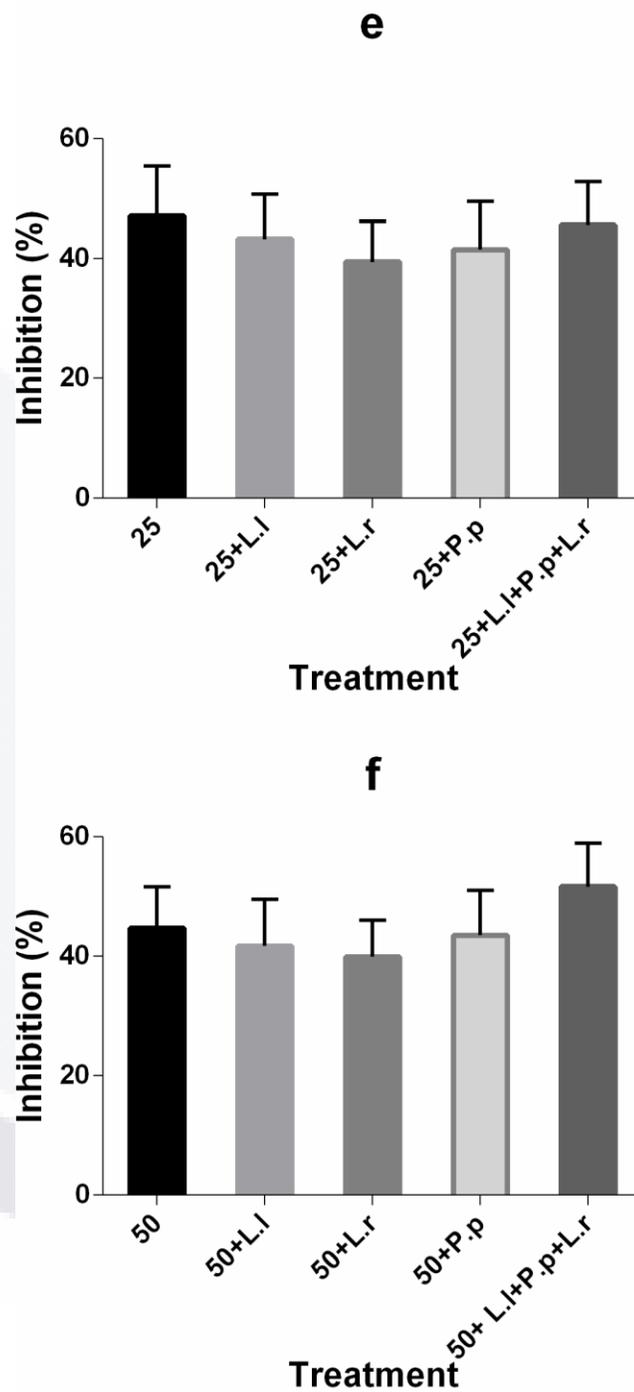
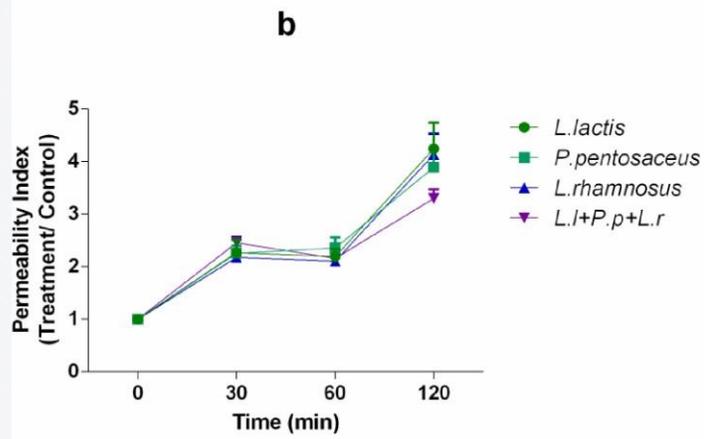
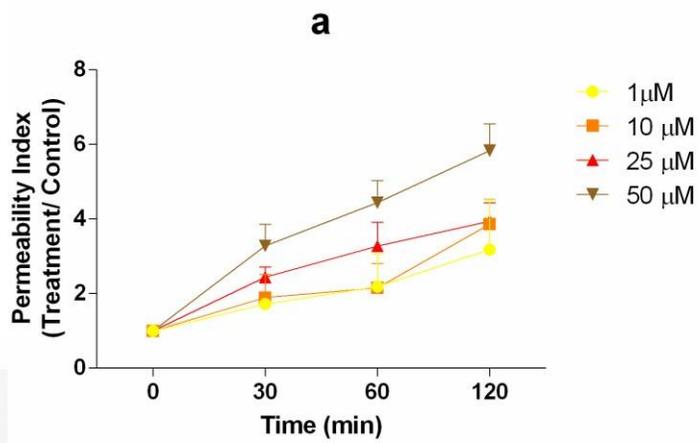


Figura 15 Inhibición del biofilm de *A. hydrophila*. **a.** Inhibición del biofilm de *A. hydrophila* por el tratamiento con diferentes concentraciones μM de curcumina. **Fig. 15b.** Inhibición del biofilm de *A. hydrophila* por el tratamiento con los sobrenadantes de tres cepas de probióticos. **Fig. 15c.** Inhibición del

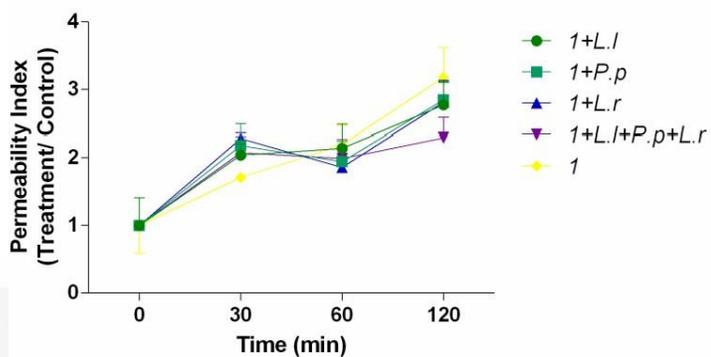
biofilm de *A. hydrophila* por el tratamiento con los sobrenadantes de tres cepas de probióticos y curcumina 1 μ M. **Fig. 15d.** Inhibición del biofilm de *A. hydrophila* por el tratamiento con los sobrenadantes de tres cepas de probióticos y curcumina 10 μ M. **Fig. 15e.** Inhibición del biofilm de *A. hydrophila* por el tratamiento con los sobrenadantes de tres cepas de probióticos y curcumina 25 μ M. **Fig. 15f.** Inhibición del biofilm de *A. hydrophila* por el tratamiento con los sobrenadantes de tres cepas de probióticos y curcumina 50 μ M. Las Barras verticales representan el error estándar de la media (ESM) ($P < 0.05$, $n = 5$).

6.7. Permeabilidad de la membrana

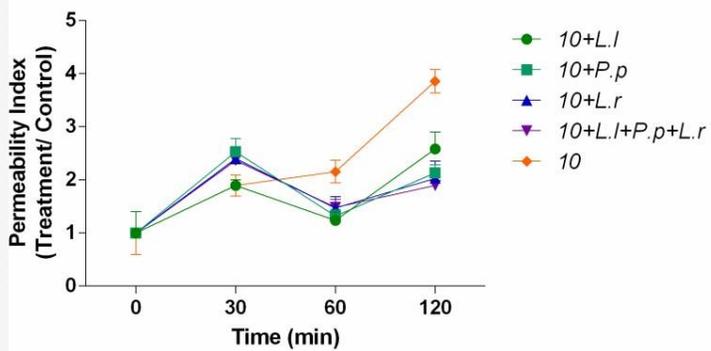
La curcumina 50 μ M dió como resultado el mejor tratamiento en la permeabilización de la membrana de *A. hydrophila* después de dos horas de interacción, con un aumento de seis veces en la intensidad de la fluorescencia en comparación con el control (Fig. 16a). Con el uso de sobrenadantes se observó un aumento de la permeabilidad, proporcional al tiempo de interacción, con un aumento de la intensidad de la fluorescencia cinco veces con respecto al control en todos los tratamientos, sin diferencias significativas entre tratamientos, incluida la combinación de sobrenadantes (Figs. 16b, 16c, 16d, 16e). Sin embargo, los aumentos de permeabilidad no superaron los obtenidos en el tratamiento con curcumina 50 μ M. En la combinación de curcumina y sobrenadantes, no se observó sinergia entre la curcumina y los sobrenadantes probióticos. Los mayores incrementos se observaron con la mayor concentración de curcumina y los diferentes sobrenadantes sin diferencias significativas en la combinación de ambos factores (Fig 16f).



c



d



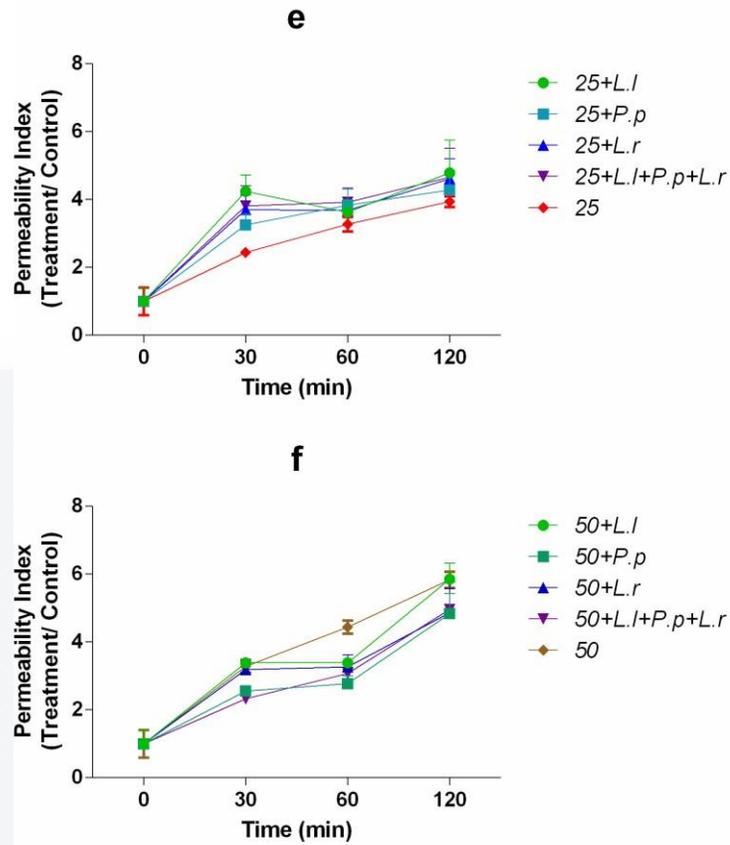


Figura. 16. Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila*. **a.** Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con diferentes concentraciones (μM) de curcumina. **Fig. 16b.** Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con los sobrenadantes de las tres cepas probióticas. **Fig. 16c.** Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con los sobrenadantes de las tres cepas probióticas y curcumina 1 μM . **Fig. 16d.** Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con los sobrenadantes de las tres cepas probióticas y curcumina 10 μM . **Fig. 16e.** Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con los sobrenadantes de las tres cepas probióticas y curcumina 25 μM . **Fig. 16f.** Ensayo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con los sobrenadantes de las tres cepas probióticas y curcumina 50 μM .

6.8. Microscopia electrónica de transmisión

A nivel ultraestructural se observó que tanto los sobrenadantes como la curcumina generaron poros (flecha verde) en la pared de *A. hydrophila* dos horas después, así como vacuolización (asterisco rojo) y lisis celular (triángulo negro) (Fig 17 b, 17c). Sin embargo, no se observó ningún efecto sinérgico con la combinación de curcumina y los sobrenadantes (Fig. 17d) en comparación con el control (Fig 17a). La cuantificación de las células dañadas por campo, expresadas en porcentaje, mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el sobrenadante el que mayor daño ocasiona a *A. hydrophila* (Fig. 18).

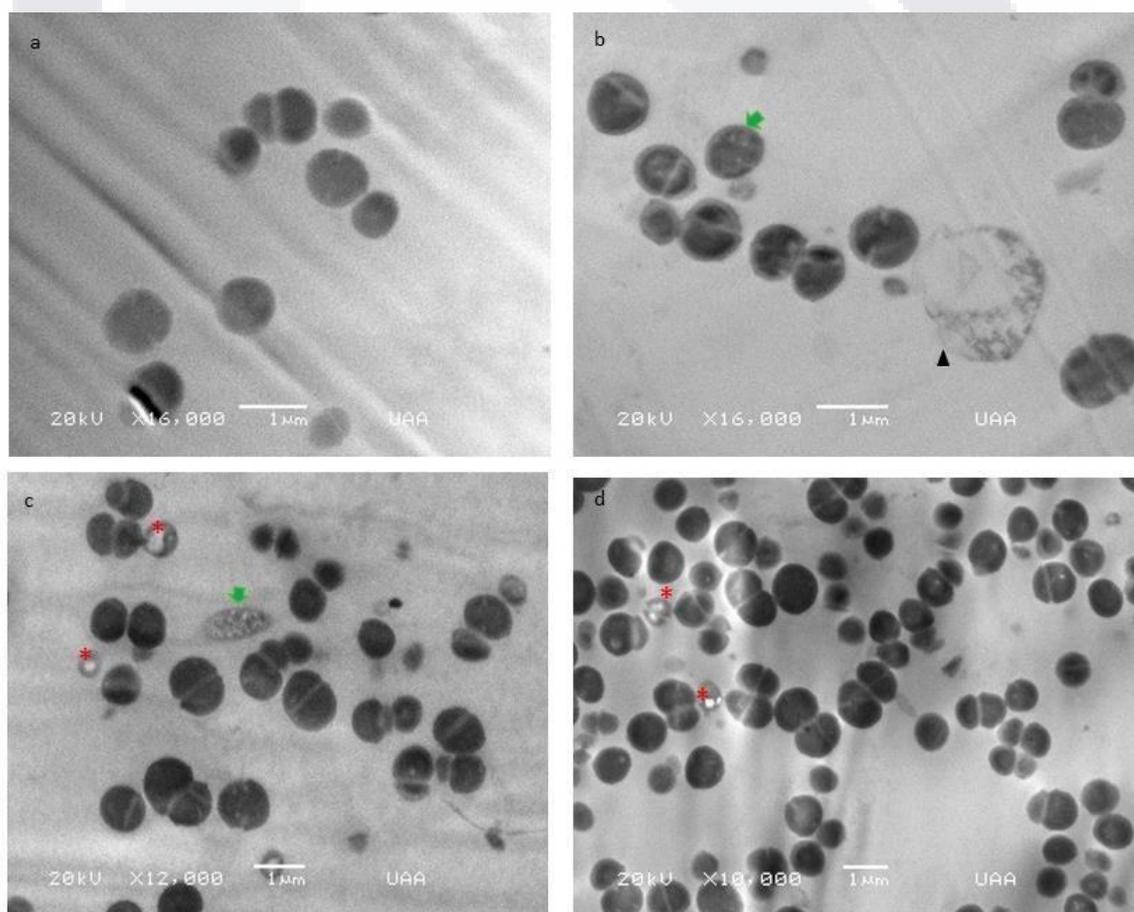


Figura. 17 fotos TEM de *A. hydrophila* a control (sin tratamiento), b bacteriocinas a las dos horas, c curcumina a las dos horas, d interacción bacteriocina + curcumina a las dos horas. Los asteriscos rojos indican

vacuolas en el citoplasma, el triángulo negro indica lisis celular, las flechas verdes indican formación de poros.

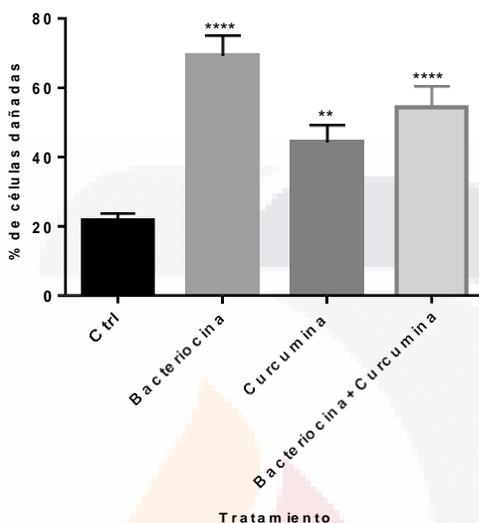


Figura. 18 Porcentaje de células de *A. hydrophila* dañadas por efecto de bacteriocinas, curcumina 50 μ M y la combinación de ambos tratamientos a las dos horas de interacción. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). (P <0,05, n = 10, * significa diferencias significativas).

6.9. Citotoxicidad de la curcumina

En la figura 19 se aprecia una disminución considerable de la viabilidad en las concentraciones más altas de curcumina 50 (27.68 ± 1.60), 100 (28.01 ± 1.70) y 200 (26.51 ± 1.01) μM y estos tratamientos resultaron diferentes al resto ($P=0.0001$). Mientras que las concentraciones 1 y 10 μM representan los mayores porcentajes de viabilidad del epitelio intestinal. El ajuste no lineal de la dosis(logaritmo) -respuesta calculó que la Dosis Letal 50 (DL_{50}) se encuentra en 15.8 μM con una $R^2=0.98$.

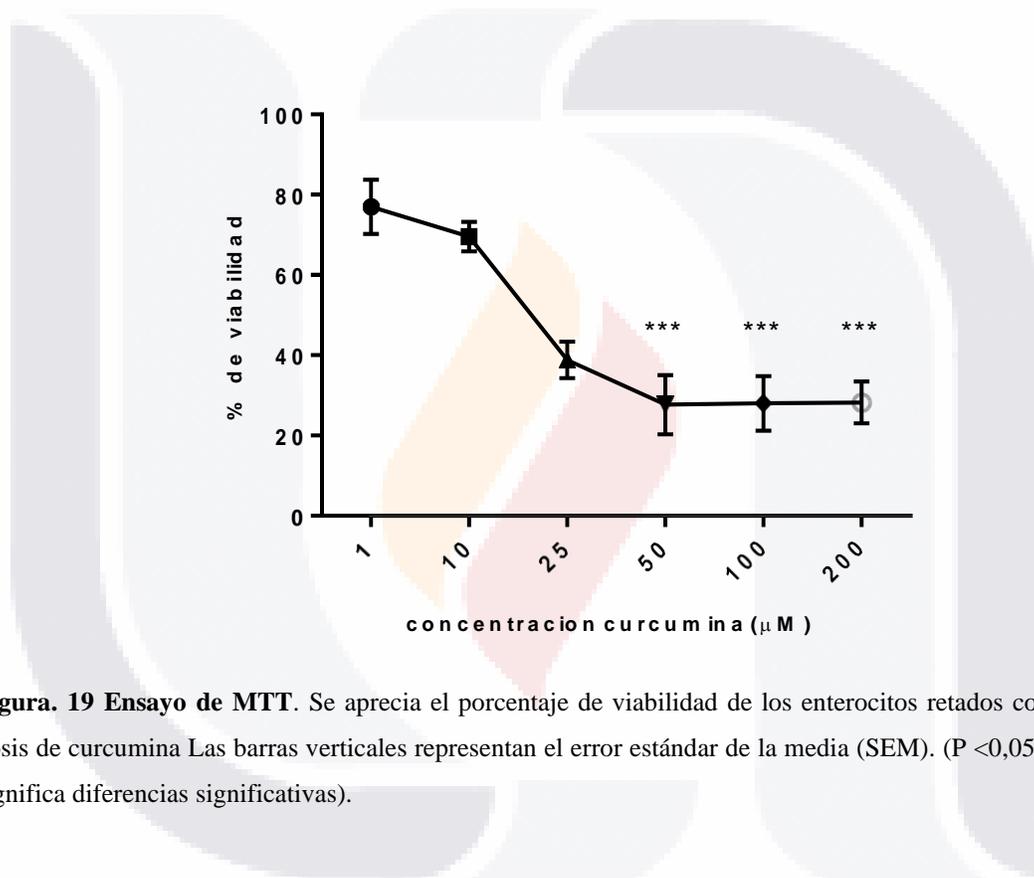


Figura. 19 Ensayo de MTT. Se aprecia el porcentaje de viabilidad de los enterocitos retados con diversas dosis de curcumina Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 15$, * significa diferencias significativas).

6.10. Viabilidad en alimento

Se observó que la viabilidad de bacterias a las 24 horas de la preparación de la mezcla (alimento + probióticos 1×10^9 ufc/gr alimento) se encontraba en una cantidad ligeramente superior a la esperado, mientras que a los siete días hubo un descenso ligero en la viabilidad, sin embargo la concentración se mantuvo en el rango adecuado (Figura 20).

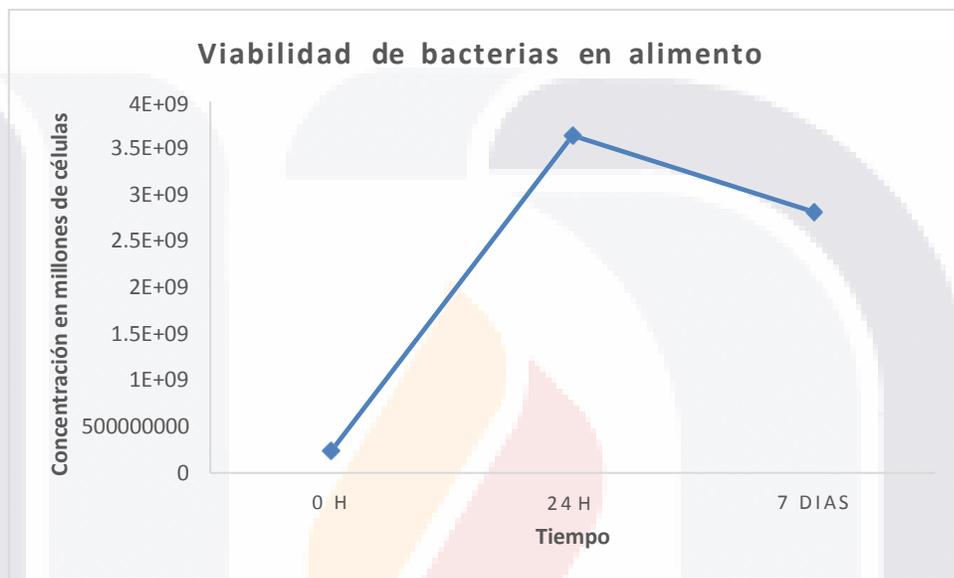


Figura 20. Viabilidad de las cepas en el alimento. Cinética del crecimiento de la combinación de las tres cepas aplicadas sobre el alimento. n=2

6.11. Parámetros productivos

El mejor tratamiento resulto ser probióticos (P=0.0138). con un incremento en el peso de 40 % (± 2.6) más respecto al control en 28 días de tratamiento, mientras que los peces alimentados con dieta adicionada con curcumina ganaron 22 % (± 8.08) sin diferencias significativas en el mismo periodo respecto al control (Fig 21).

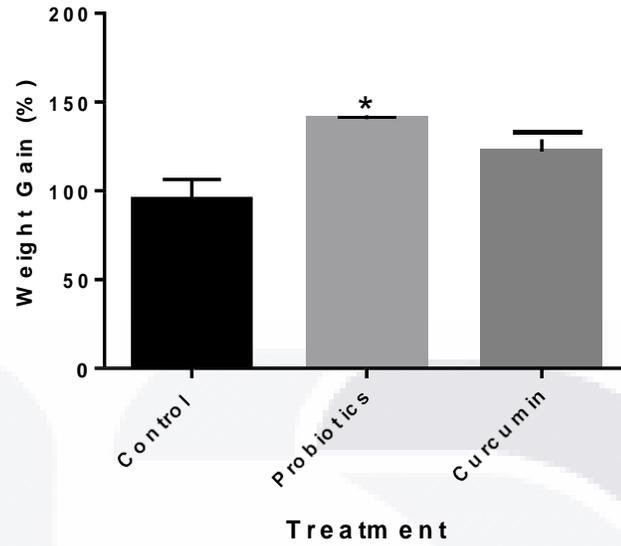


Figura 21. Porcentaje de ganancia de peso a los 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 6$, * significa diferencias significativas).

En lo que respecta a la tasa específica de crecimiento (SGR), el grupo que recibió probióticos presentó un incremento significativo ($P=0.0011$) a los 28 días respecto a los grupos control y curcumina, con un valor de $3.6 \text{ \%/día} \pm 0.32$ (Figura 22).

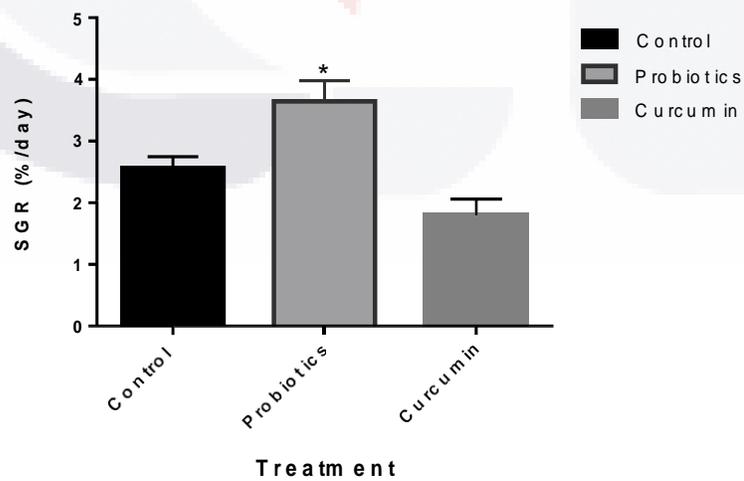


Figura 22. Tasa específica de crecimiento a los 28 días. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 6$, * significa diferencias significativas).

Por su parte, el factor de conversión alimenticia (FCR) presentó una tendencia hacia la baja con diferencia estadística ($P = 0.0203$) en los grupos de probióticos (0.57 ± 0.09) y curcumina (0.52 ± 0.09) y un valor de $1.14 (\pm 0.14)$ para el grupo control (Figura 23).

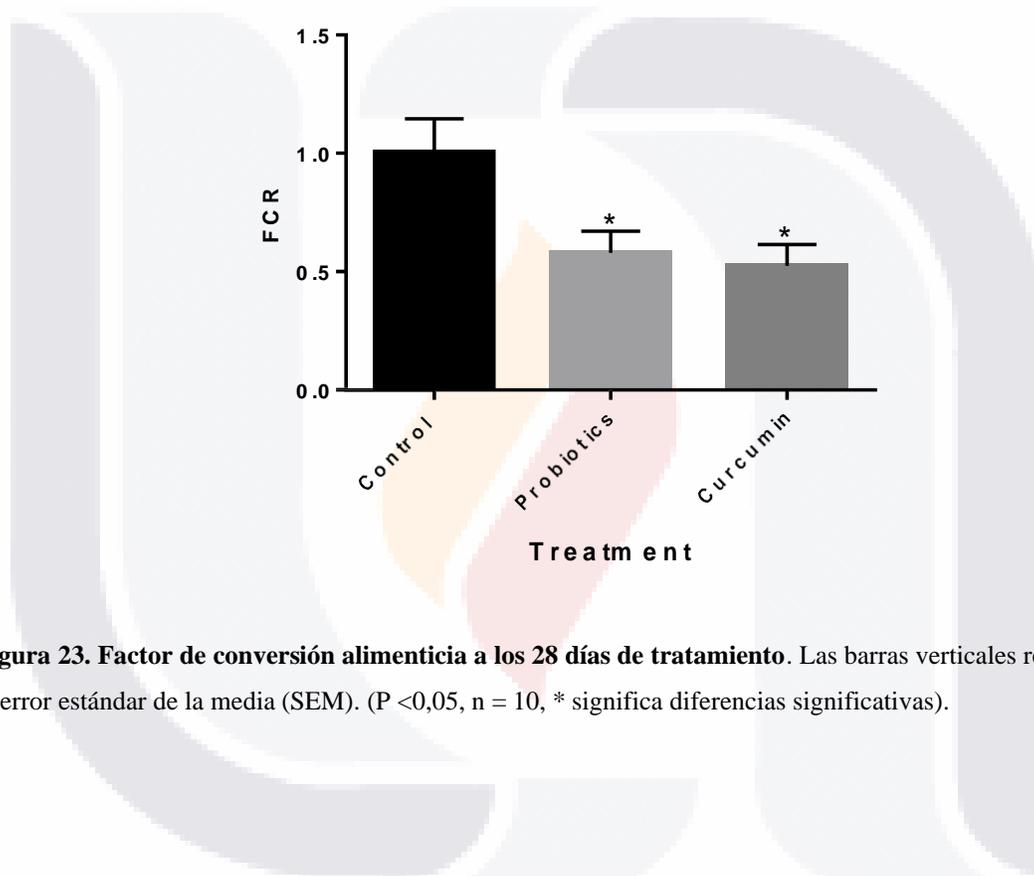


Figura 23. Factor de conversión alimenticia a los 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 10$, * significa diferencias significativas).

6.12. Expresión génica

6.12.1 Intestino

La evaluación de la expresión de los genes relacionados con la inmunidad a las 2 semanas mostró un incremento en la mayoría de los genes evaluados para el tratamiento con curcumina, con excepción de IgM, donde el valor fue más alto en el tratamiento probióticos. Por otra parte, no existieron diferencia significativa entre tratamientos, excepto por la sobreexpresión de Hsp70 para el grupo curcumina (Figura 24).

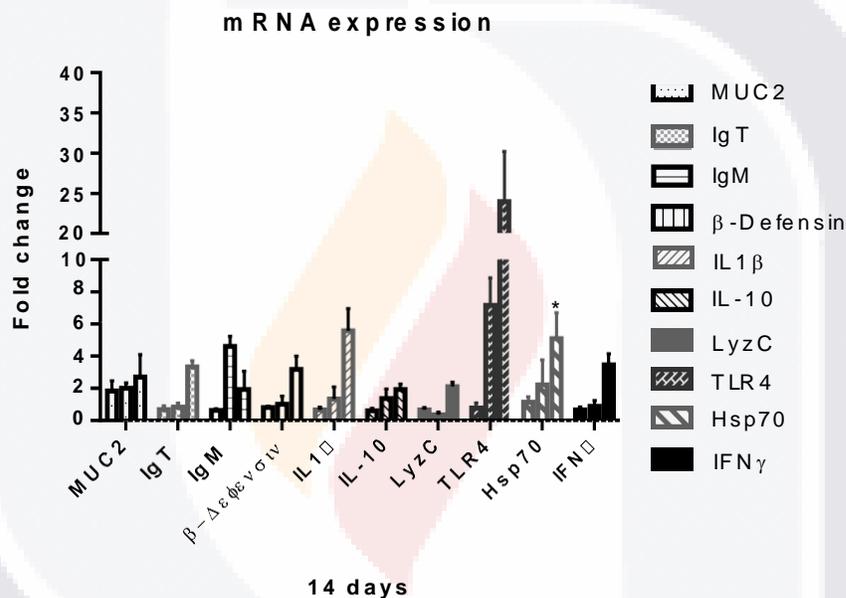


Figura 24. Expresión génica de marcadores de la inmunidad innata en el intestino de tilapia a los 14 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). (P <0,05, n = 4, * significa diferencias significativas).

A las 4semanas se evaluó la expresión de los mismos genes, y se encontró una tendencia al alza en todos los genes de los tratamientos probióticos y curcumina respecto al control con un incremento de 30 veces en la magnitud de la expresión en comparación a los 14 días, con diferencias significativas en los genes: IgT, B-defensin, IL1, IL10, LyzC e IFN gamma,

siendo el mejor tratamiento curcumina. Mientras que Hsp70 no mostró diferencias significativas con expresión cercana al control (Figura 25).

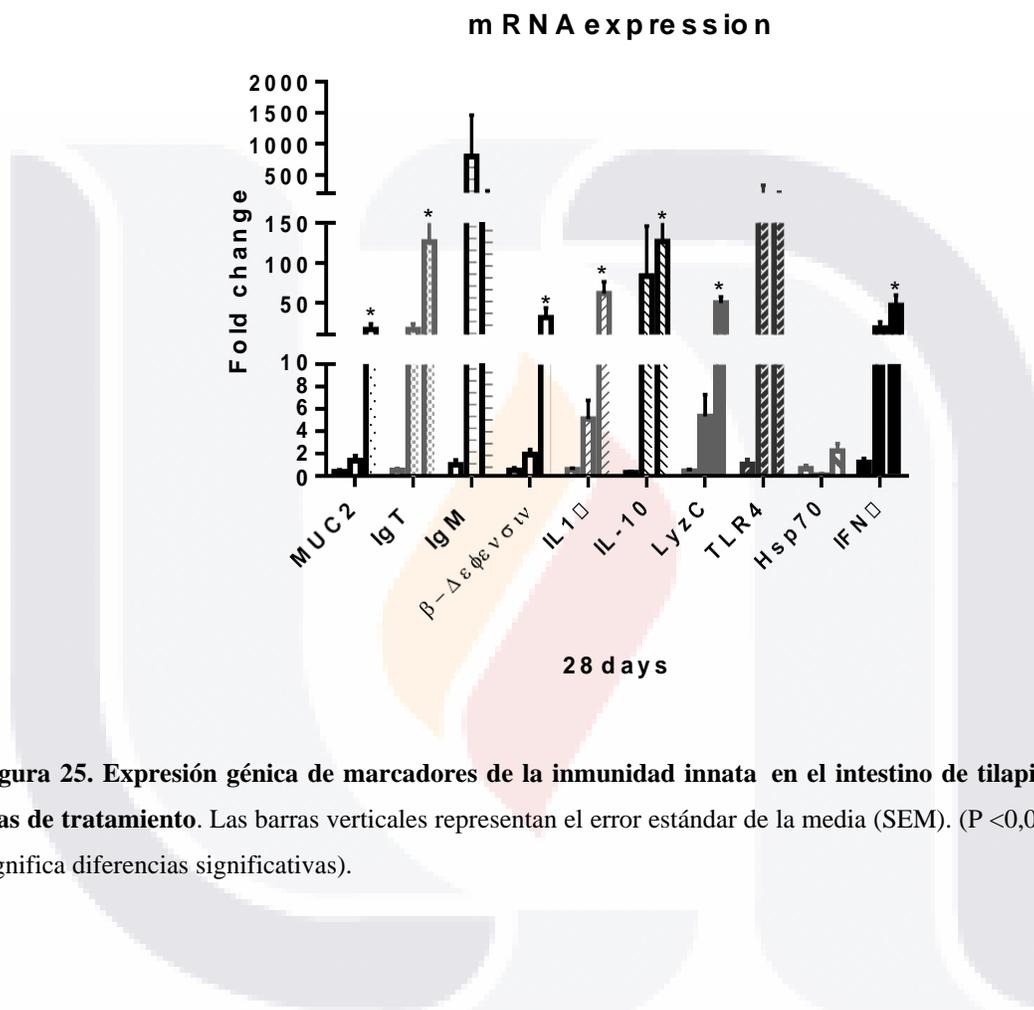


Figura 25. Expresión génica de marcadores de la inmunidad innata en el intestino de tilapia a los 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). (P <0,05, n = 4, * significa diferencias significativas).

6.12.2. Bazo

En lo que respecta a la expresión de los genes relacionados con la modulación de la inmunidad en el bazo de tilapia, en la figura 26, se aprecia que el mejor tratamiento a los 14 días resulto ser la curcumina con una sobreexpresión de todos los marcadores analizados (NFκB, Foxp3, IL-1β, IL10 y IFNγ) durante este periodo la expresión de interleucina 10 se elevó más que la IL-1β. Mientras que, a los 28 días ningún tratamiento fue diferente al control (Figura 27).

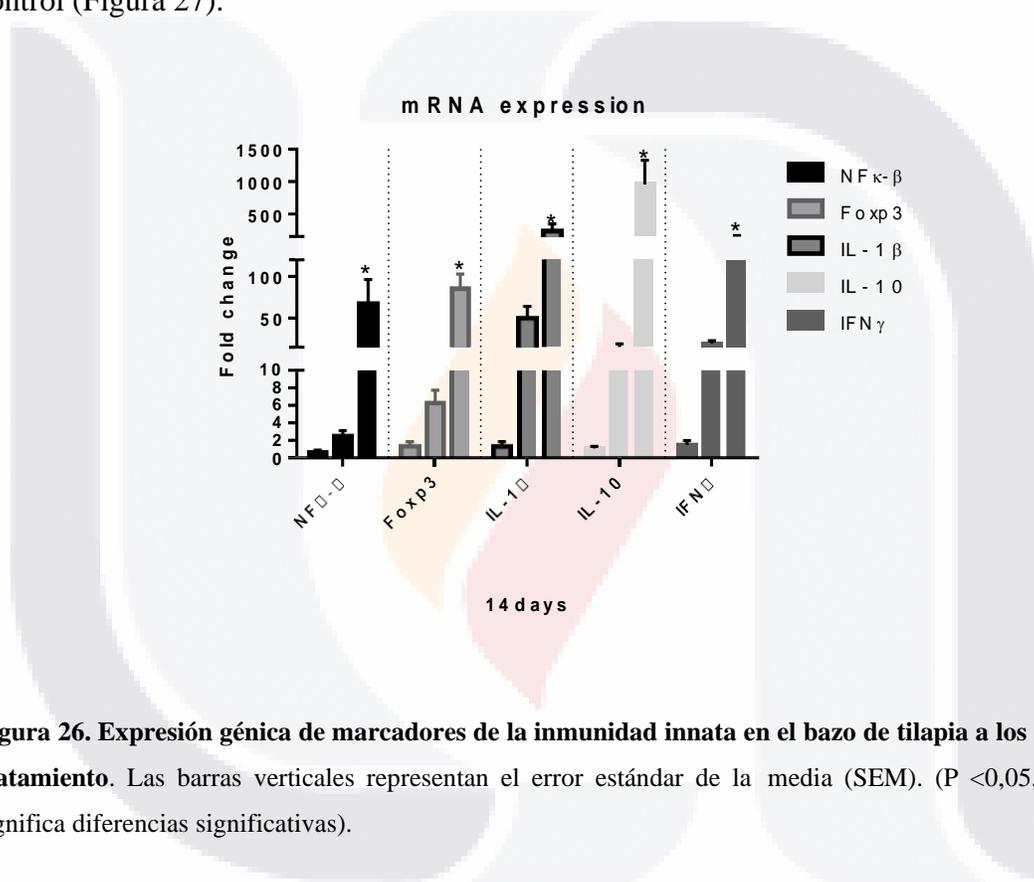


Figura 26. Expresión génica de marcadores de la inmunidad innata en el bazo de tilapia a los 14 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). (P < 0,05, n = 4, * significa diferencias significativas).

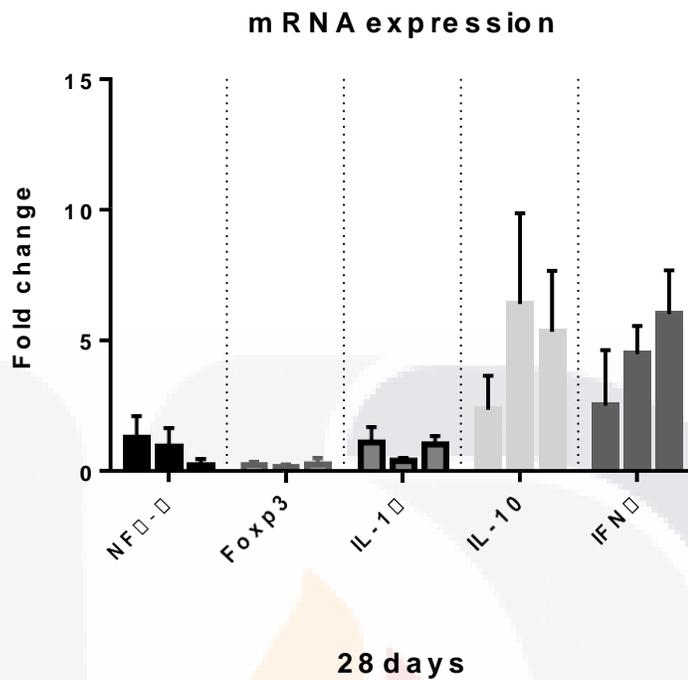


Figura 27. Expresión génica de marcadores de la inmunidad innata en el bazo de tilapia a los 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 4$, * significa diferencias significativas).

6.12.3. Piel

El análisis de la expresión génica de IgM, IgT, β -Def y LyzC en la piel de tilapia observada en la figura 28, muestran que existió un incremento significativo a los 14 días en la expresión solamente de IgM y β -Def en el grupo probióticos. En el grupo curcumina existió una sobreexpresión con alta significancia en todos los marcadores evaluados. A los 28 días se aprecia que los indicadores volvieron al estado basal y no existió diferencias entre tratamientos (Figura 29). Los patrones de expresión de los genes relacionados con la inmunidad en nuestros experimentos sugieren que la estimulación intestinal por probióticos y curcumina tiene un efecto benéfico en la piel y el bazo de la tilapia, de tal forma que el pez es capaz de montar una rápida respuesta inmune. En cambio, la respuesta inmune del intestino se efectuó de forma lenta en comparación con la de piel y el bazo.

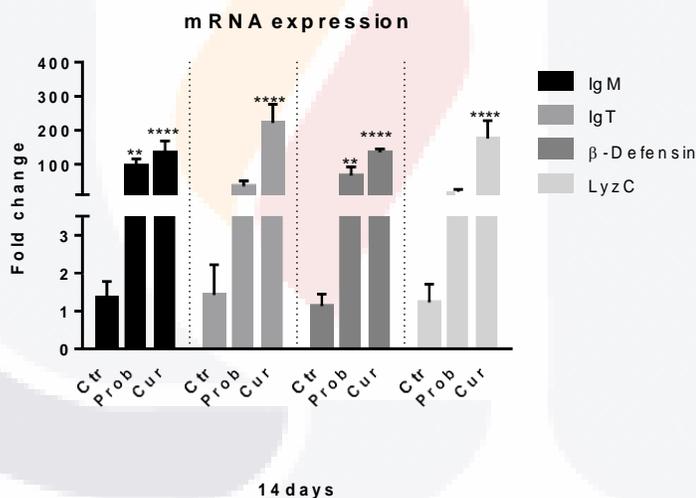


Figura 28. Expresión génica de marcadores de la inmunidad innata en la piel de tilapia a los 14 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). (P <0,05, n = 4, * significa diferencias significativas).

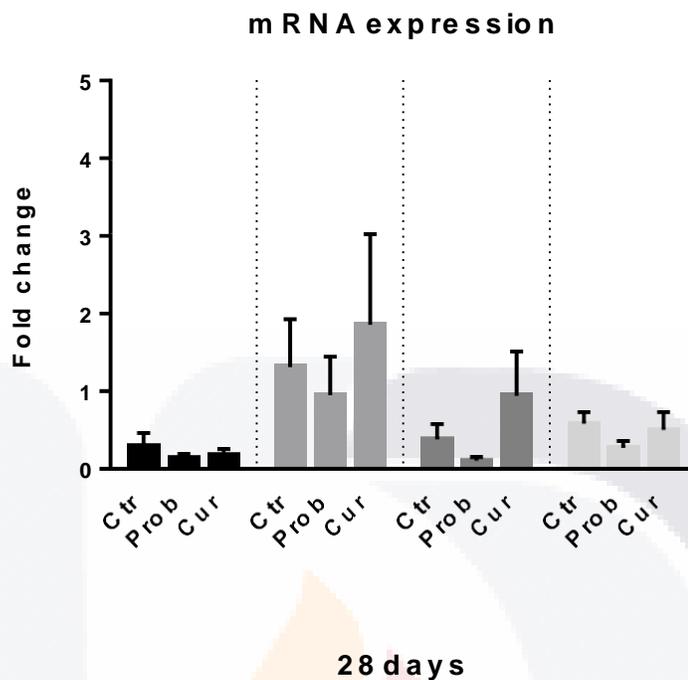


Figura 29. Expresión génica de marcadores de la inmunidad innata en la piel de tilapia a los 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 4$, * significa diferencias significativas).

6.13. Análisis histológico

6.13.1. Intestino

Con la tinción H-E no se observaron leucocitos intraepiteliales, zonas eosinófilas ni vacuolas citoplasmáticas en ninguno de los tratamientos. También se evaluó el área de las células caliciformes, así como el ancho y largo de las criptas sin diferencias entre tratamientos. La tinción AB-PAS demostró que los probióticos a los 14 y 28 días (Figura 31) aumentaron el número de células de Goblet (CG) por cripta, mientras que curcumina (Figura 32) y el control (Figura 30) se mantuvieron sin cambios en el tiempo. También se puede apreciar en todos los tratamientos, que las mucinas neutras (PAS+) fueron las más abundantes, distinguibles por su coloración magenta. Mientras que, en una cantidad muy escasa se observaron algunas células de coloración púrpura (AB+/PAS+), las mucinas ácidas (AB+) coloreadas de azul estuvieron ausentes.

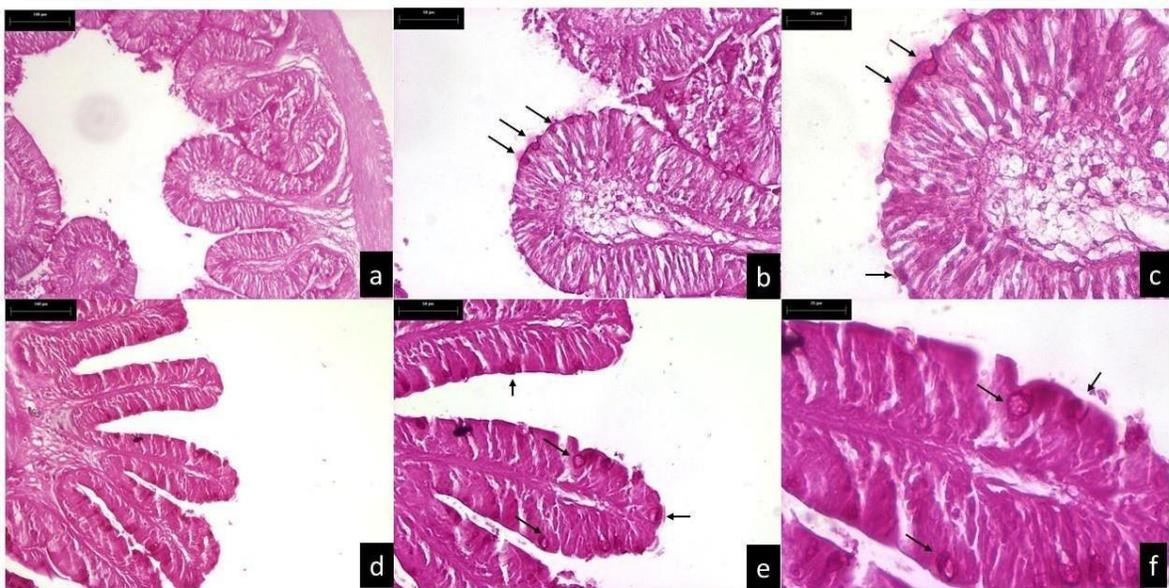


Figura 30. Tinción AB-PAS del grupo control a los 14 y 28 días, donde se aprecian en color magenta (señaladas con flecha) las células Goblet productoras de mucina. a y d) 10x, b y e) 20x y c y f) 40x

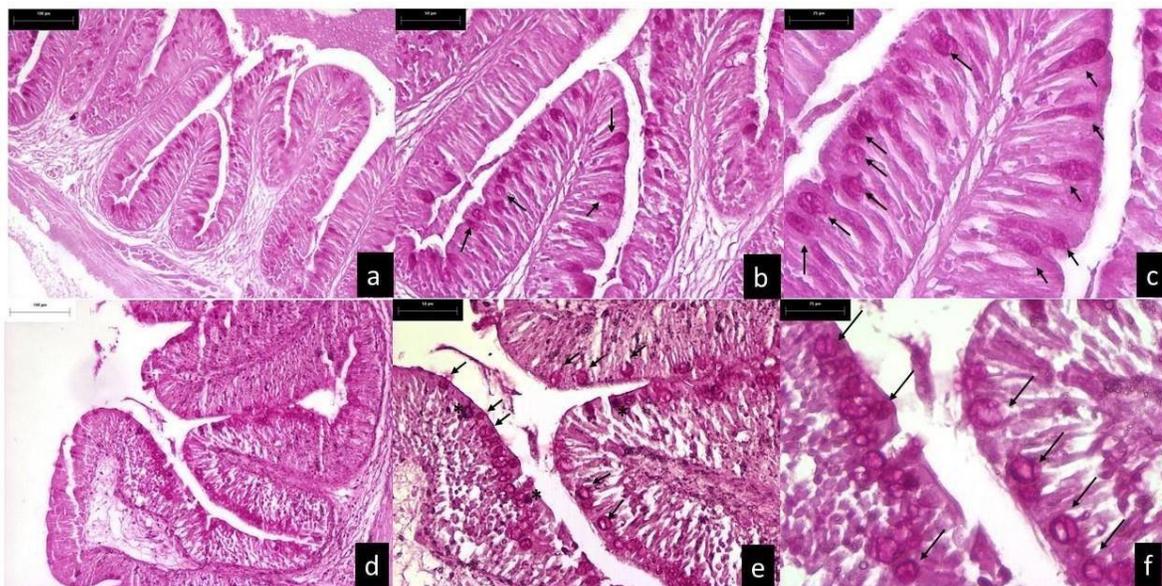


Figura 31. Tinción AB-PAS del grupo probióticos a los 14 y 28 días, donde se aprecian en color magenta (señaladas con flecha) y algunas color púrpura (señaladas con asterisco) las células Goblet productoras de mucina a y d) 10x, b y e) 20x y c y f) 40x.



Figura 32. Tinción AB-PAS del grupo curcumina a los 14 y 28 días, donde se aprecian en color magenta (señaladas con flecha) las células Goblet productoras de mucina. a y d) 10x, b y e) 20x y c y f) 40x .

Sin importar la coloración, las células productoras de mucina fueron contabilizadas (Figura 33) y se observó que el mejor tratamiento estadístico ($P=0.001$) resultó ser el grupo probióticos a los 28 días (25.66 ± 5.13 GC/crypta).

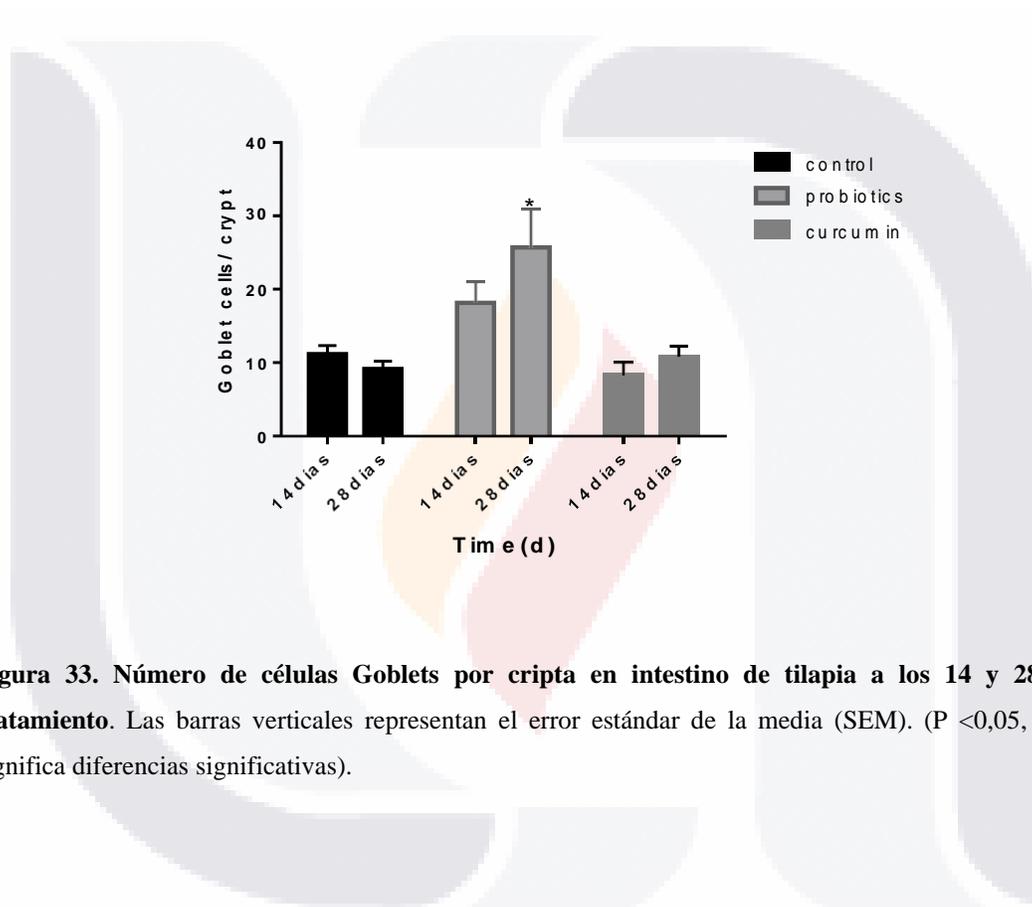


Figura 33. Número de células Goblets por cripta en intestino de tilapia a los 14 y 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 10$, * significa diferencias significativas).

6.13.2. Bazo

El hallazgo más relevante en el bazo fue el incremento de tamaño de los centros melanomacrófagos (CMM) en los grupos curcumina y probióticos respecto al control. En el grupo probióticos también se aprecia que los CMM se encontraron difusos entre la pulpa roja y blanca, abarcando un área mayor a la que se aprecia en control y curcumina (Figura 34).

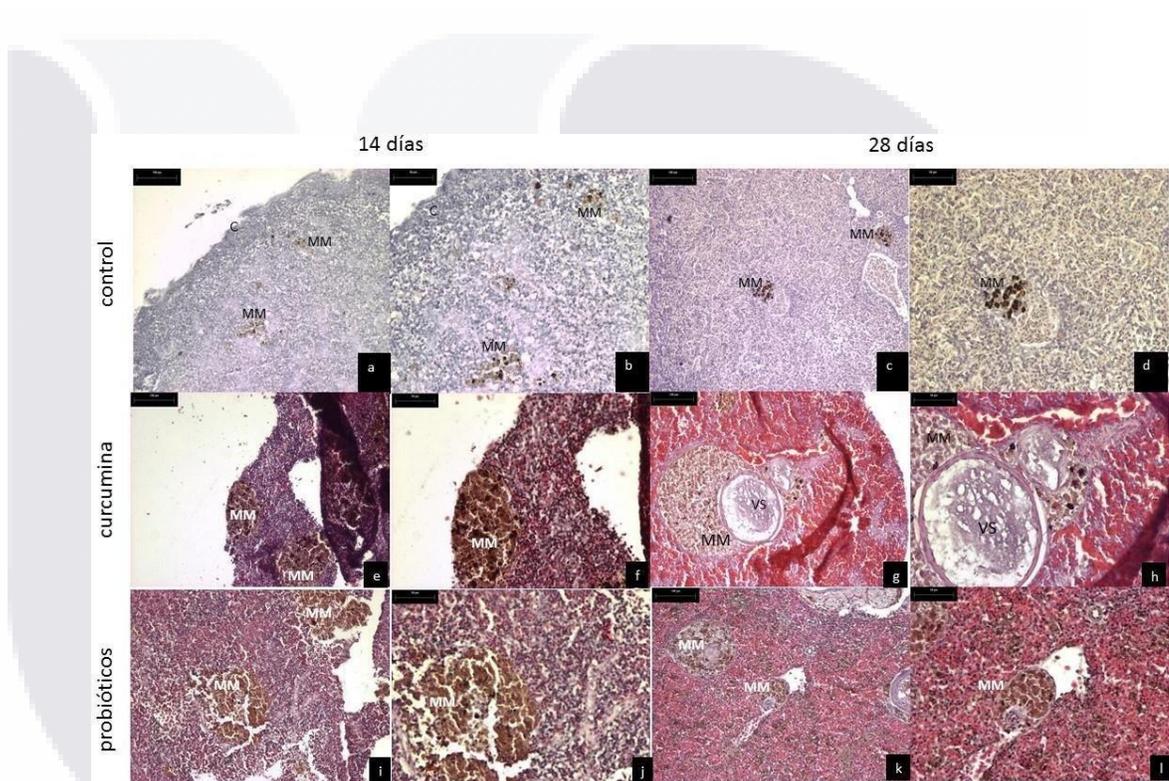


Figura 34. Tinción H-E del bazo a,c,e,g, i, k (10x) b,d,f,h,j,l (20X). MM: centro melanomacrófagos, VS: vaso sanguíneo

6.14. Estimulación de leucocitos

6.14.1. Estallido respiratorio

La explosión respiratoria presentó un incremento significativo ($P=0.015$) en el grupo alimentado con probióticos con a los 14 días (0.25 ± 0.03) y a los 28 días (0.51 ± 0.13), mientras que el grupo curcumina no presentó diferencias significativas respecto al control (Figura 35).

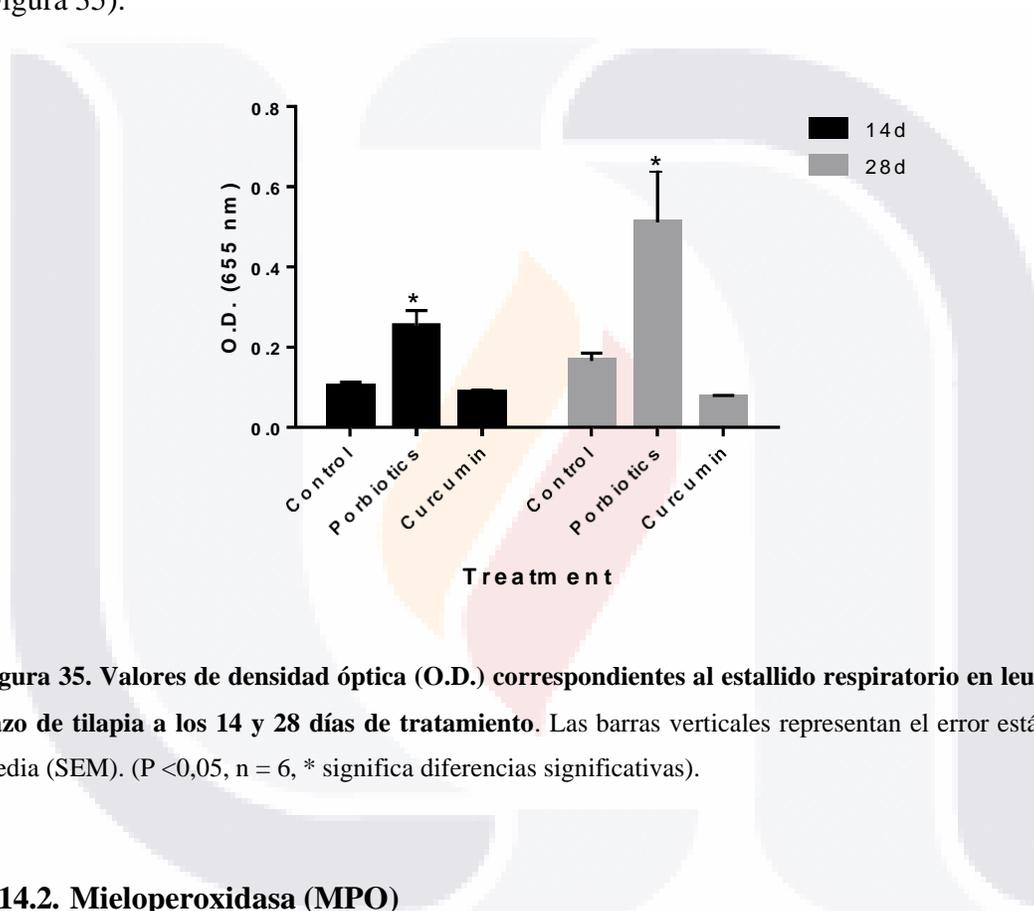


Figura 35. Valores de densidad óptica (O.D.) correspondientes al estallido respiratorio en leucocitos de bazo de tilapia a los 14 y 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). ($P < 0,05$, $n = 6$, * significa diferencias significativas).

6.14.2. Mieloperoxidasa (MPO)

Se observó que el grupo de probióticos (0.19 ± 0.05) a los y 28 días tiene una tendencia significativa ($P=0.031$) al alza en el valor de la mieloperoxidasa respecto a los otros grupos (Figura 36).

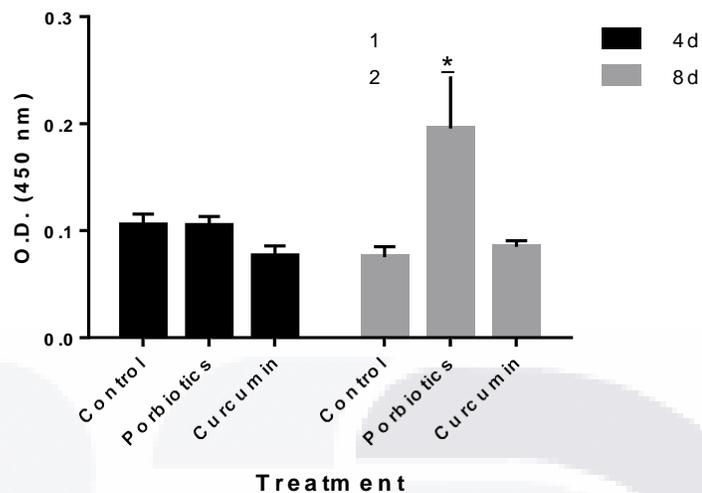


Figura 36. Valores de densidad óptica (O.D.) correspondientes a la mieloperoxidasa en leucocitos de bazo de tilapia a los 14 y 28 días de tratamiento. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). (P <0,05, n = 6, * significa diferencias significativas).

6.14.3. Fagocitosis

Según la cantidad relativa de bacterias fagocitadas se aprecia que el grupo probióticos a los 14 días presento leucocitos con mayor ingesta de bacterias (+++), mientras que curcumina presento una ingesta moderada (++) similar a la observada en el grupo control. A los 28 días se observó que la fagocitosis disminuyo drásticamente en el grupo probióticos, mientras que en el grupo curcumina parece mantenerse sin cambios en el tiempo al igual que el grupo control (Figura 37).

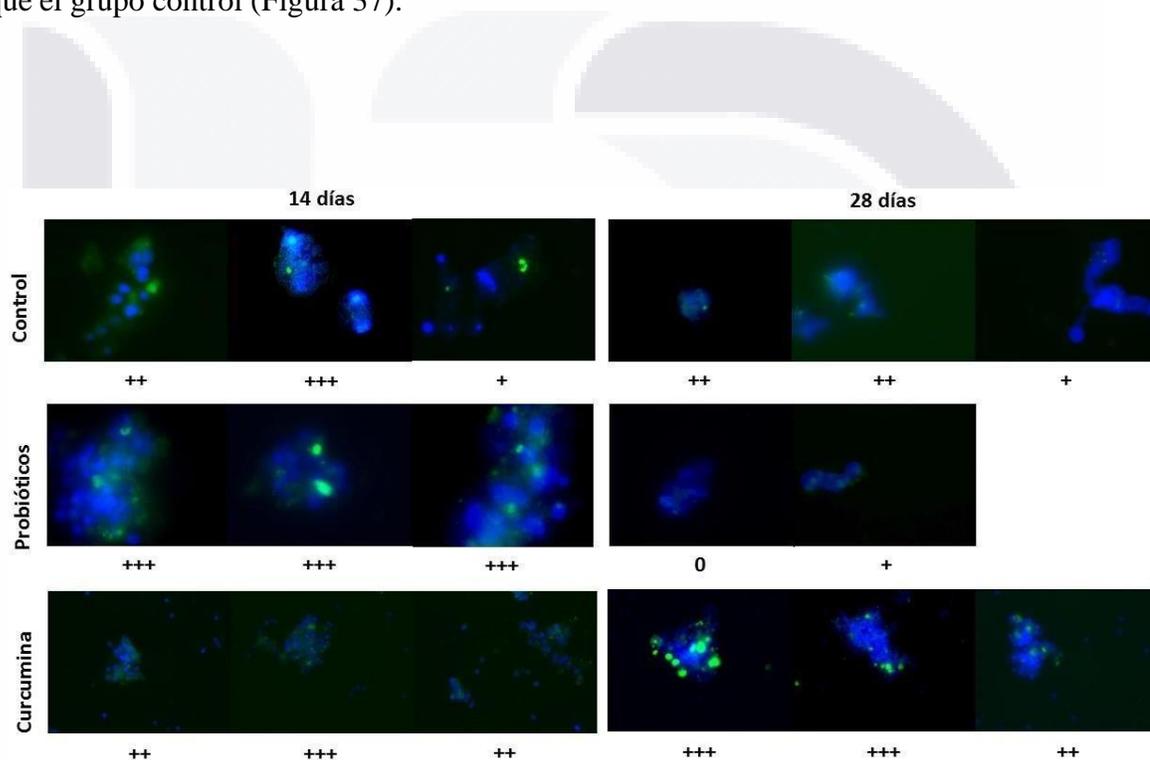


Figura 37. Fotografías del merge de la fagocitosis. fluorescencia del núcleo de los leucocitos (en azul) teñidos con Hoescht y *Aeromonas hydrophila* (en verde) teñidas con fluoresceína. 0=negativo, + poca ingesta, ++ ingesta moderada y +++ ingesta alta. n=3.

7. DISCUSIÓN

7.1. Antagonismo

El método de difusión del tapón de agar se usa a menudo para resaltar el antagonismo entre microorganismos (Balouiri et al., 2016). La capacidad antagonista de las bacterias ácido-lácticas es un factor importante en la evaluación de los probióticos. La capacidad antagonista incluye la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (Choi et al., 2018). En este estudio se demostró que, las secreciones producidas por cada una de las cepas no inhibieron el crecimiento de las otras, por lo que se concluyó que las tres cepas pueden coexistir. Esta condición, favorece la aplicación de estas cepas en combinación.

7.2. Crecimiento a diferente pH

Con los experimentos realizados *in vitro*, se demostró que ninguna de las cepas sobrevive a pH 2, mientras que a pH 4 solo *L. lactis* y *L. rhamnosus* lograron sobrevivir. En cambio, las tres cepas presentaron alta viabilidad en pH 6 y 8. Este patrón de crecimiento concuerda con las condiciones fisiológicas en el intestino de la tilapia, donde el pH del estómago varía con el grado de plenitud y, cuando está lleno, puede ser tan bajo como 1.4. La digestión enzimática se produce en el intestino, donde el pH aumenta progresivamente desde 5,5 a la salida del estómago hasta 8 cerca del ano (FAO, 2020). Es importante resaltar que, este estudio incluyó experimentos *in vivo*, donde el alimento fue mezclado con las dosis de probióticos y CMC como aglutinante. Ebrahimi et al. (2018) demostraron que la película CMC no afectó la viabilidad de *L. rhamnosus* y otras cepas de probióticos y concluyeron que la incorporación de algunas cepas probióticas en cubiertas y películas comestibles es un vehículo adecuado para su conservación.

7.3. Adherencia a mucus

Una de las propiedades más importantes de una cepa con potencial como probióticos es la capacidad para adherirse a la mucosa y a las células epiteliales (Plaza-diaz et al., 2014 y Maldonado Galdeano et al., 2019). El mecanismo de adherencia de los probióticos aún está

bajo investigación, pero se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* 299v exhibe una adhesión específica a manosa mediante la cual puede adherirse a las células colónicas humanas (Hemaiswarya, 2013). La competencia de los probióticos con las bacterias patógenas por la adhesión a los receptores es considerada como el primer efecto benéfico de los probiótico, reduciendo así la capacidad de los patógenos (Hai, 2015).

7.4. SDS-PAGE

Con la electroforesis realizada se demostró la presencia de proteínas de bajo peso molecular menor a 10 kDa correspondientes a bacteriocinas secretadas por cada una de las cepas evaluadas. Según Abts et al., (2011) la nisina aislada de *L. lactis* NZ9700 tiene un peso de ~6 kDa. Se sabe que *P. acidilactici* secreta el péptido pediocina *AcH/PA1* con un peso de 4,6 kDa (Oscáriz & Pisabarro, 2001). El género *Lactobacillus* secreta bacteriocinas de 3-6 kDa (Nilsen et al., 2020). Nuestros hallazgos confirmaron que las proteínas secretadas por las cepas probióticas seleccionadas corresponden a las bacteriocinas, (Jamuna & Jeevaratnam (2004) demostraron que la autenticidad de las pediocinas purificadas como bacteriocinas fue confirmada por la zona inhibidora observada cuando el gel se superpuso a la mitad con *S. aureus* como la cepa indicadora. Millette et al. (2007) demostraron actividades inhibitorias para sobrenadantes de *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici* como zonas claras de inhibición entre 3,5 y 6 kDa después de que los geles se cubrieron con *Lact. sakei* sembrado en el agar. Resultados similares fueron informados por Batdorj et al. (2006) con la parte superpuesta del gel muestra que las dos fracciones son activas frente a *Lact. bulgaricus* 340.

7.5. Inhibición del crecimiento

La cepa de *Bacillus spp* FC6. aislada de *Labeo calbasu* redujo el crecimiento de *A. hydrophila* con valor de de 0.7 D.O. (600 nm) a las 15 horas de incubación (Kavitha et al., 2018). Este resultado es similar al obtenido con los tres sobrenadantes de los probióticos seleccionados en este estudio, donde se obtuvieron lecturas de 0.8 D.O. (600 nm) a las 12 horas de incubación. Este efecto inhibitor se debe a la acción individual o en conjunto de las bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno (Benhamed et al., 2014). Respecto a la utilización de curcumina en la inhibición del crecimiento bacteriano, nuestros

resultados representan un decrecimiento mayor a la reportada por Raorane et al. (2019) para *Acinetobacter baumannii* a las 24 horas de incubación con 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de curcumina con un valor de 3 D.O. (600nm), mientras que en nuestros resultados obtuvimos valores cercanos a 1 D.O. (600 nm) con la curcumina en concentraciones de 10 y 25 μM . Se sabe que, curcumina tiene el potencial de inhibir la división celular bacteriana al unirse directamente con la proteína FtsZ (Gurnani et al., 2016). Esta proteína del citoesqueleto bacteriano es esencial en la división celular y es el equivalente a la tubulina de eucariotas (Jackson Buss, Carla Coltharp, Tao Huang, Chris Pohlmeier, Shih-Chin Wang, Christine Hatem, 2013). En cuanto a la combinación de curcumina con los diferentes sobrenadantes, no se observó un patrón en los datos que demuestre sinergia entre ambos compuestos, ya que los valores de densidad óptica obtenidos se encuentran cercanos a 1 D.O (600nm) parecidos a los obtenidos con curcumina y bacteriocinas solas.

7.6. Inhibición del biofilm

En los ambientes acuáticos, la formación de biofilm facilita a las bacterias sobrevivir y contaminar el ambiente entero, esto expone fácilmente a los animales al patógeno (Packiavathy et al.,2013). En un estudio se reporta una inhibición del biofilm de *A. hydrophila* con un efecto dosis dependiente (16-128 $\mu\text{g/mL}$) con una inhibición entre 88-93% con la concentración más alta de curcumina (Tanhay Mangoudehi et al., 2020), lo cual es superior al porcentaje obtenido en nuestra investigación, sin embargo, las concentraciones seleccionadas para nuestro estudio se encuentran muy por debajo de las utilizadas por los autores citados. Por otra parte, otros estudios, (Raorane et al., 2019) mencionan que dosis bajas de curcumina puede inhibir el biofilm de *A. baumannii*. Así mismo, otros reportes indican que concentraciones de 25 μM (equivalentes a 9.21 $\mu\text{g/mL}$) de curcumina mataron el 50% de *S. aureus* después de 2 h. de incubación (Teow et al., 2016); este patrón coincide con nuestros hallazgos. Recientemente se descubrió que la curcumina a concentraciones de 32 $\mu\text{g/mL}$ reduce la expresión de los genes *ahyI* y *ahyR* relacionados con el *Quorum Sensing* de *A. hydrophila* aislada en peces (Mangoudehi y col.,2020). Por otra parte, existe poca información sobre la aplicación de los sobrenadantes de los probióticos para la inhibición de biopelículas de patógenos. Uno de los estudios más relevantes, menciona que, el sobrenadante libre de células producido por *Lactobacillus*

fermentus inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* y redujo en un 64 % la formación de biopelícula de este patógeno (Shokri et al., 2018). Estos datos son similares a los obtenidos en nuestro estudio para la inhibición de biopelícula de *A. hydrophila* por los sobrenadantes libre de células secretados por las tres cepas probióticas. Sin embargo, la combinación de los sobrenadantes de las tres cepas no mostró efecto sinérgico y su efecto en la inhibición del biofilm no fue diferente a la de los sobrenadantes por separado. Por otra parte, la información sobre la actividad antimicrobiana y antibiofilm de la combinación de secreciones de probióticos y fitoquímicos es escasa. En el estudio más relevante que hay, los autores (Sharma et al., 2020) demostraron que la combinación: 37 µg/mL de bacteriocina GAM217 (similar a nisina) , 25 µg/mL curcumina y 125 µg/mL de cinnamaldehido resultó el mejor tratamiento en la inhibición del biofilm de *S. epidermidis* y *E. coli* resistente a medicamentos, los autores señalan que se requirió ocho veces menos concentración de los tres compuestos en sinergia para lograr una mayor inhibición respecto a la concentración de los compuestos por sí solos, con un 80% de inhibición del biofilm. Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestra investigación, donde se logró una inhibición ligeramente superior del 60% con la aplicación de los sobrenadantes bacterianos solos en comparación con el 50% de inhibición de biopelícula de *A. hydrophila* en los tratamientos combinados. Es importante señalar que, en estudios de los sedimentos de estanques de carpa, se encontró que la máxima concentración de *A. hydrophila* fue de 3.11×10^2 UFC/ml (Zdanowicz et al., 2020) . Por lo que, nuestros resultados obtenidos con concentraciones más altas de inóculo tienen potencial para sustituir el uso de antibiótico

7.7. Permeabilidad de membrana

Nuestros ensayos con SYTOX green demostraron que, existe un incremento significativo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con curcumina 50 µM a las dos horas de incubación, este incremento fue seis veces mayor al control, mientras que el incremento en los tratamientos con sobrenadantes fue cinco veces mayor al control. Estos hallazgos son similares a los reportados por Tyagi et al (2015), quienes encontraron incremento de la fluorescencia en *S. aureus* por citometría de flujo a las dos horas de interacción con curcumina, este incremento indica la entrada de yoduro de propidio a la bacteria a través de la ruptura de la membrana como resultado del tratamiento. El porcentaje de células teñidas

fue cercano al 100% en los tratamientos con curcumina 25, 50 y 100 μM y del 57% para el tratamiento con nisin 3 μM . Desde hace tiempo la curcumina es utilizada como tratamiento terapéutico contra bacterias patógenas gram positivas y gram negativas (Raorane y col. 2019). Sin embargo, el modo de acción de la curcumina a nivel molecular no ha sido del todo resuelto, pero las evidencias existentes, sugieren que funciona causando daño en las membranas bacterianas; como lo demostraron los experimentos realizados por Tyagi et al (2015), quienes encontraron que la curcumina causó permeabilización de las membranas de *S. aureus* y *E. coli* a pesar de sus propiedades de pared celular significativamente diferentes. Por otra parte, se sabe que, las bacteriocinas matan a las células susceptibles, través de la formación de poros, despolarizando y permeando la membrana (O. Gillor, A. Etzion, 2008). Esto se debe a que, la mayoría de las bacteriocinas ejercen su efecto antibacteriano al permeabilizar la membrana de la célula blanco, haciendo que las células no sean viables (Abee 1995; Moll et al. 1998). Además de dañar las membranas celulares, también se ha informado que algunas bacteriocinas causan bacteriólisis (Daeschel et al. 1993; Kok et al. 1993).

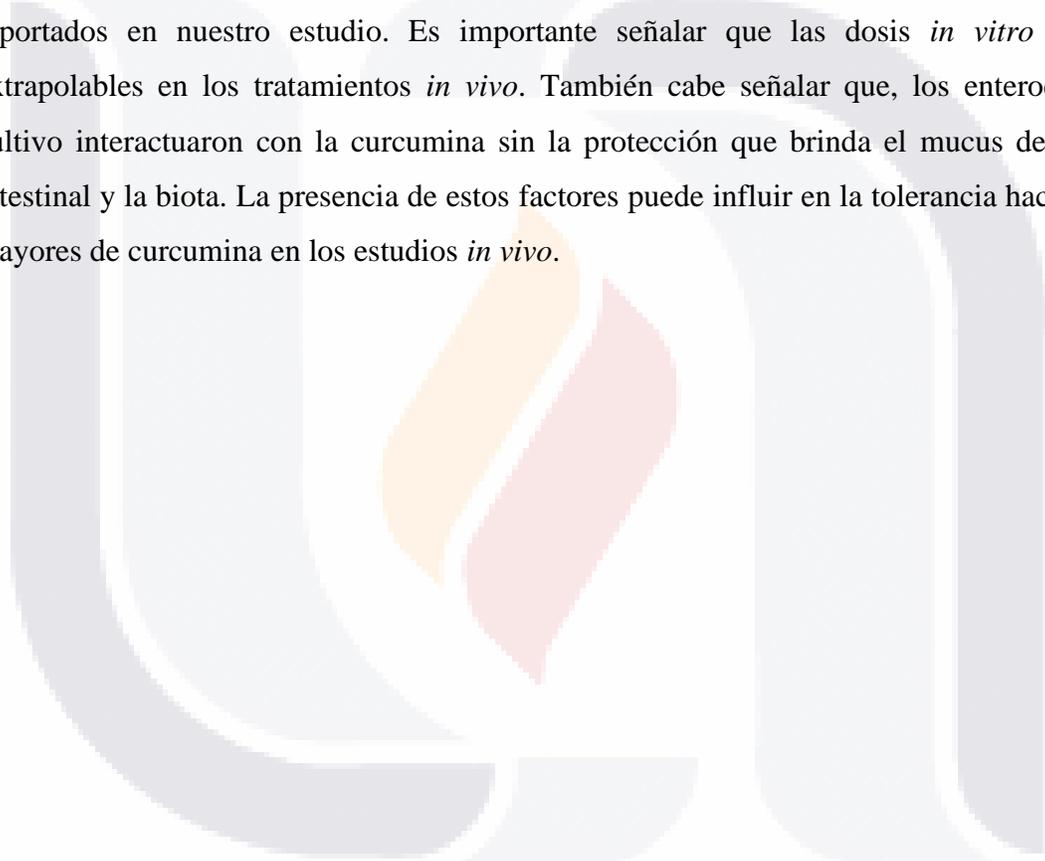
7.8. Microscopia electrónica de transmisión

El presente estudio reveló la acción de las bacteriocinas de las tres cepas en la permeabilización de *A. hydrophila*, a través de la microscopia electrónica de transmisión se comprobó la formación de poros en la membrana bacteriana, también se observaron vacuolas en el citoplasma y lisis. Nuestros hallazgos coinciden con los reportados por X. Zhang et al. (2016) quienes utilizaron microscopía electrónica de transmisión para demostrar el daño de la membrana de *L. plantarum pl2* después de 30 min de exposición a 8 μM por la bacteriocina sintética PlnEF y observaron la formación de canales y ruptura de la membrana, en comparación con la superficie lisa de las células de control, en ambos grupos encontraron la formación de mesosomas, pero PlnEF indujo mayor número de mesosomas en comparación al control. Los mesosomas pueden ser producidos por la fijación de tetróxido de osmio durante la preparación de la muestra para TEM (Silva et al., 1976), o inducidos por péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas (Gonzalez et al., 1996) (Bendali et al., 2008). En un trabajo anterior, se demostró el mecanismo de acción de la bacteriocina lacticina 3147, producida por *L. lactis* IFPL105. Primero, la viabilidad se

pierde debido a la inserción de la bacteriocina en la membrana de las células sensibles y al agotamiento de la energía celular. En segundo lugar, la disipación de la fuerza motriz del protón promueve una mayor degradación descontrolada de la pared celular por las autolisinas (Martínez-Cuesta et al. 2000). Las bacteriocinas catiónicas interactúan con la membrana aniónica a través de la atracción electrostática (Dathe & Wieprecht, 1999). Después de eso, las bacteriocinas permeabilizan la membrana citoplasmática, que se creía que era un paso crítico en la acción antimicrobiana de muchas bacteriocinas (Hancock & Rozek, 2002). La evidencia colectada por medio de microscopia electrónica de transmisión en nuestros experimentos demostró la formación de poros en la membrana y vacuolas en el citoplasma de *A. hydrophila* a las 2 horas de interacción con curcumina 50 μM . Resultados similares fueron reportado por Tyagi et al (2015), utilizando microscopia electrónica de barrido demostraron cambios morfológicos que incluyen rugosidad superficial, depresión y formación de abolladuras. en *S. aureus* a las 2 horas de exposición a curcumina en dosis bajas, mientras que la incubación a la dosis más alta provocó la fuga de material celular y el estallido de las células. Las técnicas implementadas en este estudio demostraron la efectividad de los sobrenadantes de probióticos y curcumina por separado en la inhibición del crecimiento, inhibición del biofilm y permeabilización de la pared de *A. hydrophila*. Sin embargo, nuestros ensayos aportan evidencia que no existió sinergia entre ambos tratamientos. Este efecto puede deberse a una interacción electrostática entre las bacteriocinas y la curcumina causado por las propiedades químicas de ambas moléculas. Se sabe que, la combinación de interacciones hidrofóbicas, múltiples enlaces de hidrógeno, quelación de metales y enlaces covalentes, distribuidas en toda la molécula, confiere a la curcumina muchos mecanismos posibles para interactuar con las proteínas diana (Gupta et al., 2011). Concretamente, la curcumina se une covalentemente a los nucleófilos sulfhidrilos de cisteína y la seleno-cisteína (Gupta et al., 2011). Por su parte, las bacteriocinas poseen puentes disulfuro formados entre los grupos tiol de la cisteína, en estos péptidos este tipo de puentes confieren la actividad biológica (Furci & Secchi, 2018).

7.9. Citotoxicidad de curcumina

Existe pocos estudios *in vitro* sobre la toxicidad de la curcumina en peces. Estudios *in vivo* demostraron que 100 mg/Kg de curcumina no causo daño hepático en *Astyanax aff. bimaculatus* (de Moraes França Ferreira et al., 2017). Nuestros resultados muestran que 5.8 µg/ml (15.8µM) matan al 50% de los enterocitos de tilapia en cultivo. Estudios en las líneas celulares de cáncer de colon humano SW620 y HT29 demostraron que la DL₅₀ se ubica en 7.5 y 9.8 µg/ml respectivamente (Rahim et al., 2021), sus resultados superan los valores reportados en nuestro estudio. Es importante señalar que las dosis *in vitro* no son extrapolables en los tratamientos *in vivo*. También cabe señalar que, los enterocitos en cultivo interactuaron con la curcumina sin la protección que brinda el mucus del lumen intestinal y la biota. La presencia de estos factores puede influir en la tolerancia hacia dosis mayores de curcumina en los estudios *in vivo*.



7.10. Viabilidad de los probióticos en el alimento

Después de siete días de preparado la mezcla de alimento y probióticos, la viabilidad disminuyó ligeramente. Estos resultados concuerdan con (Wanka et al., 2018) quienes observaron que después de 8 semanas, las unidades formadoras de colonias descendieron ligeramente sin que esta disminución llegara a una décima potencia.

7.11. Parámetros de crecimiento

Doan et. al. (2018) reportaron incremento en la ganancia de peso (WG), la tasa específica de crecimiento (SGR) y el factor de conversión alimenticia (FCR) de la tilapia con la combinación de *L. plantarum* N11 y *B. velezensis* H3.1. Nuestros resultados coinciden con estos autores. La ganancia de peso en este estudio fue significativamente mayor en el grupo probióticos, sin embargo, no fue superior a la reportada por Won et al. (2020) con la combinación de *Bacillus subtilis* WB60 y *Lactococcus lactis* (1×10^8) durante 8 semanas con un incremento del peso en 279% en crías de tilapia. Esto debido al acelerado crecimiento de las crías. Sin embargo, los mismos autores reportaron un SGR de 2.56 %, mientras que en este estudio el mejor tratamiento fue de 3.6 %, lo que demuestra un mayor crecimiento por día. En lo que respecta al FCR, Xia et al. (2020), reportaron un valor de 1.29 con la utilización de *L. Lactis* y *L. rhamnosus* (1×10^8) durante 6 semanas en tilapia. En nuestro estudio, existió diferencias significativas en los grupos probióticos y curcumina con FCR menores a los reportados por estos autores. Se sabe que, los probióticos pueden mejorar la digestibilidad de los nutrientes e incrementar las enzimas digestivas y estimulando la síntesis de vitaminas. Estas mejoras incrementan el desempeño en la ganancia de peso y factor de conversión alimenticia (Hooshyar et al., 2020). En cuanto a la utilización de curcumina, (Giri et al., 2019) reportaron que la adición de curcumina (10 y 15 g/Kg) en carpa (*Cyprinus carpio*) durante 8 semanas, mejoró significativamente respecto al control la WG, SGR y FCR. Estas mejoras pueden deberse al incremento de las enzimas digestivas (tripsina y lipasa) (Alagawany et al., 2021).

7.12. Genes relacionados con la inmunidad

7.12.1. Intestino

Estudios recientes indican que la mucina 2 (Muc2) juega un papel en la protección de la barrera intestinal, la regulación de la homeostasis del microbioma y la prevención de enfermedades (Y. Liu et al., 2020). Experimentos en pollos, mostraron que la suplementación con cúrcuma mejoró la expresión del gen Muc2 en el yeyuno, por lo tanto, la implementación de curcumina puede influir la función de barrera y la absorción de nutrientes (Kamali Sangani et al., 2014). Se sabe que, los probióticos pueden aumentar la secreción de mucina MUC2 y, por lo tanto, pueden proteger la barrera mucosa intestinal de la adhesión e invasión de patógenos (Sherman et al., 2009). También se sabe que, la activación del TLR4 puede aumentar la expresión de MUC2 a través de las vías *Ras-MEK1/2-Erk1/2* y *NF- κ B* (McNamara & Basbaum, 2001). Nuestros resultados demostraron que la utilización de curcumina en dietas para tilapia durante 28 días aumenta la expresión de muc2 de forma significativa en comparación con los probióticos y la dieta basal.

Los peces teleósteos son los vertebrados más primitivos que contienen inmunoglobulinas, sin embargo, carecen de inmunoglobulina A (IgA). Estudios recientes demostraron que la IgT, actúa como un anticuerpo de la mucosa (Zhang et al., 2010). Pérez-Sánchez et al. (2011) demostraron que la implementación de *L. plantarum* durante 21 días aumentó la expresión génica de IgT en el intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Nuestros resultados mostraron un aumento en la expresión de IgT a los 28 días, sin embargo, este incremento no fue significativo, y se obtuvo mayor expresión con diferencias significativas con la utilización de curcumina en el mismo periodo. (Okazaki et al., 2010) demostraron que la utilización de curcumina en ratas eleva la producción de IgA luminal.

La IgM es la principal inmunoglobulina presente en peces (Reyes-Becerril et al., 2008). Las bacterias patógenas no son las únicas bacterias que desencadenan la respuesta inmune en el intestino, las bacterias probióticas pueden incrementar la respuesta inmune. Por esta razón, los probióticos son añadidos como suplemento alimenticio con el propósito de mejorar la salud de los peces. La mayoría de los estudios muestran un incremento en la secreción o

expresión de la IgM después de la administración de probióticos (Parra et al., 2016). La expresión relativa del mRNA de IgM en intestino de *Anguilla japonica* incrementó significativamente en los grupos que fueron alimentados con *Bacillus subtilis* WB60 y *Lactobacillus plantarum* KCT3928 (Lee et al., 2017). Nuestros resultados mostraron un patrón similar. Sin embargo, este incremento no presentó diferencias estadísticas.

Las defensinas son pequeños péptidos antimicrobianos, catiónicos (30-45 residuos de aminoácidos) ricos en cisteína, que actúan como parte importante en la defensa innata contra bacterias, hongos y virus (Chang et al., 2017). Pocos estudios explican la relación entre la curcumina en la dieta y la expresión de las defensinas. Estudios *in vivo*, demostraron que 393.67 y 591.46 mg/Kg de curcumina en la dieta de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) durante 60 días incrementó la expresión de β -defensina en sangre (Ming et al., 2020). Nuestros resultados muestran diferencias significativas en la expresión de mRNA de β -defensina en intestino de tilapia a los 28 días de alimentación suplementada con 40 mg/Kg de curcumina.

La IL-1 β fue previamente descrita como un pirógeno endógeno, activadora de linfocitos y tiene un amplio rango de actividades biológicas que involucra la génesis y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la inmunidad (Yin & Kwang, 2000). Xia et al., (2019) encontraron que la expresión de IL-1 β en intestino de tilapia se incrementó significativamente luego de 6 semanas de la utilización de *L. lactis* JCM5805 y *L. rhamnosus* JCM1136. Este patrón empata con nuestros resultados, sin embargo, la sobreexpresión no fue significativa. Por el contrario, el grupo de curcumina mostró diferencias estadísticas. Nuestros hallazgos contradicen lo reportado por Alagawany et al (2021) quienes mencionan que la curcumina reguló hacia bajo la expresión de las citocinas inflamatorias entre ellas la IL-1 β , mediada por la supresión de la activación de NF- κ B y los eventos posteriores que bloquean estas citoquinas (Jagetia & Aggarwal, 2007). No se encontraron reportes previos sobre la relación entre curcumina y la sobreexpresión de esta citocina en intestino. Lo cual, no es necesariamente un evento negativo. Se sabe que la IL-1 β es necesaria para el correcto funcionamiento de la respuesta innata en peces. Diversos estudios demostraron que la vacunación en peces fue más efectiva en los grupos que recibieron inyección de IL-1B como adyuvante (Taechavasonyoo et al., 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nuestros resultados demostraron que la expresión de IL-10 en intestino no presentó diferencias entre tratamientos a los 14 días. Mientras que, a los 28 días existió un incremento en los tratamientos con probióticos y curcumina con diferencias significativas solo en el grupo curcumina. Cabe señalar que la relación entre la expresión de IL10 e IL1 es casi 2/1. La IL-10 es una citocina pluripotente y la citocina antiinflamatoria más importante que se encuentra dentro de la respuesta inmunitaria (de Moreno de LeBlanc et al., 2011) . Estudios en ratón demostraron el incremento de IL-10 con la aplicación de *L. plantarum Lp91* (Plaza-diaz et al., 2014). La curcumina también puede alterar la expresión y la actividad de una variedad de interleucinas, especialmente IL-10 y, por lo tanto, puede influir en las funciones de diferentes células en diferentes formas (Jagetia & Aggarwal, 2007). El gen IL10 es trans-activado por la proteína de unión al elemento de respuesta *cAMP* (CREB/ATF) en los monocitos y el transductor de señal y activador de las moléculas de transcripción *Stat1*, *Stat3*, *Stat4*, *Stat5*, así como *Notch* en los linfocitos T. Además, la activación de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno *p38* da como resultado la producción de IL-10 (Mollazadeh et al., 2019).

La lisozima es una enzima catiónica que hidroliza los enlaces glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina en el peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas. La lisozima es capaz de lisar ciertas bacterias Gram-positivas y, junto con el complemento algunas bacterias Gram-negativas (Ferguson et al., 2010). La lisozima tipo C participa en la respuesta a las bacterias patógenas, diversos estudios muestran que la transcripción de este gen es activado rápidamente en respuesta a los retos bacterianos o la inyección de LPS (Xia et al., 2018). Aunque la lisozima es importante para impulsar una respuesta proinflamatoria, la lisozima también juega un papel en la limitación de la inflamación a nivel sistémico principalmente a nivel intestinal (Ragland & Criss, 2017).

Los receptores tipo toll (TLR) son una familia de receptores transmembranales conservados evolutivamente que se encuentran en la superficie celular o en los endosomas intracelulares. Estos receptores son activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Esta activación termina con la inducción de la familia de factores de transcripción NF- κ B y la regulación al alza de la respuesta inmunitaria (Grondin et al., 2020). Nuestros resultados mostraron un incremento sin diferencias significativas en la

expresión del mRNA de TLR4 intestinal a los 14 y 28 días del suministro de probióticos. En cuanto al uso de probióticos Yan & Polk (2011) mencionan que los monocitos humanos estimulados con *L. rhamnosus Lcr35* incrementaron la expresión de TLR4 en su membrana. Pirarat et al. (2011) sugieren que *L. rhamnosus GG* en el intestino de tilapia afectó estas respuestas inmunes periféricas a través de un aumento en la expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la IL-1. En cuanto a la relación de la curcumina y la expresión génica de TLR4 en peces la información es escasa. Estudios en lechones destetados demostraron que 300 mg/Kg de curcumina puede regular hacia abajo la expresión de TLR4 mRNA (Moniruzzaman & Min, 2020). Por el contrario, nuestros resultados mostraron un incremento a los 14 y 28 días en la expresión de TLR4 con la utilización de 40 mg/Kg de curcumina en tilapia, sin embargo, este incremento no tiene diferencias significativas. Sugerimos que la curcumina activa de forma indirecta la expresión de TLR4 y se requieren más estudios para explicar esta relación.

La proteína de shock térmico de 70 kDa (Hsp70) pertenece a una familia altamente conservada de proteínas celulares presentes en todos los organismos, incluidos los peces. Hsp 70 actúa como chaperona y media la reparación de las proteínas desnaturalizadas (J. S. Lee et al., 2013). Sanders et al. (1994) explican que los niveles de expresión de las proteínas del heat shock pueden ser usadas para identificar tejidos vulnerables. Diversos estudios en animales han demostrado que la inclusión de probióticos en la dieta mejora la protección del organismo debido al incremento de los niveles de la Hsp protectora en condiciones de estrés (Koninkx & Malago, 2008). Por el contrario, Mohapatra et al. (2014) reportaron que la combinación de *B subtilis*, *L. lactis* y *S. cerevisiae* disminuyó los niveles séricos de Hsp70 en la carpa hindú (*Labeo rohita*). Nuestros resultados demuestran que la combinación de *L. lactis*, *L. rhamnosus* y *P. pentosaceus* no generó cambios sobre la expresión del mRNA de Hsp70 intestinal de la tilapia en los periodos evaluados. En cuanto al uso de curcumina, Hong-hong, et al. (1982) demostraron que la utilización durante 8 semanas de 100 y 200 mg/Kg de curcumina aumentó la expresión de Hsp70 en hígado de tilapia. Nuestros resultados demostraron un incremento significativo en la expresión de Hsp70 en el intestino a los 14 días con 40 mg/Kg de curcumina, este incrementó disminuyó hasta valores cercanos al basal a los 28 días de tratamiento. Estudio *in vitro* con células

Caco-2 demostraron que la aplicación de curcumina durante 21 días incrementó la expresión de Hsp70 sin modificar la viabilidad celular (Guo et al., 2021). Nuestros hallazgos sugieren que la sobreexpresión de Hsp70 debe ser abordada como una proteína antiinflamatoria y crucial para la regulación de la inmunidad, tal como mencionan Borges et al. (2012). Se requieren más estudios en peces sobre las vías de señalización que involucren la relación entre Hsp70, Foxp3 e IL10.

Los interferones tipo II desempeña un papel importante en la regulación de la inmunidad. El interferón- γ , conocido como interferón inmunitario, lo proporcionan principalmente los linfocitos T activados y posiblemente las células asesinas naturales (NK). Tiene un papel mediador fundamental para la activación de los macrófagos y tiene propiedades inmunomoduladoras. Recientemente se ha sugerido que IFN γ puede contribuir a la homeostasis en las células epiteliales del intestino, pero los mecanismos no están del todo claros (He et al., 2011) (Graves et al., 2014) (Chen et al., 2016). Won et al. (2020) obtuvieron un incremento de la expresión génica de Interferón gamma con la utilización de *B. subtilis* y *L. lactis* (10^8 UFC) en tilapia. Resultados similares fueron reportados por Xia et al. (2018) con la utilización de *L. lactis* JCM805. Nuestro resultado de la expresión génica del mensajero de IFN γ en el tratamiento que recibió probióticos no muestra diferencias significativas en los tiempos evaluados respecto a los grupos control y curcumina, aunque existió un incremento a los 28 días. Mientras que el grupo que recibió curcumina presentó un incremento no significativo a los 14 días, mientras que el incremento significativo ocurrió a los 28 días. Nuestros hallazgos se contraponen a lo reportado por otros autores, quienes señalaron que la expresión de IFN resultó disminuida o suprimida por la acción de curcumina (Jagetia & Aggarwal, 2007) (Moniruzzaman & Min, 2020). El incremento de la expresión del IFN gamma en nuestros resultados puede estar relacionado con el incremento de otras citocinas inflamatorias como la IL-1 β que se encuentra elevada en el tratamiento con curcumina en el mismo periodo. Esta relación directa fue previamente reportada por D. H. Kim & Austin (2006).

7.12.2. Bazo

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) se refiere a un grupo de factores de transcripción que regulan la expresión de muchos genes que codifican proteínas de la respuesta inmune y respuesta inflamatoria, que participan en la regulación de la muerte, proliferación y migración celular (Cho & Park, 2015). Estudios en diferentes modelos animales han revelado que la administración de curcumina en dosis de 100-200 mg/kg mostró notables efectos antiinflamatorios suprimiendo la activación de NF- κ B (Alagawany et al., 2021). Por el contrario, nuestros hallazgos demuestran que el grupo que recibió curcumina en la dieta presentaron un incremento significativo en la expresión del mRNA de NF- κ B en bazo a los 14 días de utilización. (Long et al., 2009) menciona que, mejorar la intensidad de la señal de la vía NF- κ B puede inducir la expresión de Foxp3 en las células T. Este patrón coincide con nuestros resultados, donde ambos marcadores presentaron un incremento a los 14 días.

Forkhead/winged helix transcription factor p3 (Foxp3) se considera un gen de maestro de cambio para células T reguladoras (Tregs) (Yang, 2008). Existe evidencia robusta sobre el impacto de numerosas cepas de probióticos en la sobreexpresión de Foxp3 en tejidos como intestino y bazo de diversos grupos de vertebrados (Flaherty et al., 2010). (Smelt et al., 2013). (Plaza-díaz et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados evidencian que la combinación de *L. lactis*, *P. pentosaceus* y *L. rhamnosus* no impactó de forma significativa la expresión de mRNA Foxp3 en el periodo evaluado. Por el contrario, la utilización de curcumina resultó ser el mejor tratamiento estadísticamente en el mismo periodo. Este incremento contrasta con la relación entre la curcumina y supresión de la expresión de Foxp3 (Zhao et al., 2012) (MaruYama et al., 2021). Es necesario profundizar en las vías moleculares que expliquen este evento.

Y. R. Kim et al., (2012) reportaron incremento en la IL-1 β en el bazo del lenguado aceituna (*Paralichthys olivaceus*) con la utilización de *E. faecium* durante 15 días. Al igual que (W. Liu et al. (2013) en el bazo de tilapia con la utilización durante 20 días de *L. acidophilus* JCM1132. Nuestros resultados empatan con sus observaciones. Sin embargo, no obtuvimos diferencias significativas. Con la utilización de curcumina la sobreexpresión resultó ser

significativa. Como ya se explicó en párrafos anterior, este patrón en los datos es atípico y requiere de estudios más profundos para explicar la relación entre la curcumina y la sobreexpresión de citocinas inflamatorias. Además, el incremento significativo del mRNA de IL-10 fue 3 veces mayor que el de IL-1 β . Zou y Secombes (2016) explican que la IL-10 de peces son similares a los ortólogos de mamíferos, actúan como un supresor y ejercen un papel conservado en la amortiguación de las respuestas inflamatorias. Nuestros resultados sugieren que el bazo desempeña un papel más importante del que se conoce en la modulación de la respuesta inmune en el intestino. Estudios *in vivo* en ratones demostraron que el bazo juega un papel importante en la respuesta inmunitaria del intestino sirviendo como reservorio de células inmunitarias que migran al sitio de entrada del antígeno (Weiberg et al., 2018).

7.12.3. Piel

Hasta la fecha el enfoque principal del estudio del microbioma se ha centrado a nivel intestinal (Meade & O'Farrelly, 2019). Pocos son los estudios que han evaluado el impacto de los cambios en la microbiota intestinal en otros tejidos. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Reyes-Becerril et al. (2012), estos autores encontraron que la inclusión de la levadura *Debaryomyces hansenii* en la dieta de *Sparus aurata* durante 2 semanas incrementó la expresión de los genes relacionados con la inmunidad en la piel y a las 4 semanas existió down-regulation. Los mismos autores mencionan que los mecanismos continúan sin ser aclarados. La curcumina modificó la expresión de β -Def a las 2 semanas en la piel con un incremento casi 3 veces más que en el intestino en su máxima expresión que corresponde a las 4 semanas. Dong et al. (2015) mediante qPCR compararon la expresión de β -Defensina en diversos tejidos de tilapia y encontraron que la piel fue el tejido con mayor expresión y el intestino el tejido de menor expresión. Como principal interfaz con el entorno externo, el intestino y la piel son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis fisiológica. La evidencia acumulada ha demostrado una conexión bidireccional íntima entre el intestino y la piel, y numerosos estudios relacionan la salud gastrointestinal (GI) con la homeostasis y la alostasis de la piel (Salem et al., 2018).

7.13. Parámetros histológicos

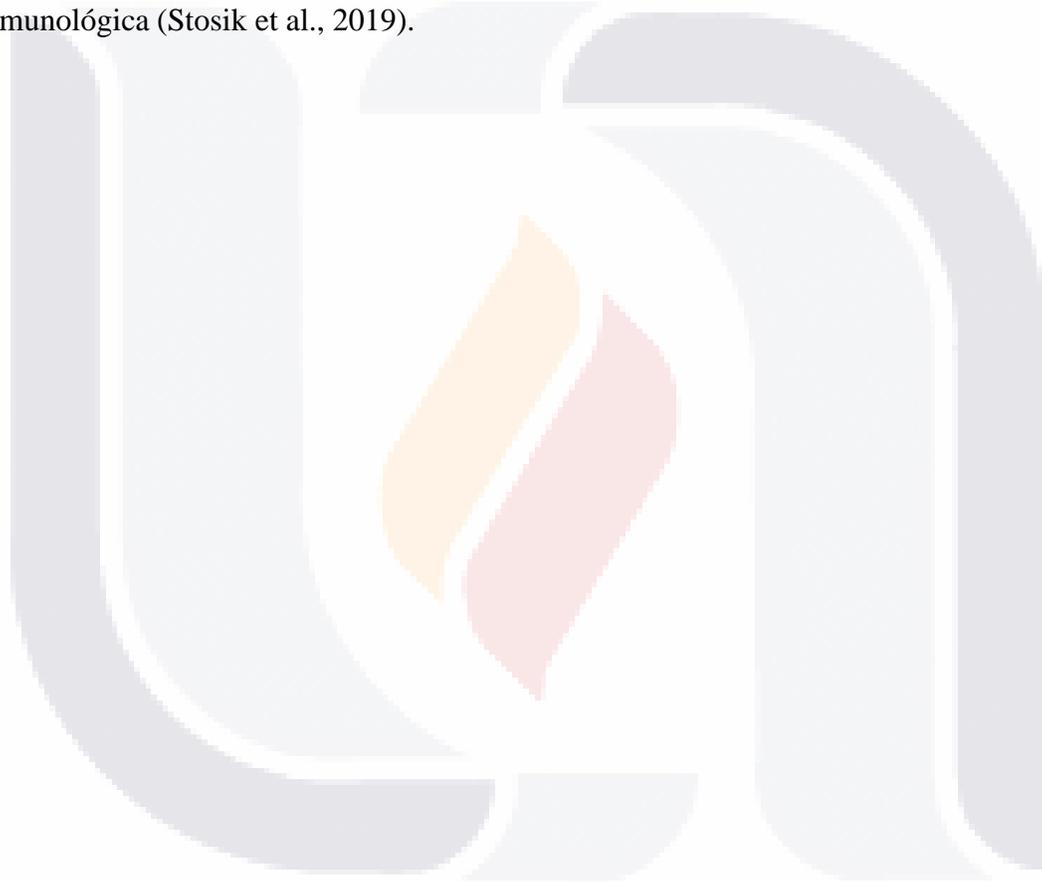
7.13.1 Intestino

Pirarat et al (2011) reportaron que en las tilapias alimentadas con *L. rhamnosus* GG fue más frecuente observar leucocitos intraepiteliales en comparación al intestino de las tilapias control. Nuestros resultados difieren a los reportado por estos autores ya que no se observaron cambios histopatológicos en ninguno de los tratamientos. Aunque no se aprecian cambios morfológicos en la longitud y ancho de las criptas existió un efecto significativo en la ganancia de peso en el grupo probióticos. Como hallazgos relevantes, se observó que la aplicación de probióticos aumentó significativamente el número de células Goblet por cripta. Resultados similares fueron reportados con el uso de *Lactobacillus plantarum* (10^8 ufc/g) en tilapia luego de 35 días de tratamiento (Ruiz et al., 2019). Mientras que, con curcumina no existieron diferencias respecto al control. Manju et al. (2009) reportaron que la utilización de 1% de curcumina en la dieta de *Anabas testudineus* tuvo un efecto a la baja en la cantidad de células goblet respecto al grupo con dieta basal. Nuestros hallazgos histológicos, se contraponen al patrón observado en los análisis moleculares de nuestra investigación, ya que el grupo curcumina presentó sobre expresión del mRNA de Muc2. En base a la información colectada en nuestro estudio concluimos que la aplicación de curcumina aumenta la producción de moco sin un incremento en el número de células mucosas, mientras que la implementación de los probióticos logró aumentar el número de células mucosa. En ambos casos se considera un efecto benéfico.

7.13.2. Bazo

Los melanomacrófagos son macrófagos pigmentados y por lo tanto histológicamente distinguibles. En la mayoría de los peces existen en grupos (centros melanomacrófagos) distribuidos en el bazo y el riñón posterior, así como en grupos menos discretos o individualmente en otros tejidos, incluidos el hígado y el intestino. A pesar de su nombre, el pigmento dominante en estas células es la lipofuscina (Diaz-Satizabal & Magor, 2015). La actividad fagocítica del CMM no se limita a los eritrocitos, ya que también fagocitan materiales infecciosos (Steinel & Bolnick, 2017). Nuestros resultados demostraron que la

utilización de probióticos y curcumina por separado incrementaron el tamaño de los CMM en el bazo de tilapia sin diferencias aparentes en el tiempo. Por su parte, Ruíz et al (2019) encontraron que *L. plantarum* disminuyó el tamaño de CMM a los 35 días de utilización en tilapia. Mientras que la inclusión de curcumina al 1% en la dieta de *A. testudineus* incrementó el tamaño de los CMM en riñón. Estudios en *Salmo salar* evidenciaron que en los CMM ocurre retención de los antígenos y, en etapas posteriores, la activación de macrófagos y linfocitos, la síntesis y secreción de anticuerpos y el desarrollo de la memoria inmunológica (Stosik et al., 2019).



7.14. Estimulación de leucocitos

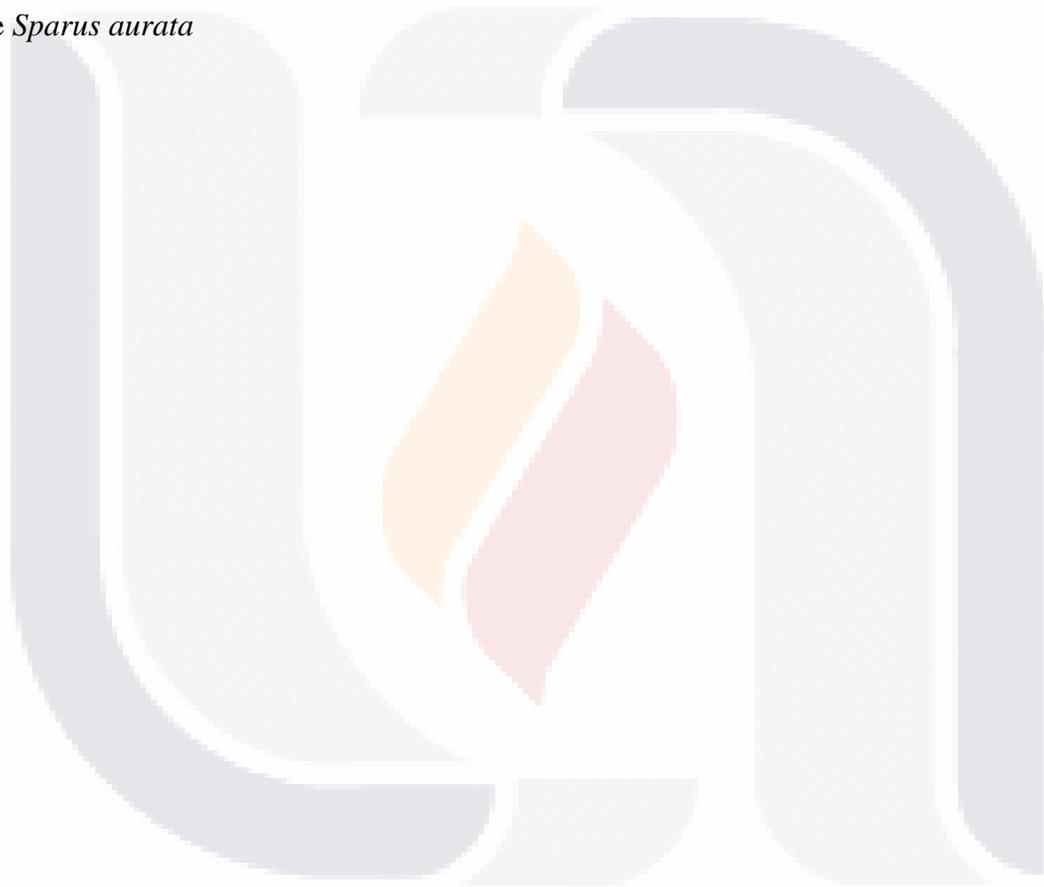
7.14.1. Estallido respiratorio y mieloperoxidasa

El estallido respiratorio es un mecanismo efector crucial para limitar el crecimiento de los patógenos en peces (Divyagnaneswari et al., 2007) Con la utilización de diversos probióticos en peces se demostró un incremento en la actividad del estallido respiratorio y la fagocitosis, que juegan un rol central en la respuesta inmune no específica (Xing et al., 2013). Nuestros resultados muestran que el mejor tratamiento fue el grupo probióticos con un incremento en la actividad del estallido respiratorio a los 14 y 28 días, mientras que la mieloperoxidasa solo se incrementó a los 28 días. Estos hallazgos concuerdan con Telli et al. (2014) con la utilización de *B. subtilis* a los 14 días en tilapia. Alamillo et al. (2017), quienes demostraron un incremento de la explosión respiratoria *in vitro* en leucocitos de huachinango (*Lutjanus peru*) con la utilización de la levadura *Yarrowia lipolytica*, igual a lo reportado por Angulo et al. (2018) con la levadura *Debaryomyces hansenii* en leucocitos de huachinango, así como el incremento de la actividad de la mieloperoxidasa. En lo que respecta a la utilización de curcumina, el estallido respiratorio y la mieloperoxidasa no mostraron diferencias significativas respecto al control. Estudios en neutrófilos de mono, demostraron que la curcumina 1 μM inhibió la liberación de mieloperoxidasa y radicales O_2^- , debido a la capacidad de la curcumina para modular el sistema antioxidante reduciendo el estrés y restaurando el balance redox celular (Srivastava, 1989). (Panaro et al., 2020)

7.14.2. Fagocitosis

Nuestros resultados muestran que los leucocitos de bazo de las tilapias alimentadas con la mezcla de probióticos presentaron una mayor actividad fagocítica a los 14 días y una baja considerable a los 28 días. Estudios previos *in vitro*, demostraron un aumento de la fagocitosis y la capacidad de destrucción de los leucocitos del riñón cefálico en las tilapias suplementadas con *L. rhamnosus* (Pirarat et al., 2011), los mismos autores sugieren que la sobreexpresión IL-1 y $\text{TNF}\alpha$ inducen el incremento de la fagocitosis. Resultados similares también fueron reportados en el estudio de leucocitos de mero (*Epinephelus coioides*) retados contra *Vibrio anguillarum* estimulados con *Pediococcus pentosaceus cepa 4012*

(Huang et al., 2014). Respecto al uso de la curcumina, se observó una actividad fagocítica sostenida de inicio a fin, sin diferencias respecto a los otros grupos. Las evidencias sugieren que la curcumina puede favorecer el aumento de la actividad fagocítica sin aumentar los niveles de NO (Yuandani et al., 2021). Aunque la intensidad de la señal fluorescente de la célula se correlacionó directamente con el número de bacterias interiorizadas por célula, no fue posible determinar el número exacto de estas bacterias. Resultados similares fueron obtenidos por Esteban et al. (1998) al evaluar la fagocitosis de *V. anguillarum* en leucocitos de *Sparus aurata*



8. CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de bacteriocinas en cada una de las cepas probióticas evaluadas. Los sobrenadantes de los probióticos y la curcumina 10 y 25 μM ejercen efectos similares en la reducción del crecimiento de *A. hydrophila* a las 12 horas de interacción. No obstante, no se observó sinergia entre tratamientos. Los sobrenadantes de los probióticos y la curcumina 25 y 50 μM ejercen efectos similares en la reducción del biofilm de *A. hydrophila*. No obstante, no se observó sinergia entre tratamientos. Nuestros experimentos demostraron que, existe un incremento significativo de la permeabilidad de *A. hydrophila* en interacción con curcumina 50 μM a las dos horas de incubación y con los sobrenadantes por separado en el mismo periodo. Sin embargo, no se observó sinergia entre tratamientos. El presente estudio demostró la formación de poros en la membrana bacteriana, vacuolas en el citoplasma y lisis de debido al efecto de las bacteriocinas de las tres cepas y la curcumina 50 μM en la, a través de la microscopia electrónica de transmisión. Se demostraron diferentes modos de acción de la curcumina y las bacteriocinas por separado como eficaces sustitutos en la contención de *A. hydrophila* y evitar la aplicación de antibióticos. Las técnicas implementadas en este estudio para evaluar el efecto sinérgico de la curcumina y las bacteriocinas en la inhibición del crecimiento, inhibición del biofilm y permeabilización de la pared de *A. hydrophila* aportan evidencia que no existe sinergia entre tratamientos en las concentraciones y tiempos seleccionados. Nuestros resultados abren la posibilidad de seguir explorando los mecanismos, concentraciones y periodos de exposición para obtener efecto sinérgico en la combinación entre curcumina y bacteriocinas.

La evidencia colectada en este estudio demuestra el efecto benéfico de la mezcla de *L.lactis*, *L. rhamnosus* y *P. pentosaceus* en los parámetros productivos de la tilapia y la respuesta innata celular. Mientras que curcumina mejoró significativamente la mayoría de los genes relacionados con la inmunidad en el intestino, bazo y piel. Por lo que, suponíamos que la mezcla de ambos tratamientos potenciaría aún más los efectos que por separado. Sin embargo, nuestros estudios previos *in vitro* demostraron que no existió sinergia entre los sobrenadantes de estas cepas y diversas dosis de curcumina en la eliminación de *A. hydrophila*. (Ibarra-Martínez et al., 2022). Sugerimos la aplicación alternada de ambos tratamientos para mejorar el estado de salud de las tilapias.

9. REFERENCIAS

- Abdullah, S., Omar, N., Yusoff, S. M., Obukwho, E. B., Nwunuji, T. P., Hanan, L., & Samad, J. (2013). Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis spp.*). *SpringerPlus*, 2(1), 286. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-286>
- Abts, A., Mavaro, A., Stindt, J., Bakkes, P. J., Metzger, S., Driessen, A. J. M., Smits, S. H. J., & Schmitt, L. (2011). Easy and rapid purification of highly active nisin. *International Journal of Peptides*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/175145>
- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437, 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.015>
- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.002>
- Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., Dawood, M. A. O., Elnesr, S. S., & Dhama, K. (2021). Curcumin and its different forms: A review on fish nutrition. *Aquaculture*, 532, 736030. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736030>
- Alamillo, E., Reyes-Becerril, M., Cuesta, A., & Angulo, C. (2017). Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 70, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.036>
- Allsopp, M., Page, R., Johnston, P., & Santillo, D. (2009). Aquaculture. *State of the World's Oceans*, M, 85–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9116-2_3
- Al-yasiry, A. R. M., Kiczorowski, P., Winiarska-mieczan, A., & Breeding, A. (2017). *The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – a review*. 17(3), 605–625. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0076>
- Amal, M. N. a, & Zamri-Saad, M. (2011). Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195–206.

- Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio, F., & Angulo, C. (2018). Debaryomyces hansenii CBS 8339 β -glucan enhances immune responses and downstream gene signaling pathways in goat peripheral blood leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 88(June), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.07.017>
- Balakrishna, A. (2013). *In vitro* Evaluation of Adhesion and Aggregation Abilities of Four Potential Probiotic Strains Isolated from Guppy (*Poecilia reticulata*). 56(October), 793–800.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J. M., & Haertlé, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 837–848. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02966.x>
- Bendali, F., Gaillard-Martinie, B., Hebraud, M., & Sadoun, D. (2008). Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1784–1792. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.02.010>
- Benhamed, S., Guardiola, F. a., Mars, M., & Esteban, M. Á. (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*, 171(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.008>
- Borges, T. J., Wieten, L., van Herwijnen, M. J. C., Broere, F., van derZee, R., Bonorino, C., & van Eden, W. (2012). The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in Immunology*, 3(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00095>
- Chang, C., Chen, L., Hu, Y., Wu, C., & Tsai, J. (2017). Fish & Shellfish Immunology Determining the cleavage site for the mature antimicrobial peptide of Nile tilapia b - defensin using 2D electrophoresis , western blot , and mass spectrometry analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 62, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.010>
- Chen, Y. bin, Hu, J., Lyu, Q. J., Liu, L. J., Wen, L. F., Yang, X. K., & Zhao, H. H. (2016). The effects of Natucin C-Natucin P mixture on blood biochemical parameters, antioxidant activity and non-specific immune responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 55, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.016>

- Cho, J. A., & Park, E. (2015). Curcumin utilizes the anti-inflammatory response pathway to protect the intestine against bacterial invasion. *Nutrition Research and Practice*, 9(2), 117–122. <https://doi.org/10.4162/nrp.2015.9.2.117>
- Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018). Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01963>
- Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., & Hulata, G. (2004). Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research*, 35(15), 1434–1440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01167.x>
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3060–3067. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060>
- Corte, L., Pierantoni, D. C., Tascini, C., Roscini, L., & Cardinali, G. (2019). Biofilm specific activity: A measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms*, 7(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030073>
- Cristea, V., Antache, A., Grecu, I., Docan, A., Dediu, L., & Cre, M. (2012). the Use of Phytobiotics in Aquaculture. *Lucraci Stiintifice - Seria Zootehnie*, 57, 250–255.
- Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), 71–87. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00201-1)
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Yokoyama, S., Wang, W. L., Yukun, Z., & Olivier, A. (2017). Physiological response, blood chemistry profile and mucus secretion of red sea bream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* under low salinity stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(1), 179–192. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0277-4>
- de Moraes França Ferreira, P., Condessa, S. S., Rocha, J. S., Caldas, D. W., Gomes, J. R., Soares, M. T., Cardoso, A. J. S., & Zuanon, J. A. S. (2017). Is the use of turmeric in the diet safe for fish? *Aquaculture Research*, 48(9), 4623–4631. <https://doi.org/10.1111/are.13285>
- de Moreno de LeBlanc, A., del Carmen, S., Zurita-Turk, M., Santos Rocha, C., van de Guchte, M., Azevedo, V., Miyoshi, A., & LeBlanc, J. G. (2011). Importance of IL-10

Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. *ISRN Gastroenterology*, 2011, 1–11. <https://doi.org/10.5402/2011/892971>

- Diaz-Satizabal, L., & Magor, B. G. (2015). Isolation and cytochemical characterization of melanomacrophages and melanomacrophage clusters from goldfish (*Carassius auratus*, L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 48(1), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.003>
- Divyagnaneswari, M., Christybabita, D., & Michael, R. D. (2007). Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.09.015>
- Doan, H. van, Hossein, S., Khanongnuch, C., & Kanpiengjai, A. (2018). Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity , disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 491(March), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.019>
- Dong, J., Wu, F., Ye, X., Sun, C., Tian, Y., Lu, M., Zhang, R., & Chen, Z. (2015). β - Defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence , tissue expression , and anti-bacterial activity of synthetic peptides. *Gene*, 566(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.025>
- Dong, Y., Yang, Y., Liu, J., Awan, F., Lu, C., & Liu, Y. (2018). Fish and Shell fi sh Immunology Inhibition of *Aeromonas hydrophila*- induced intestinal in fl ammation and mucosal barrier function damage in crucian carp by oral administration of *Lactococcus lactis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 83(September), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.041>
- Drevets, D. A., & Campbell, P. A. (1991). Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *Journal of Immunological Methods*, 142(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90289-R](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90289-R)
- Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojaee-Aliabadi, S., & Koushki, M. R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.066>
- Esteban, M. A., Mulero, V., Muñoz, J., & Meseguer, J. (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, 293(1), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s004410051105>

- Ferguson, R. M. W., Merrifield, D. L., Harper, G. M., Rawling, M. D., Mustafa, S., & Picchietti, S. (2010). *The effect of Pediococcus acidilactici on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (Oreochromis niloticus)*. 109, 851–862. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04713.x>
- Fernandes, S., & Kerkar, S. (2019). Bacterial probiotics over antibiotics: A boon to aquaculture. In *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00014-8>
- Furci, L., & Secchi, M. (2018). AMPs and mechanisms of antimicrobial action. In *Antimicrobial Peptides in Gastrointestinal Diseases*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814319-3.00006-4>
- Gan, Z., Wang, B., Zhou, W., Lu, Y., Zhu, W., Tang, J., Jian, J., & Wu, Z. (2015). Molecular and functional characterization of CD59 from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) involved in the immune response to *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.035>
- Giri, S. S., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2019). Effects of bioactive substance from turmeric on growth, skin mucosal immunity and antioxidant factors in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 92(June), 612–620. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.053>
- Girón-Pérez, M. I., Velázquez-Fernández, J., Díaz-Resendiz, K., Díaz-Salas, F., Canto-Montero, C., Medina-Díaz, I., Robledo-Marengo, M., Rojas-García, A., & Zaitseva, G. (2009). Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 383–385. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.004>
- Gonzalez, B., Glaasker, E., Kunji, E. R. S., Driessen, A. J. M., Suarez, J. E., & Konings, W. N. (1996). Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2701–2709. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2701-2709.1996>
- Graves, C. L., Harden, S. W., LaPato, M., Nelson, M., Amador, B., Sorenson, H., Frazier, C. J., & Wallet, S. M. (2014). A method for high purity intestinal epithelial cell culture from adult human and murine tissues for the investigation of innate immune function. *Journal of Immunological Methods*, 414, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.08.002>
- Grondin, J. A., Kwon, Y. H., Far, P. M., Haq, S., & Khan, W. I. (2020). Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. *Frontiers in Immunology*, 11(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02054>

- Guimarães, I. G., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Li, M. H., & Klesius, P. H. (2014). Effects of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. *Animal Feed Science and Technology*, 188, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.12.003>
- Guo, M., Xu, W., Yamamoto, Y., & Suzuki, T. (2021). Curcumin increases heat shock protein 70 expression via different signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 707(May), 108938. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108938>
- Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K., & Aggarwal, B. B. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural Product Reports*, 28(12), 1937–1955. <https://doi.org/10.1039/c1np00051a>
- Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D., & Kumar, B. (2016). Chemical composition , total phenolic and flavonoid contents , and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L .). *Integrative Medicine Research*, 10(4), 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.011>
- Hai, N. v. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Hancock, R. E. W., & Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00480-3)
- He, S., Liu, W., Zhou, Z., Mao, W., Ren, P., Marubashi, T., & Ringø, E. (2011). Evaluation of probiotic strain bacillus subtilis C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Research and Development, SPEC. ISSUE 1*, 1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-005>
- Hemaiswarya, S. (2013). *Mechanism of Action of Probiotics. February*. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100015>
- Hermosillo, O. A. M., Martínez, P., Ibáñez, A. L., & Ramírez, H. C. (2012). *Use of Probiotics in Aquaculture a n. 2012*. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Hong-hong Cui, Bo Liu, Xian-ping Ge, Jun Xie, Pao Xu, Ling-hong Miao , Sheng-ming Sun , Ying-jie Liao, Ru-li Chen, Ming-chun Ren, Qun-lan Zhou, L. P. (1982). Effects of dietary curcumin on growth performance , biochemical parameters , HSP70 gene expression and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Gift Tilapia , *Oreochromis niloticus*. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 9, p.173-203.

- Hooshyar, Y., Abedian Kenari, A., Paknejad, H., & Gandomi, H. (2020). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on Different Parameters Related to Health Status of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the Protection Against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09645-8>
- Huang, J. bin, Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2014). Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity, physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish and Shellfish Immunology*, *39*(2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.003>
- Ibarra-Martínez, D., Muñoz-Ortega, M. H., Quintanar-Stephano, A., Martínez-Hernández, S. L., Ávila-Blanco, M. E., & Ventura-Juárez, J. (2022). Antibacterial activity of supernatants of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* and curcumin against *Aeromonas hydrophila*. In vitro study. *Veterinary Research Communications*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09871-7>
- Jackson Buss, Carla Coltharp, Tao Huang, Chris Pohlmeier, Shih-Chin Wang, Christine Hatem, and J. X. (2013). In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. *Mol Microbiol*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/mmi.12331>.In
- Jagetia, G. C., & Aggarwal, B. B. (2007). “Spicing up” of the immune system by curcumin. *Journal of Clinical Immunology*, *27*(1), 19–35. <https://doi.org/10.1007/s10875-006-9066-7>
- Jamuna, M., & Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(4), 433–439. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1576-8>
- Kamali Sangani, A., Masoudi, A. A., & hosseini, said abdoullah. (2014). The effects of herbal plants on Mucin 2 gene expression and performance in ascetic broilers. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, *8*(1), 47–52. <https://doi.org/10.22059/ijvm.2014.50566>
- Kavitha, M., Raja, M., & Perumal, P. (2018). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp . isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton , 1822). *Aquaculture Reports*, *11*(June), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.07.001>
- Kim, D. H., & Austin, B. (2006). Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary*

Immunology and Immunopathology, 114(3–4), 297–304.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.08.015>

Kim, Y. R., Kim, E. Y., Choi, S. young, Hossain, M. T., Oh, R., Heo, W. S., Lee, J. M., Cho, Y. C., & Kong, I. S. (2012). Effect of a probiotic strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 526–529.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08047>

Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care &. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1–2), 111–133.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>

Koninkx, J. F. J. G., & Malago, J. J. (2008). The protective potency of probiotic bacteria and their microbial products against enteric infections-review. *Folia Microbiologica*, 53(3), 189–194. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0023-0>

Langlois, L., Akhtar, N., Tam, K. C., Dixon, B., & Reid, G. (2021). Fishing for the right probiotic: Host-microbe interactions at the interface of effective aquaculture strategies. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab030>

Lee, J. S., Cheng, H., Damte, D., Lee, S. J., Kim, J. C., Rhee, M. H., Suh, J. W., & Park, S. C. (2013). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3), 756–761. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.028>

Lee, S., Katya, K., Park, Y., Won, S., Seong, M., hamidoghli, A., & Bai, S. C. (2017). Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. In *Fish and Shellfish Immunology* (Vol. 61, Issue 2017). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.035>

Li, R., Wang, Q., Fan, J. R., He, J. bin, Qiao, X., Xiang, C., Guo, D. A., & Yea, M. (2016). Metabolites identification of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in rats after oral administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2(4), 29–37. <https://doi.org/10.15806/j.issn.2311-8571.2016.0035>

- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., & Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, 6(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24340>
- Liu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z., & Zhou, Z. (2013). Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.010>
- Liu, Y., Yu, X., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). The role of MUC2 mucin in intestinal homeostasis and the impact of dietary components on MUC2 expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.191>
- Long, M., Park, S. G., Strickland, I., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2009). Nuclear Factor- κ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity*, 31(6), 921–931. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.022>
- Mai, K., Sharman, P. A., Walker, R. A., Katrib, M., de Souza, D., McConville, M. J., Wallach, M. G., Belli, S. I., Ferguson, D. J. P., & Smith, N. C. (2009). Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 281–289. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200022>
- Manju, M., Sherin, T. G., Rajasekharan, K. N., & Oommen, O. V. (2009). Curcumin analogue inhibits lipid peroxidation in a freshwater teleost, *Anabas testudineus* (Bloch) - An in vitro and in vivo study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 413–420. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9266-6>
- MaruYama, T., Kobayashi, S., Nakatsukasa, H., Moritoki, Y., Taguchi, D., Sunagawa, Y., Morimoto, T., Asao, A., Jin, W., Owada, Y., Ishii, N., Iwabuchi, Y., Yoshimura, A., Chen, W. J., & Shibata, H. (2021). The Curcumin Analog GO-Y030 Controls the Generation and Stability of Regulatory T Cells. *Frontiers in Immunology*, 12(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.687669>
- McNamara, N., & Basbaum, C. (2001). Signaling networks controlling mucin production in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Glycoconjugate Journal*, 18(9), 715–722. <https://doi.org/10.1023/A:1020875423678>
- Meade, K. G., & O’Farrelly, C. (2019). B-Defensins: Farming the microbiome for homeostasis and health. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03072>

- Merrifield, D. L., Harper, G. M., Dimitroglou, A., Ringø, E., & Davies, S. J. (2010). Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, *41*(8), 1268–1272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02397.x>
- Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. a G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, *136*(1–2), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D., & Lacroix, M. (2007). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(1), 274–282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03044.x>
- Ming, J., Ye, J., Zhang, Y., Xu, Q., Yang, X., Shao, X., Qiang, J., & Xu, P. (2020). Optimal dietary curcumin improved growth performance, and modulated innate immunity, antioxidant capacity and related genes expression of NF-κB and Nrf2 signaling pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, *97*(September 2019), 540–553. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.074>
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A. K., & Paniprasad, K. (2014). *Beneficial Effects of Dietary Probiotics Mixture on Hemato-Immunology and Cell Apoptosis of Labeo rohita Fingerlings Reared at Higher Water Temperatures*. *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100929>
- Mollazadeh, H., Cicero, A. F. G., Blesso, C. N., Pirro, M., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2019). Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1358139>
- Moniruzzaman, M., & Min, T. (2020). Curcumin, curcumin nanoparticles and curcumin nanospheres: A review on their pharmacodynamics based on monogastric farm animal, poultry and fish nutrition. *Pharmaceutics*, *12*(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050447>
- Morrison, R. N., & Nowak, B. F. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, *11*(1), 46–54. <https://doi.org/10.1053/saep.2002.28241>

- Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(5), 1620–1637. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975>
- Ng, W. K., & Romano, N. (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, *5*(4), 220–254. <https://doi.org/10.1111/raq.12014>
- Nguyen, N. van, Onoda, S., Khanh, T. van, Duy, P., & Thanh, N. (2019). Evaluation of dietary Heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, *498*(March 2018), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.081>
- Nilsen, T., Swedek, I., Lagenaur, L. A., & Parks, T. P. (2020). Novel Selective Inhibition of *Lactobacillus iners* by *Lactobacillus*-Derived Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(20), 1–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01594-20>
- O. Gillor, A. Etzion, M. A. R. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Okazaki, Y., Han, Y., Kayahara, M., Watanabe, T., Arishige, H., & Kato, N. (2010). Consumption of curcumin elevates fecal immunoglobulin A, an index of intestinal immune function, in rats fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *56*(1), 68–71. <https://doi.org/10.3177/jnsv.56.68>
- Oscáriz, J. C., & Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International Microbiology*, *4*(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s101230100003>
- Osho, S. O., Wang, T., Horn, N. L., & Adeola, O. (2017). Research Note: Comparison of goblet cell staining methods in jejunal mucosa of Turkey poults. *Poultry Science*, *96*(3), 556–559. <https://doi.org/10.3382/ps/pew324>
- Panaro, M. A., Corrado, A., Benameur, T., Paolo, C. F., Cici, D., & Porro, C. (2020). The emerging role of curcumin in the modulation of TLR-4 signaling pathway: Focus on neuroprotective and anti-rheumatic properties. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21072299>
- Pandiyan, P., Balaraman, D., & Thirunavukkarasu, R. (2013). Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*, *5*(1), 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>

- Parra, D., Korytář, T., Takizawa, F., & Sunyer, J. O. (2016). B cells and their role in the teleost gut. *Developmental and Comparative Immunology*, *64*(July 2017), 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.013>
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., & Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, *31*(2), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.005>
- Pirarat, N., Pinpimai, K., Endo, M., Katagiri, T., Ponpornpisit, A., Chansue, N., & Maita, M. (2011). Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in Veterinary Science*, *91*(3), e92–e97. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.014>
- Plaza-díaz, J., Gómez-Illórente, C., Fontana, L., Gil, A., Plaza-díaz, J., Gómez-Illórente, C., & Fontana, L. (2014). *Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics*. *20*(42), 15632–15649. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15632>
- Ragland, S. A., & Criss, A. K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathogens*, *13*(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>
- Rahim, N. F. C., Hussin, Y., Aziz, M. N. M., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Masarudin, M. J., Abdullah, R., Akhtar, M. N., & Alitheen, N. B. (2021). Cytotoxicity and apoptosis effects of curcumin analogue (2E,6E)-2,6-Bis(2,3-Dimethoxybenzylidene) cyclohexanone (DMCH) on human colon cancer cells HT29 and SW620 in vitro. *Molecules*, *26*(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051261>
- Raorane, C. J., Lee, J. H., Kim, Y. G., Rajasekharan, S. K., García-Contreras, R., & Lee, J. (2019). Antibiofilm and antivirulence efficacies of flavonoids and curcumin against *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00990>
- Rasmussen-Ivey, C. R., Figueras, M. J., McGarey, D., & Liles, M. R. (2016). Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: In the wake of reclassification. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, *433*, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

- Reyes-Becerril, M., Ascencio-Valle, F., Meseguer, J., Tapia-Paniagua, S. T., Moriñigo, M. A., & Esteban, M. Á. (2012). *Debaryomyces hansenii* L2-enriched diet enhances the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 43(8), 1107–1118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02914.x>
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., & Barbosa-Solomieu, V. (2008). Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280(1–4), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.056>
- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. van, Llewellyn, M. S., & Beck, B. R. (2018). *Lactic Acid Bacteria in Finfish — An Update*. 9(August), 1–37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>
- Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., & Millard, P. J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2421–2431. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2421-2431.1997>
- Ruiz, M. L., Owatari, M. S., Yamashita, M. M., Victor, J., Ferrarezi, S., Garcia, P., Cardoso, L., Martins, M. L., Luiz, J., & Mourinho, P. (2019). *Histological effects on the kidney , spleen , and liver of Nile tilapia Oreochromis niloticus fed different concentrations of probiotic Lactobacillus plantarum*.
- Salem, I., Ramser, A., Isham, N., & Ghannoum, M. A. (2018). The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01459>
- Sanders, B. M., Martin, L. S., Howe, S. R., Nelson, W. G., Hegre, E. S., & Phelps, D. K. (1994). Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. In *Toxicology and Applied Pharmacology* (Vol. 125, Issue 2, pp. 206–213). <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1066>
- Sharma, G., Dang, S., K, A., Kalia, M., & Gabrani, R. (2020). Synergistic antibacterial and anti-biofilm activity of nisin like bacteriocin with curcumin and cinnamaldehyde against ESBL and MBL producing clinical strains. *Biofouling*, 36(6), 710–724. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1804553>

- Sherman, P. M., Ossa, J. C., & Johnson-Henry, K. (2009). Invited review: Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutrition in Clinical Practice*, 24(1), 10–14. <https://doi.org/10.1177/0884533608329231>
- Shokri, D., Khorasgani, M. R., Mohkam, M., Fatemi, S. M., Ghasemi, Y., & Taheri-Kafrani, A. (2018). The Inhibition Effect of Lactobacilli Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), 34–42. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9267-9>
- Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2017). An Improved crystal violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. *BioRxiv*, 1–10. <https://doi.org/10.1101/100214>
- Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Polónia, J. J., Macedo, M. A. E., & Parente, A. M. (1976). Bacterial mesosomes. Real structures of artifacts? *BBA - Biomembranes*, 443(1), 92–105. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90493-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90493-4)
- Smelt, M. J., de Haan, B. J., Bron, P. A., van Swam, I., Meijerink, M., Wells, J. M., Faas, M. M., & de Vos, P. (2013). Probiotics Can Generate FoxP3 T-Cell Responses in the Small Intestine and Simultaneously Inducing CD4 and CD8 T Cell Activation in the Large Intestine. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068952>
- Srivastava, R. (1989). Inhibition of neutrophil response by curcumin. *Agents and Actions*, 28(3–4), 298–303. <https://doi.org/10.1007/BF01967418>
- Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*, 8(JUL), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- Stosik, M. P., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W. (2019). Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes. *Central European Journal of Immunology*, 44(2), 201–205. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.87072>
- Taechavasonyoo, A., Hirono, I., & Kondo, H. (2013). The immune-adjuvant effect of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IL-1 β . *Developmental and Comparative Immunology*, 41(4), 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.003>
- Tanhay Mangoudehi, H., Zamani, H., Shahangian, S. S., & Mirzanejad, L. (2020). Effect of curcumin on the expression of ahyI/R quorum sensing genes and some associated phenotypes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* fish isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02846-x>

- Tellez-Bañuelos, M. C., Santerre, A., Casas-Solis, J., & Zaitseva, G. (2010). Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2), 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.017>
- Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J. T., Dias, D. de C., Sussel, F. R., Ishikawa, C. M., & Tachibana, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.025>
- Teow, S. Y., Liew, K., Ali, S. A., Khoo, A. S. B., & Peh, S. C. (2016). Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *Journal of Tropical Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2853045>
- Wanka, K. M., Damerau, T., Costas, B., Krueger, A., Schulz, C., & Wuertz, S. (2018). *Isolation and characterization of native probiotics for fish farming*. 1–13.
- Weiberg, D., Basic, M., Smoczek, M., Bode, U., Bornemann, M., & Buettner, M. (2018). Participation of the spleen in the IgA immune response in the gut. *PLoS ONE*, 13(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205247>
- Welker, T. L., & Lim, C. (2015). *Use of Probiotics in Diets of Tilapia*. *July*. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-014>
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W. J., Kong, I. S., & Bai, S. C. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* wb60 and *Lactococcus lactis* on growth, immune responses, histology and gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010067>
- Wu, Y., Chen, Y., Ueng, P., & Nan, F. (2016). Fish & Shellfish Immunology Effects of medicinal herbs “ *Plantago asiatica* ” , “ *Houttuynia cordata* ” and “ *Mentha haplocalyx* ” on non-specific immune responses of cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish and Shellfish Immunology*, 58, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.043>
- Wu, Y., Gong, Q., Fang, H., Liang, W., Chen, M., & He, R. (2013). Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.020>
- Xia, Y., Cao, J., Wang, M., Lu, M., Chen, G., Gao, F., Liu, Z., Zhang, D., Ke, X., & Yi, M. (2019). Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on colonization dynamics

of gut microbiota and regulation of immunity in early ontogenetic stages of tilapia. *Fish and Shellfish Immunology*, 86, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.022>

- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H., & Yi, M. (2018). Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 76, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.020>
- Xing, C. F., Hu, H. H., Huang, J. bin, Fang, H. C., Kai, Y. H., Wu, Y. C., & Chi, S. C. (2013). Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(4), 1122–1128. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.021>
- Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(6), 496–501. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834baa4d>
- Yang, X.-F. (2008). Factors regulating apoptosis and homeostasis of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells are new therapeutic targets. *Frontiers in Bioscience*, 13, 1472–1499.
- Yin, Z., & Kwang, J. (2000). Carp interleukin-1 β in the role of an immuno-adjuvant. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(4), 375–378. <https://doi.org/10.1006/fsim.1999.0241>
- Yuandani, Jantan, I., Rohani, A. S., & Sumantri, I. B. (2021). Immunomodulatory Effects and Mechanisms of Curcuma Species and Their Bioactive Compounds: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 12(April), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643119>
- Zdanowicz, M., Mudryk, Z. J., & Perliński, P. (2020). Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. *Veterinary Research Communications*, 44(1), 9–18. <https://doi.org/10.1007/s11259-020-09768-x>
- Zhang, X., Wang, Y., Liu, L., Wei, Y., Shang, N., Zhang, X., & Li, P. (2016). Two-peptide bacteriocin PlnEF causes cell membrane damage to *Lactobacillus plantarum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.018>
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., Lapatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, 11(9), 827–835. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>

Zhao, G. J., Lu, Z. Q., Tang, L. M., Wu, Z. S., Wang, D. W., Zheng, J. Y., & Qiu, Q. M. (2012). Curcumin inhibits suppressive capacity of naturally occurring CD4 +CD25+ regulatory T cells in mice in vitro. *International Immunopharmacology*, 14(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.06.016>

Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/biology5020023>



10. ANEXO





Antibacterial activity of supernatants of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* and curcumin against *Aeromonas hydrophila*. In vitro study

David Ibarra-Martínez¹ · Martín Humberto Muñoz-Ortega² · Andrés Quintanar-Stephano² · Sandra Luz Martínez-Hernández³ · Manuel Enrique Ávila-Blanco¹ · Javier Ventura-Juárez¹

Received: 17 June 2021 / Accepted: 10 November 2021
 © The Author(s), under exclusive license to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Secretions of beneficial intestinal bacteria can inhibit the growth and biofilm formation of a wide range of microorganisms. Curcumin has shown broad spectrum antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial potential. It is important to evaluate the influence of these secretions with bioactive peptides, in combination with curcumin, to limit growth and inhibit biofilm formation of pathogenic bacteria of importance in aquaculture. In the present study, the supernatants of *Lactococcus lactis* NZ9000, *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Pediococcus pentosaceus* NCDO 990, and curcumin (0, 1, 10, 25 and 50 μ M) were used to evaluate their efficacy in growth, inhibition biofilm and membrane permeability of *Aeromonas hydrophila* CAIM 347 (*A. hydrophila*). The supernatants of probiotics and curcumin 1, 10 and 25 μ M exerted similar effects in reducing the growth of *A. hydrophila* at 12 h of interaction. The supernatants of the probiotics and curcumin 25 and 50 μ M exerted similar effects in reducing the biofilm of *A. hydrophila*. There is a significant increase in the membrane permeability of *A. hydrophila* in interaction with 50 μ M curcumin at two hours of incubation and with the supernatants separately in the same period. Different modes of action of curcumin and bacteriocins separately were demonstrated as effective substitutes for antibiotics in containing *A. hydrophila* and avoiding the application of antibiotics. The techniques implemented in this study provide evidence that there is no synergy between treatments at the selected concentrations and times.

Keywords Curcumin · Probiotics · *Aeromonas hydrophila* · Aquaculture · Biofilm · Membrane permeability

Introduction

According to Food and Agriculture Organization (FAO) statistics (2012), aquaculture is the fastest growing productive food sector of animal origin, with an average annual increase of 6% in the period from 1990 to 2010 (Reverter et al. 2014).

In the last 30 years, aquaculture has been the fastest growing sector worldwide (Acar et al. 2015). However, mortality due to infectious diseases represents the greatest economic loss in the aquaculture industry (Gairmales et al. 2014). Such is the case of *A. hydrophila*, one of the most predominant pathogens in aquaculture and the cause of significant economic losses in the industry (Tellez-Batuelles et al. 2010). *A. hydrophila* is a gram-negative bacterium and shows motility (Wang et al. 2019). *Aeromonas* pathogenesis is complex and multifactorial, this includes O antigen, lipopolysaccharide capsule, S layer, constitutive polar flagellum, inducible lateral flagellum and iron-binding system and multiple regulatory mechanisms for biofilm formation (Allan and Stevenson 1981; Dooley and Trust 1988; Zhang et al. 2002; Rasmussen-Ivey et al. 2016). It has a great variety of virulence factors such as: adhesins, hemolysins, lipases, and proteases, including the cytotoxic enterotoxin A (Act), which is a substrate for the type 2 secretion system (T2SS) and enzymes such as ADP-ribosyltransferases and DNases (Chopra and

Javier Ventura-Juárez
jventura@cornos.uas.mx

¹ Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad 940, Ciudad Universitaria, Edificio 202, 20100 Aguascalientes, Mexico

² Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

³ Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico

⁴ Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico