



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

T E S I S

**RELACIÓN ENTRE LA IRIDISCENCIA BACTERIANA Y LA PATOGENICIDAD EN
CEPAS AISLADAS DE CULTIVOS ACUÍCOLAS: UN ANÁLISIS PRELIMINAR**

PRESENTADA POR
FERNANDO GUADALUPE MATA TORRES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Directora de tesis

Dra. Ivone Giffard Mena

Co-Directora de tesis

Dra. Natalie Millán Aguiñaga

Sinodal

Dra. Mónica Torres Beltrán

Sinodal

Dr. Israel Rocha Mendoza

junio 2025, Ensenada, Baja California.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

RELACIÓN ENTRE LA IRIDISCENCIA BACTERIANA Y LA
PATOGENICIDAD EN CEPAS AISLADAS DE CULTIVOS ACUÍCOLAS:
UN ANÁLISIS PRELIMINAR

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA:

FERNANDO GUADALUPE MATA TORRES

Aprobada por:



Dra. Ivone Giffard Mena
Directora de tesis



Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Co-Directora de tesis



Dra. Mónica Torres Beltrán
Sinodal



Dr. Israel Rocha Mendoza
Sinodal

Dedicatoria

Para Yolanda y Jorge mis queridos viejos, por ser la raíz firme que me sostiene y el faro que siempre me guía. Su amor incondicional, esfuerzo y ejemplo han sido el impulso más grande para perseguir mis metas, incluso cuando el camino ha sido incierto. El trabajo honrado y respeto por lo que haces, son palabras que siempre recordare de usted.

A mis hermanos Karlo, Gustavo y Edgar y sobrinos Pauline, Nicolás y Santiago, por estar presentes a su manera en mi vida. Compartiendo su alegría, apoyo y cariño. Son parte esencial de mi motivación, recordándome que siempre hay algo por lo cual luchar y mejorar. Jamás hay que dejar a un lado lo que nos gusta y siempre escuchar a ese niño interior que uno lleva dentro.

A todas las personas que encuentran en el mar una fuente de vida, cuidado, inspiración y respeto. Este trabajo también es para ustedes, que ven en los océanos no solo un recurso, sino una herencia que debemos proteger con ciencia, conciencia y corazón.

*Lo que conocemos es una gota,
lo que no conocemos es un océano.*

-Isaac Newton-

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), y a la Dirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) por brindarme la oportunidad de realizar mi grado de Maestría, por el uso de espacios físicos, laboratorios, recursos, personal y, por el tiempo otorgado para concluir este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada durante dos años (No: 1233912)

A la Dra. Ivone Giffard Mena, mi directora de tesis desde la licenciatura, quien ha sido mucho más que una mentora académica: ha sido una guía, un ejemplo y una inspiración constante. Me formé bajo su mirada crítica y generosa, y hoy soy un reflejo de su entrega y dedicación. Gracias por compartir su sabiduría sin reservas, y por acompañarme en este largo camino con la paciencia de una guía y la calidez de una amiga. Más que una docente, ha sido mi *sensei*. Este logro también es suyo.

A la Dra. Natalie Millán, por ser quien me abrió las puertas al fascinante mundo de las bacterias y amplió mi perspectiva del conocimiento con su visión crítica y profunda. Trabajar con usted ha sido un privilegio; agradezco su confianza, su acompañamiento y el impacto que ha tenido en mi formación. Mi más profundo respeto y admiración hacia su trayectoria, que sin duda representa una fuente constante de inspiración para mí.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme realizar parte de mi investigación en sus instalaciones en el departamento de óptica en la División de Física Aplicada, bajo el mando del Dr. Israel Rocha.

Al laboratorio de Salud Animal de la FCM y con énfasis hacia el Dr. Samuel Sánchez Serrano. Por acompañarme, aconsejarme y el apoyo demostrado durante todo el periodo de mi formación técnica, profesional y de posgrado. No hay palabras para expresar mi gratitud hacia usted, su área y su trabajo.

Al laboratorio de Nutriaqua del IIO a cargo de la Dra. María Teresa Viana Castrillón y a su equipo por brindar apoyo con espacios físicos y dietas formuladas para mantener los camarones. También agradecer al Laboratorio Aquapacific, S.A. de C.V. por las postlarvas facilitadas de camarón blanco utilizadas para este trabajo.

A los *nenis*, Leah, Alejandra, Ismael, Edgar por todos los momentos buenos y malos, risas, fiestas, experiencias y conocimientos compartidos, fueron personas que hicieron del posgrado una mejor experiencia.

A los alumnos del curso de Técnicas de Análisis Genéticos en Acuicultura 2022-2. A Sasha, Marilyn, Belén, Hector y Daniela por el aislamiento de cepas bacterianas que fueron trabajadas en esta investigación.

Resumen

Durante eventos de epizootias en sistemas acuícolas de Baja California (BC), se aislaron 17 cepas bacterianas iridiscentes a partir de muestras de agua y tejidos de organismos cultivados, de las cuales 9 fueron seleccionadas para su caracterización integral. Estas cepas pertenecieron a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Mammaliicoccus*, *Micrococcus* y *Microbacterium*. Las técnicas microbiológicas convencionales utilizadas para la identificación taxonómica presentan limitaciones, por lo que se integraron medios cromogénicos, análisis bioquímicos y herramientas genómicas para lograr una caracterización más precisa. Se detectaron 3 diferentes tipos de iridiscencia bacteriana; tipo arcoíris, difusa pastel y metálica, siendo esta última particularmente intensa en cepas del género *Vibrio*. Este fenómeno óptico no solo se identificó como un rasgo fenotípico, sino que la presencia de genes de virulencia y resistencia tienen correlación con la patogenicidad. Las cepas iridiscentes patógenas, como *Vibrio alginolyticus* (Va-H₂Oubp) y *V. parahaemolyticus* (VpEMS-15), presentaron tiempos de duplicación cortos y elevada tolerancia a salinidad, características que favorecen su capacidad infectiva. La cepa VpEMS-15 aislada de un brote de AHPND en Mexicali, BC, fue positiva para genes *toxR* y *tlh*, factores implicados en la patogenicidad de bacterias del género *Vibrio* y desplegó una iridiscencia metálica intensa. A nivel genómico, se detectaron genes asociados a virulencia (adhesinas, pillus tipo IV, quitinasas) en el 80% de los genomas analizados, así como genes de resistencia antimicrobiana, como *ampC* y *mecA1*, además de genes de resistencia a metales pesados como *merA* y *arsR*. Si bien la iridiscencia aún no se asocia directamente con genes específicos, en ciertas cepas iridiscentes patógenas se ha encontrado un patrón donde la iridiscencia podría ligarse a mecanismos de adhesión o formación de biopelículas que favorecen la patogenicidad.

Palabras clave: Iridiscencia, *Vibrio*, organización celular, patogenicidad, adhesinas, genes de resistencia, ensamblaje pilar, quitinasas.

Índice

1. Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	4
2.1.- Acuicultura en Baja California.....	4
2.2.- Eventos de epizootias en Baja California.....	5
2.3.- Organismos procariotas.....	6
2.4.- Bacterias iridiscentes con interés clínico.....	7
2. Justificación.....	9
3. Hipótesis.....	10
5. Objetivos.....	10
5.1 Objetivo general.....	10
5.2. Objetivo específico.....	10
6. Metodología.....	11
6.1. Procedencia de cepas bacterianas.....	11
6.1.2. Obtención de muestras para cultivo bacteriano.....	11
6.1.3. Criopreservación de cepas bacterianas.....	13
6.2. Identificación taxonómica filogenética y bioquímica.....	13
6.2.1. Análisis filogenético.....	13
6.2.2. Prueba Microplate-Gen III.....	14
6.3. Pruebas microbiológicas.....	15
6.3.1. Inoculación en medios de cultivo sólidos generales.....	15
6.3.2. Preparación e inoculación de medios de cultivo líquidos.....	15
6.3.3. Cinética bacteriana.....	16
6.3.4. Crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de NaCl.....	17
6.4. Análisis de iridiscencia bacteriana.....	17
6.4.1. Determinación de presencia/ausencia de iridiscencia en colonias bacterianas.....	17
6.4.2. Aislamiento y purificación de colonias de interés iridiscentes.....	18
6.5. Análisis físico/óptico.....	18
6.5.1. Parámetros para la obtención de imágenes de iridiscencia bacteriana.....	18
6.5.2. Obtención de imágenes de iridiscencia bacteriana.....	19
6.6. Análisis molecular.....	20
6.6.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	20
6.6.2. Amplificación del gen ARNr 16S por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	20
6.6.3. Secuenciación genómica.....	21
6.6.4. Análisis de potencial patógeno.....	21

6.6.5. Antibiogramas.....	23
6.6.6. Análisis de genes relacionados con el fenómeno de iridiscencia	24
6.7. Bioensayos de patogenicidad.....	24
6.7.1. Declaración de ética	24
6.7.2. Material biológico	25
6.7.3. Generación de inóculo bacteriano.....	25
6.7.4. Determinación de la concentración letal media (DL ₅₀).....	25
6.7.5. Bioensayos de infección con dosis específica.	26
6.8. Análisis estadístico.....	26
7. Resultados.....	28
7.1. Caracterización general de cepas bacterianas.....	28
7.1.1. Procedencia	28
7.1.2. Identificación taxonómica bioquímica y filogenética.....	31
7.1.3. Morfología de colonias en medio de cultivo.....	34
7.1.4. Cinética bacteriana (curvas de crecimiento y requerimientos de sal)	38
7.2. Análisis de iridiscencia de cepas bacteriana.....	42
7.2.1. Análisis y caracterización óptica.....	42
7.2.2. Genes relacionados con la iridiscencia	46
7.3. Análisis del potencial patogénico de las cepas bacterianas.....	47
7.3.1. Potencial genómico de patogenicidad y de resistencia	47
7.3.2. Pruebas de sensibilidad química (antibiogramas)	53
7.3.3. Análisis genómico	54
7.3.4. Bioensayos de patogenicidad	59
8. Discusiones.....	66
9. Conclusiones	75
10. Perspectivas a futuro	77
11. Referencias.....	77

Lista de figuras

Figura 1. Clasificación de las cepas aisladas durante epizootias acuícolas en Baja California (n=9 cepas aisladas).....	31
Figura 2. Árbol filogenético de las nueve cepas aisladas a partir de cultivos acuícolas.	34
Figura 3. Purificación de colonias bacterianas aisladas a partir de epizootias en cultivos acuícolas.	36
Figura 4. Colonias bacterianas en medio de cultivo ChromAgar™ específico para bacterias del género <i>Vibrio</i> spp.	37
Figura 5. Curvas de crecimiento de bacterias iridiscentes aisladas en cultivos acuícolas.	39
Figura 6. Crecimiento de bacterias iridiscentes en gradientes de NaCl.....	41
Figura 7. Iridiscencia bacteriana de 9 cepas aisladas a partir de epizootias en cultivos acuícolas.	43
Figura 8. Características de iridiscencia bacteriana en cepas iridiscentes aisladas a partir de epizootias acuícolas.....	45
Figura 9. Análisis de matriz ResFinder con genes adquiridos y mutaciones cromosómicas de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootia.....	48
Figura 10. Presencia de genes adquiridos y de resistencia a fármacos basados en KmerResistance de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootia.....	50
Figura 11. Matriz AMRfinder de genes adquiridos y mutaciones cromosómicas de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootia.	52
Figura 12. Sensibilidad química de bacterias iridiscentes aisladas a partir de epizootias acuícola.	54

Figura 13. Datos genómicos obtenidos de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootias.	56
Figura 14. Grupos de genes biosintéticos encontrados en el metabolismo secundario de distintas bacterias aisladas durante eventos de epizootias.	58
Figura 15. Peso y talla de postlarvas de camarón blanco (<i>Penaeus vannamei</i>) durante el acondicionamiento inicial para bioensayos.....	59
Figura 16. Peso y talla de postlarvas de camarón blanco (<i>Penaeus vannamei</i>), utilizadas durante las infecciones experimentales con bacterias iridiscentes.	60
Figura 17. Curvas de sobrevivencia de <i>Penaeus vannamei</i> infectado experimentalmente con la cepa VpEMS-15.	61
Figura 18. Tasa de mortalidad acumulada en pl's de camarón blanco, generada por la cepa VpEMS-15.	62
Figura 19. Implementación de prueba Probit para el cálculo de dosis media letal (LC50).	63
Figura 20. Mortalidad registrada por tres cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> (VpEMS-15, Bi-HpVm y Bi-BrC4) iridiscentes.	64
Figura 21. Curvas de sobrevivencia de <i>Penaeus vannamei</i> infectado experimentalmente con seis cepas bacterianas.	65

Lista de tablas

Tabla I. Bacterias aisladas de diferentes puntos de muestreo durante eventos de epizootias en cultivos acuícolas en Baja California.....	29
Tabla II. Cepas bacterianas purificadas con índice bajo de contaminación de ADN genómico.....	30
Tabla III. Identificación bioquímica de la huella fenotípica de nueve cepas bacterianas iridiscentes basados en el kit de Biolog - Gen III.....	32
Tabla IV. Tiempos de duplicación de nueve cepas bacterianas iridiscentes	40
Tabla V. Presencia / ausencia de genes relacionados con quitinasa, adhesinas y ensamblaje pilar en nueve cepas iridiscentes aisladas durante epizootias acuícolas...	46
Tabla VI. Halos de inhibición generados por nueve cepas bacterianas iridiscente	53

1. Introducción

El ambiente marino presenta características dinámicas, lo que obliga a los organismos a adaptarse para sobrevivir (Tadepalli et. al., 2017). En respuesta a estas condiciones, algunos microorganismos procariotas desarrollan arreglos estructurales específicos como estrategia de supervivencia. Dichos arreglos facilitan la reflexión de la luz, generando patrones de colores iridiscentes característicos (Sullivan et al., 2023). El color que se genera por el fenómeno de iridiscencia, se define como un efecto óptico del color estructural (Vukusic & Sambles, 2003). Se ha evidenciado que este efecto no depende de la presencia de pigmentos o secreciones químicas, ni tampoco se produce como respuesta a reacciones bioquímicas (Johansen et al 2018).

En diversos entes biológicos, se manifiesta debido a la interacción de la luz con el ordenamiento periódico de estructuras de tamaños que van desde algunas micras hasta unos pocos nanómetros. Se ha documentado que algunas especies de bacterias presentan el fenómeno de iridiscencia, debido a los arreglos geométricos microestructurales (flagelos, pillus, fimbrias y matrices de biopelículas) de la superficie de las células procariotas (Johansen et al., 2018; Kientz et. al. 2016; Mata, 2022; Vukusic et. al., 2003), manifestando distintos patrones de colores e.g. tornasol o cambiantes que dependen del ángulo de incidencia de la luz sobre las colonias y de la cepa analizada (Johansen et al., 2018; Kientz et. al. 2016; Mata, 2022; Vukusic et. al., 2001; Sullivan et al 2023).

Los géneros bacterianos en los que se ha documentado la presencia de iridiscencia son; *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Haemophilus* y *Bacillus* (Johansen et al., 2018; Mata, 2022; Schafhauser et. al., 2014; Vásquez, 2021; Yang et. al., 2022; Zierdt, 1971). En algunas cepas de estos géneros se caracterizado y descrito la propiedad de iridiscencia, debido a su estatus patógeno por causar enfermedades en

organismos marinos, plantas e incluso en el humano (Hoffman et. al., 2009; Lucas et. al., 2021; Montes, 2022).

La patogenicidad de los microorganismos procariotas es un proceso complejo y multifacético, mediante el cual estos agentes etiológicos accionan diversos mecanismos para invadir, colonizar y dañar a sus huéspedes (Varela y Choc, 2020; Yang et. al., 2022). Para ello utilizan diversos elementos, como factores de virulencia, moléculas de adhesión, toxinas, sistemas de secreción y estrategias para evadir el sistema inmune (Lucas et. al., 2021). En particular, los factores de virulencia permiten a los patógenos evitar las defensas del huésped, replicarse e inducir enfermedades y mortalidad (Montes, 2022).

Sin embargo, la relación entre la iridiscencia bacteriana y la patogenicidad de las cepas que afectan a cultivos de interés para la acuicultura está muy poco explorada, y hay pocas evidencias que permiten inferir si existe una relación directa entre ellas. Se considera que la propiedad de iridiscencia podría revelar un nivel de complejidad estructural ventajosa para un patógeno (Choez et. al., 2021; Mata, 2022). Se han documentado algunas especies bacterianas con potencial patógeno tales como, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *V. alginolyticus* (Choez et. al., 2021; Mata, 2022; Thomas et al., 2014) en las que la presencia de estructuras morfológicas que producen iridiscencia pueden ser una adaptación que les de ventaja para sobrevivir en ambientes específicos (Doucet & Meadow, 2009; Kinoshita et. Al., 2008).

Esta adaptación podría estar relacionada con un alto nivel de colonización y, por ende, que favorezca su patogenicidad (Doucet & Meadow, 2009; Kinoshita et. al., 2008). Por lo que, evaluar la relación entre la iridiscencia y patogenicidad de cepas bacterianas surge como un área de estudio relevante, que vincula el comportamiento microbiano con factores ambientales y la dinámica de las enfermedades que afectan a organismos de interés económico (Kientz et al., 2012; Johansen, 2018; Lucas et. al., 2021).

Actualmente, la acuicultura se considera un sector vital para la producción de alimentos y proveedor de una parte fundamental del suministro mundial de productos marinos (FAO, 2022) y presenta diversos retos. En particular, la incidencia de bacterias patógenas en cultivos acuícolas representa un desafío recurrente, en el que el impacto multifacético que generan las epizootias, afecta a los ecosistemas, a la salud de los organismos y a la viabilidad económica de las empresas (FAO, 2022; Yang et. al., 2022).

Bacterias patógenas pertenecientes a los géneros de *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Photobacterium* y *Flavobacterium* se transmiten a los cultivos a través del agua, por ingesta, por el contacto directo de los organismos infectados o mediante vectores, causando enfermedades graves en peces, moluscos y crustáceos lo cual deriva rápidamente en problemas infecciosos que son difíciles de controlar (Austin & Austin, 2016). Los organismos acuáticos infectados por bacterias patógenas, manifiestan tasas de crecimiento reducidas, función inmune atenuada y respuestas al estrés limitada. Estos deterioros fisiológicos dan como resultado una disminución de la salud de los organismos de cultivo y de la calidad general del producto, derivando en grandes pérdidas económicas para las empresas acuícolas (Yanong, Francis-Floyd & Petty, 2021).

Además, las altas tasas de mortalidad en los sistemas de acuicultura provocan un incremento en las concentraciones de nutrientes que a su vez propicia la proliferación de más bacterias, florecimientos algales nocivos y agotamiento de oxígeno (Lassudrie, Hégaret & Wikfors, 2020). A esto se le suma el uso indiscriminado de antibióticos utilizados para controlar los brotes que incrementa gradualmente la resistencia de las bacterias a estos fármacos, comprometiendo la calidad del medio ambiente y de la salud humana (García, 2022; Yagui, 2024). Para mitigar estos problemas es necesario desarrollar e implementar estrategias de monitoreo, diagnóstico, prevención y gestión de

enfermedades, extremar medidas de bioseguridad efectivas, realizar monitoreos microbiológicos y hacer un uso responsable de antibióticos.

Con base en lo anterior, evaluar la relación entre la iridiscencia y patogenicidad de cepas bacterianas puede contribuir al desarrollo de estrategias de monitoreo, diagnóstico y prevención de bajo costo y una eficiente velocidad de respuesta a la presencia de cepas con potencial patógeno en los cultivos acuícolas. Por lo que el objetivo de este trabajo es caracterizar biológica y ópticamente bacterias patógenas y evaluar si existe una relación entre el fenómeno de iridiscencia y su patogenicidad en cultivos de crustáceos.

1. Antecedentes

2.1.- Acuicultura en Baja California

Baja California se ha consolidado como una de las regiones más relevantes para la industria acuícola en México, impulsada por avances tecnológicos y el impulso productivo en la zona noroeste del país (Martínez, 2018). Actualmente, el estado aporta 295,050 toneladas de peso vivo de pescado y mariscos, lo que equivale aproximadamente al 13.72% del valor total de la producción nacional, posicionándolo en el tercer lugar a nivel nacional en esta industria (Martínez, 2018).

Hace una década, operaban cerca de 87 unidades de producción acuícola en el estado, de las cuales la mitad se ubican en zonas rurales remotas, generando impacto económico significativo en esas comunidades (Giffard et al., 2014; Martínez, 2018). En 2017, 14 granjas acuícolas en el Valle de Mexicali y San Felipe producían más de 41 toneladas de camarón por temporada en sus picos de operación (Martínez, 2018), mientras que para 2023 se encontraban operando 262 unidades de producción acuícola en todo el estado (Conapesca, 2023).

La acuicultura en Baja California ha experimentado un crecimiento sostenido, respaldada por inversiones tanto del gobierno como de productores locales. La región ha sido pionera en el cultivo de especies marinas durante décadas, con una notable concentración de granjas acuícolas en áreas clave como el Valle de Mexicali, San Quintín y Guerrero Negro. En particular, el cultivo de ostión en Bahía Falsa (San Quintín), Laguna Manuela (Villa Jesús María) y en la parte norte de la Laguna de Guerrero Negro, que lleva más de 50 años, ha sido un pilar fundamental para la acuicultura nacional (INAPESCA, 2018), posicionando a Baja California en un lugar destacado para la producción de pescados y mariscos.

Aunque la mayoría de las cosechas del estado se destinan a la exportación, es necesario importar semillas o larvas de forma continua. En Baja California se cultivan más de 15 especies acuícolas, entre ellas camarón, ostión, almejas, abulón, peces marinos, peces de ornato y macroalgas (CONAPESCA, 2023; INAPESCA, 2018; Martínez, 2018), reafirmando la relevancia de la acuicultura en la región. Además, actualmente se están implementando proyectos de conversión en cooperativas pesqueras (Bauer et. al., 2020; Eger et. al., 2024) y cultivando nuevas especies acuícolas, lo que refuerza aún más el desarrollo de la acuicultura en el estado.

2.2.- Eventos de epizootias en Baja California

Al igual que en otros lugares de la república mexicana, en Baja California se han registrado diversas epizootias virales acuícolas que han afectado principalmente a la industria camaronera y de peces de agua dulce. Entre las más importantes se encuentra el Síndrome de Taura (TSV), detectado desde finales de la década de 1990 en cultivos de camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) en Baja California Sur, causando alta mortalidad en postlarvas y juveniles (Lightner, 2011).

De manera similar, el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) ha sido endémico desde principios de los 90, afectando al camarón con deformidades y reducción en el crecimiento. Asimismo, el Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), identificado en 1999, ha generado recurrentes brotes de mortalidad en la región del Golfo de California, vinculados a condiciones ambientales adversas. Del mismo modo, enfermedades bacterianas como la vibriosis han sido recurrentes en especies como tilapia y en el camarón, registrándose brotes especialmente notorios en los años 2008 hasta 2015 (Austin & Austin, 2012). Por otro lado, la saprolegniasis, una infección fúngica, ha afectado de manera esporádica a tilapias y carpas, sobre todo en el 2010 y 2012.

Además, en 2013 se documentó la aparición del Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS/AHPND) en granjas camaroneras de Baja California Sur, evidenciando la vulnerabilidad de los cultivos ante patógenos emergentes (Tran et al., 2013). La recurrencia de estas epizootias resalta la importancia de mantener estrictas medidas de bioseguridad y vigilancia sanitaria en la región, así como para desarrollar estrategias para mitigar su impacto productivo.

2.3.- Organismos procariotas

Una bacteria se puede definir como un organismo unicelular caracterizado por la ausencia de un núcleo definido y orgánulos membranosos intracelulares, cuyo material genético se encuentra generalmente en una molécula circular de ADN bicatenario en el citoplasma, denominado nucleoide (UPV, s.f). Las bacterias presentan una gran diversidad morfológica, estructural y funcional, lo cual les permite adaptarse a una amplia variedad de ambientes y condiciones extremas.

La estructura básica de una bacteria incluye una membrana plasmática, una pared celular que puede ser de composición variable (principalmente peptidoglicano), y en algunas especies, una cápsula externa que proporciona protección y adhesión a superficies. Además, pueden poseer apéndices como

flagelos, responsables de su motilidad, o fimbrias y pillus, involucrados en la adhesión y la transferencia horizontal de genes (UNAM, 2023).

Las bacterias pueden ser clasificadas según su morfología (cocos, bacilos, espirilos), o dependiendo de la estructura de su pared celular pueden ser clasificadas como gram positivas o negativas (González, 2021). Además, por su metabolismo se las puede catalogar como aerobias, anaerobias, autótrofas, heterótrofas, entre otros criterios. Además, juegan un papel fundamental en la ecología global, actuando como degradadoras y remineralizadoras, fijadoras de nitrógeno, simbioses, o patógenos en diversos organismos, y son capaces de intercambiar información genética mediante mecanismos como la conjugación, transformación y transducción, lo cual ha permitido su rápida evolución y adaptación, incluyendo el desarrollo de resistencia a antibióticos (González, 2021).

Anteriormente se pensaba que todas las bacterias son patógenas, pero hoy en día se sabe que existen tanto bacterias patógenas como benéficas para la salud animal. Las bacterias patógenas causan daño y suelen seguir un proceso que incluye la colonización, invasión y producción de toxinas. Algunas poseen factores de virulencia que les permiten evadir las defensas del huésped. Este proceso implica diversos mecanismos y factores que favorecen la supervivencia bacteriana en entornos estresados, lo que a su vez destaca la interacción compleja entre la patogenicidad y las condiciones ambientales, como la calidad del agua y la disponibilidad de nutrientes (González, 2021).

2.4.- Bacterias iridiscentes con interés clínico

Estudios recientes han demostrado que cada cepa bacteriana posee una huella óptica única, la cual se explica no sólo por sus dimensiones físicas, sino principalmente su capacidad de autoorganizarse localmente en redes definidas (Johansen et al 2018). Además, se ha evidenciado que la formación de estas

redes está influenciada por la comunicación y la motilidad intercelular como lo sugiere Kientz et al. (2012).

La movilidad de deslizamiento es necesaria para obtener una organización eficiente de la colonia y observar una fuerte respuesta óptica como la iridiscencia (Johansen et al., 2018). Sin embargo, la motilidad por sí sola no es suficiente para producir un orden significativo. La alta organización celular de las bacterias puede estar relacionada con la fotoprotección de las bacterias o del huésped o con la organización óptima para degradar polímeros biológicos, siendo el color estructural una consecuencia secundaria (Johansen et al 2018).

Se han documentado diversos estudios, revisiones y evidencias sobre cepas patógenas de diferentes géneros/especies que exhiben una iridiscencia óptica específica (Johansen et. al., 2018; Kientz et. al., 2012; Kientz et. al., 2016). Por ejemplo, ciertas cepas bacterianas presentan un efecto de iridiscencia tipo metálica, a la cual se le atribuye una relación directa con la lisis celular (Don & Van den Ende, 1950: Kientz et. al., 2012) y con la producción de sustancias derivadas de la quinolona que potencialmente inhiben la síntesis del ADN (Cugin et. al., 2010: Wensinck, 1967).

Bajo condiciones de cultivo en el laboratorio, ha sido posible observar el fenómeno de iridiscencia por medio de la técnica de transiluminación, con la que se observó un encapsulamiento celular bien definido en las colonias, mostrando toda la gama de colores espectrales, desde el rojo hasta el azul. Con esta técnica se logró detectar la presencia de iridiscencia de varias bacterias, incluidas cepas de *Pasteurella multocida* (Heddleston & Wesseman, 1975), bacterias del grupo *coli tifoideas* (Luppi et al., 1986). En un caso específico relevante para la acuicultura, una cepa de *V. alginolyticus* resultó iridiscente y se asoció a la patogenicidad generada al infectar camarón blanco (Mata, 2022).

Hasta la fecha, el efecto óptico de iridiscencia en los organismos procariotas no se ha asociado con la patogenicidad de manera directa. Sin embargo, la combinación de técnicas de cultivo bacteriano en placa y herramientas ópticas como la técnica de transiluminación, permite el monitoreo microbiológico directo mediante la detección de la iridiscencia en colonias bacterianas cultivadas en condiciones controladas (Kientz et. al., 2016). Esto puede funcionar como indicativo del potencial patogénico de la cepa analizada. Además, se puede considerar sumar técnicas moleculares específicas que permitan la detección de genes que codifican para la motilidad o características específicas de la membrana que contribuyen al arreglo ordenado de las células bacterianas y resultan en el efecto óptico de iridiscencia.

2. Justificación

Los cambios abruptos en las condiciones ambientales favorecen la proliferación de bacterias con potencial patogénico incrementan el riesgo de diseminación de enfermedades que impactan negativamente la producción de la industria acuícola global. Entre las bacterias más relevantes para la acuicultura se encuentra el género *Vibrio*, que incluye diversas especies patógenas capaces de causar infecciones severas en organismos de cultivo como el camarón. La relevancia de *Vibrio* radica no solo en su alta virulencia, sino también en su persistencia en ambientes acuáticos y su notable capacidad de adaptación a condiciones de estrés.

Se ha observado que algunas especies de *Vibrio* desarrollan iridiscencia, por lo que detectar este fenómeno óptico en las cepas de este género podría funcionar como un indicador visual de la presencia de especies altamente virulentas. Sin embargo, hasta el momento, se ha documentado muy poco sobre la relación entre patogenicidad e iridiscencia bacteriana en la acuicultura, lo cual representa una brecha en el conocimiento y una limitación en los sistemas de monitoreo y prevención de enfermedades.

Evaluar esta relación podría ser clave para mejorar la detección temprana y precisa de cepas patógenas en los sistemas de cultivo, facilitando la implementación de medidas preventivas y de control que minimicen el impacto de estas bacterias en la producción acuícola. En este sentido, analizar la posible relación entre iridiscencia y patogenicidad en bacterias del género *Vibrio* contribuiría significativamente al desarrollo de estrategias efectivas para la gestión de enfermedades y a la mejora de la sostenibilidad de las prácticas de cultivo acuícola.

3. Hipótesis

Las cepas bacterianas iridiscentes aisladas de cultivos acuícolas pertenecen al género *Vibrio*. Se plantea que la manifestación de iridiscencia se asocia positivamente con un elevado potencial patogénico, lo que contribuye al aumento de mortandad en los organismos cultivados.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Determinar la relación entre la presencia de iridiscencia y el grado de patogenicidad de cepas bacterianas aisladas en cultivos acuícolas.

5.2. Objetivo específico

- 1) Aislar y purificar cepas de bacterias iridiscentes a partir de muestras obtenidas de organismos y sistemas acuícolas.
- 2) Identificar a nivel de género y especie las cepas aisladas mediante pruebas microbiológicas, bioquímicas y moleculares.

- 3) Evaluar el potencial patogénico de las cepas a través de ensayos *in vivo* en camarón blanco.
- 4) Establecer la correlación entre patogenicidad y la presencia de genes de asociados a la iridiscencia, estructurales, virulencia y metabolitos secundarios mediante análisis genómico bacteriano.

6. Metodología

6.1. Procedencia de cepas bacterianas

6.1.2. Obtención de muestras para cultivo bacteriano

El 24 de agosto del 2022 se realizó un muestreo en la granja acuícola de camarón blanco Promar 57, ubicada en el Valle de Mexicali, B.C. Cabe resaltar que en esta empresa los cultivos se desarrollan a una salinidad inferior a 5 unidades prácticas de salinidad (ups). Se empleó una red atarraya de 1.5 m de radio para la captura de los camarones y posteriormente se realizaron extracciones y disecciones para obtener muestras de hemolinfa (he), hepatopáncreas (hp) y branquias (br). Además, se evaluó el estado de salud de los organismos (n=27) y se investigó la presencia de agentes etiológicos a partir de los tejidos analizados y en el agua de los estanques.

Para obtener la he, se sujetó al camarón exponiendo la parte ventral y con una jeringa de insulina se punzó el hemocele para obtener la muestra. Para el hp, se separó el cefalotórax del abdomen y una vez expuesto el órgano se extrajo con pinzas estériles. Las br que se extrajeron fueron las de la parte lateral derecha del cefalotórax, se removió con precaución el exoesqueleto y de esta manera se expusieron las lamelas branquiales. Todas las muestras fueron inoculadas por medio de frotis en fresco de forma directa, sobre cajas petri con medio TSA 2% NaCl y TCBS, las cajas fueron selladas con papel parafilm, etiquetadas, transportadas al laboratorio y finalmente, incubadas a 28 °C durante 24-120 horas.

Las muestras de agua fueron colectadas en frascos de plástico estériles de 50 mL, a dos diferentes profundidades: la primera corresponde a superficie (3 cm) y la segunda fue de fondo (1 m). Se obtuvieron muestras por duplicado del estanque uno (E1) y del estanque dos (E2) de la granja. Las muestras de agua fueron directamente inoculadas en medio de cultivo TSA al 0 y 1% de NaCl después del muestreo utilizando la muestra directa y dos diluciones seriadas (1:10) de 10^{-3} y 10^{-6} para cada medio de cultivo.

El proceso de siembra en placa fue realizado con asas de madera estériles por duplicado para las muestras de superficie y las de fondo. Posterior a esto, se colocó papel parafilm a cada placa para sellarlas y evitar contaminación. Finalmente se colocaron en bolsas de plástico dentro de hieleras y se trasladaron al laboratorio de Ecología Molecular en la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), UABC campus El Sauzal, Ensenada y se incubaron inmediatamente a 28 °C durante 24-120 horas realizando conteos cada 24 horas. Posteriormente se sembraron las colonias bacterianas de interés en medio de cultivo ChromAgar™ y, a cada una de las cepas aisladas y purificadas se le asignó un código de identificación (Tabla I).

El segundo muestreo se realizó en la empresa Marmax Mariscos S.A. de C.V. expertos en cultivos acuícolas de ostión japonés (*Crassostrea gigas*). La empresa está situada en la parte sur de la Bahía de Todos Santos, Rincón de ballenas, Ensenada, B.C. Cabe destacar que los cultivos de esta empresa se encuentran a salinidades de 34-35 ups. Se tomaron muestras de agua del área de semilla de ostión y de los cultivos de microalgas *Chaetoceros calcitrans* (empleadas para la alimentación de la larva y semilla de ostión) se colectaron en tubos de cristal de 20 mL estériles y sellados con papel parafilm.

Las muestras fueron sembradas en medio de cultivo general TSA al 2% de NaCl (TSA, marca) y TCBS. Para inocular las placas se realizaron diluciones seriadas (1:10), y se sembraron 2 diluciones (10^{-3} y 10^{-6}). Se incubaron a 28°C y

se realizaron conteo de colonias cada 24 y 48 horas. Posteriormente se aislaron las colonias bacterianas de interés en medio en medio de cultivo ChromAgar™ y TSA al 2% NaCl. A cada una de las cepas aisladas y purificadas se le asignó un código de identificación (Tabla I).

La cepa bacteriana *VpEMS-15* fue colectada por el Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California (CESAIBC). Esta fue aislada a partir de hp de camarón blanco cultivado a baja salinidad (3 ups) durante eventos de mortalidad en el Valle de Mexicali, BC en 2018 (Por el LBA Missael García). Se utilizaron los métodos clásicos de purificación en medio de cultivo TCBS. Finalmente, otra cepa (CSA25) fue donada por la Dra. Hortencia Silva Jiménez del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Aislada a partir de un ambiente marino, frente a las costas de Rosarito, B.C., e identificada como *Microbacterium esteraromaticum*. La cual se considera control negativo ya que no presenta iridiscencia y no pertenece al género *Vibrio*.

6.1.3. Criopreservación de cepas bacterianas

Las bacterias previamente purificadas en medio sólido TSA al 2% de NaCl se transfirieron a medio líquido MH enriquecido también al 2% de NaCl en tubos Falcon de 50 mL y se incubaron durante 24 horas a 28°C. Posteriormente, se verificó su pureza en medio sólido antes de proceder con la criopreservación. Para ello, se utilizaron microtubos Axygen de 2 mL, etiquetados correctamente, a los cuales se les añadió 1.5 mL de inóculo y glicerol al 25%. Finalmente, los cultivos bacterianos se almacenaron en un ultracongelador a -80°C.

6.2. Identificación taxonómica filogenética y bioquímica

6.2.1. Análisis filogenético

Para identificar la afiliación taxonómica de las cepas bacterianas estudiadas, se realizó un análisis de comparación de genomas utilizando la base

de datos de Genome Database Taxonomy (GTDB). Posteriormente, para generar un árbol filogenético con base en los resultados de la asignación taxonómica obtenida, se realizó un análisis de multilocus de secuencias (MLST) utilizando la herramienta en línea autoMLST (<https://automlst.ziemertlab.com/>; WingChing et al. 2021). Los identificadores de los genomas de referencia fueron obtenidos con base en el resultado de la asignación taxonómica de GTDB, para después descargarlos del sitio de National Center for Biotechnology Information (NCBI). El árbol filogenético se generó utilizando los parámetros predefinidos para autoMLST, incluyendo la selección completa de genes constitutivos de MLST y un bootstrap de 1000 réplicas.

6.2.2. Prueba Microplate-Gen III.

Para identificar de manera preliminar a las cepas purificadas se utilizó el kit bioquímico Microplate/Gen III™ (Biolog, USA). Las bacterias fueron sembradas en medio de cultivo TSA al 2% de NaCl y se incubaron durante 24 horas a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Con un asa estéril, se tomó una pequeña porción de colonia aislada y se inoculó en el medio líquido con el protocolo B del kit (Biolog, 2023). La transmitancia se midió con un turbidímetro (Biolog Turbidimeter) antes y después de la inoculación para evitar falsos positivos.

Posteriormente, se inocularon 100 μL en cada uno de los 94 pozos del kit que considera 71 sustratos de carbono y 23 sustratos de sensibilidad química. Las placas se incubaron a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas, dependiendo del crecimiento de cada cepa. Los resultados se detectaron mediante colorimetría, indicando púrpura para un resultado positivo e incoloro para negativo. Los datos obtenidos se analizaron con el software Biolog Gen III. Finalmente, las huellas fenotípicas de cada placa se compararon con la biblioteca del fabricante, lo que permitió determinar el género y especie de las bacterias con una probabilidad estadística de 0 a 1.

6.3. Pruebas microbiológicas

6.3.1. Inoculación en medios de cultivo sólidos generales

Para comenzar a generar inóculos de infección viables y saber su densidad celular, se sembraron las bacterias en medios de cultivo general TSA y MH al 2% de NaCl, preparados según las indicaciones del fabricante y esterilizados en autoclave (121°C durante 15 minutos a 20 psi). Las muestras para la inoculación se tomaron con asas estériles a partir de las cajas petri con medio específico CA (paso 6.1.3.), seleccionando una pequeña porción de la colonia de interés basada en su color, especie presuntiva y presencia de iridiscencia. En cada pase, las bacterias se sembraron utilizando la técnica de estriado, mientras que las cajas petri fueron selladas con papel parafilm para evitar la contaminación y se incubaron a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 24 – 48 horas. Los medios de cultivo se renovaron en distintos intervalos, dependiendo del crecimiento observado en cada cepa.

6.3.2. Preparación e inoculación de medios de cultivo líquidos

El siguiente paso fue escalar el inóculo a medio líquido para estimar la cinética de crecimiento. Para esto se utilizó medio de cultivo líquido Mueller-Hinton (MH) al 2% de NaCl, preparado según las indicaciones del fabricante y esterilizado en autoclave (121°C durante 15 minutos a 20 psi). El protocolo aplicado fue el siguiente:

Cultivar las bacterias en un volumen de 11 mL de medio de cultivo y 1 mL de inóculo (11:1 v/v) en tubos Eppendorf de 15 mL, con el correspondiente etiquetado. Escalar hasta un volumen final de 40 mL (39:1 v/v) en tubos Falcon de 50 mL. La inoculación se realizó tomando una pequeña porción de la colonia de interés con un asa estéril de madera, sumergiéndose en un tubo con medio líquido MH al 2% y agitando cuidadosamente para disolver la colonia. Posteriormente, los tubos se colocaron en incubación a 28°C durante diferentes periodos, dependiendo de la cepa.

6.3.3. Cinética bacteriana

Para iniciar las curvas de crecimiento, se estandarizó la cantidad de inóculo líquido inicial de cada cepa. A partir de cajas petri se tomó una pequeña porción de colonias bacterianas completamente aisladas, con 16-24 horas de crecimiento, y se inocularon en 40 mL de medio de cultivo líquido MH. Las muestras se incubaron a 28°C durante 24-120 horas. Durante este período, se realizaron lecturas de absorbancia utilizando celdas de plástico desechables con 1 mL de muestra. Las muestras se realizaron por triplicado, en intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, empleando un espectrofotómetro UV-VIS (N4S) a una longitud de onda de 595 nm (Coronado et al. 2018).

Con los datos obtenidos, se estimó el crecimiento bacteriano en una escala de 0 a 1, basándose en los intervalos de crecimiento y las absorbancias registradas en los tiempos especificados. El control negativo utilizado fue medio MH estéril, libre de bacterias. Los datos de las mediciones se llevaron a cabo con inóculos de 12 mL de medio MH al 2%, iniciando con una porción de colonia aislada (ABS inicial: 0.007 hasta 0.015).

A partir de estos, se escalaron hasta cultivos de 40 mL (39:1 v/v) en tubos Falcon de 50 mL y los datos se registraron en una tabla en Excel (versión 18.0), incluyendo la fecha, hora, cepa y valor de absorbancia. A partir de estos datos, se generaron curvas de crecimiento para cada cepa aislada, identificando claramente las fases de crecimiento y resaltando la fase exponencial. Además, se calculó la constante de crecimiento y la tasa de duplicación para cada especie, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$k = \frac{n}{t}$$

Donde:

k= constante de crecimiento

t= tiempo

n= número de generaciones

$$T = \frac{\ln 2}{k}$$

Donde:

k: constante de crecimiento

T: tiempo de duplicación

6.3.4. Crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de NaCl

Para evaluar el efecto de la concentración de sales en el crecimiento de las cepas, se preparó medio de cultivo líquido Mueller-Hinton (MH) con concentraciones variables de NaCl (desde 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, hasta 10%), utilizando frascos de cristal de 1 L. Los medios se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante y fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos a 20 psi.

Las pruebas se realizaron en tubos Falcon de 50 mL, a los que se añadieron 44 mL de medio de cultivo estéril y 1 mL de inóculo bacteriano en fase exponencial (con una absorbancia ajustada a 0.650), alcanzando un volumen final de 40 mL. Los valores de crecimiento bacteriano se calcularon basados en las lecturas de absorbancia (595 nm) y el tiempo de incubación (18-21 hrs). Estos datos fueron registrados y organizados en una tabla utilizando el programa Excel (versión 18.0).

6.4. Análisis de iridiscencia bacteriana

6.4.1. Determinación de presencia/ausencia de iridiscencia en colonias bacterianas

Una vez que se observó un crecimiento óptimo de las colonias bacterianas en los medios de cultivo con agar, se procedió a realizar una prueba para determinar la presencia o ausencia de iridiscencia. El análisis consistió en aplicar una fuente de luz blanca (lámpara blanca) mediante transiluminación a cada una

de las cajas de Petri, posicionando la lámpara por debajo de la placa y proyectando el haz de luz sobre las colonias bacterianas en ángulos variados, entre 45° y 65°. Con este procedimiento, se verificó la presencia o ausencia del efecto de iridiscencia como el tipo de tonalidad observada por las colonias.

6.4.2. Aislamiento y purificación de colonias de interés iridiscentes

Se prepararon medios de cultivo microbiológicos específicos como, TCBS y ChromAgar (CA) (ChromAgar™ - Francia), siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. A partir de las cajas de Petri inoculadas, se seleccionaron colonias parcialmente aisladas e iridiscentes utilizando un asa estéril de punta fina. Posteriormente, se inocularon las colonias en cajas con nuevo medio de cultivo mediante la técnica de estriado con asas de madera estériles.

El procedimiento se repitió hasta en cuatro ocasiones (generaciones) para obtener una purificación óptima de las colonias bacterianas. Tras cada pase, las placas se sellaron con papel parafilm para prevenir la contaminación, y se incubaron a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Se empleó el medio CA por su tecnología cromogénica, lo que sugirió una rápida identificación presuntiva de las especies bacterianas mediante la observación de la pigmentación de las colonias (sin ser expuestas a transiluminación). Según el color observado, se asignó la especie correspondiente, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

6.5. Análisis físico/óptico

6.5.1. Parámetros para la obtención de imágenes de iridiscencia bacteriana

La captura de las imágenes de iridiscencia bacteriana se realizó en el laboratorio de Microscopía Óptica Avanzada del Departamento de Óptica del CICESE, bajo la supervisión del Dr. Israel Rocha. Este laboratorio cuenta con equipos especializados, incluyendo cámaras de alta resolución y un sistema de

control de iluminación para evitar contaminación lumínica. Para la obtención de las imágenes se emplearon parámetros estandarizados: velocidad de píxel de 2.5 MHz y un tiempo de exposición de 80 ms. El sistema de amplificación óptico se varió con aumentos de entre 0.7X y 4.X. Esta configuración permitió registrar imágenes nítidas y detalladas, reduciendo al mínimo la interferencia de la luz externa y resaltando las propiedades ópticas de iridiscencia en las colonias bacterianas.

6.5.2. Obtención de imágenes de iridiscencia bacteriana

Las pruebas experimentales se realizaron utilizando colonias bacterianas aisladas en placas Petri con medio de cultivo TSA al 2% de NaCl. El tiempo de incubación varió entre 16 y 120 horas, dependiendo de la cepa analizada. Las colonias bacterianas se analizaron sin aplicar ningún método de fijación a las células, preservando sus características estructurales y ópticas. Las placas Petri se colocaron sobre una platina móvil y fueron fijadas para evitar movimientos durante la manipulación y el proceso de fotodocumentación.

Para resaltar y evaluar el fenómeno de iridiscencia, se utilizó una lámpara de luz blanca con una irradiación controlada de 0.5 mW, colocada detrás de la platina y ajustada con un trípode a un ángulo de incidencia entre 45° y 60°. Esto permitió maximizar la visibilidad de las diferentes variaciones tonales y cromáticas características de la iridiscencia bacteriana. Las imágenes de alta resolución y amplificación se capturaron utilizando una cámara digital (CMOS – 1.6 MP) de alta sensibilidad USB 3.0 con sensor RGB (Thorlabs – U.S.) y se procesaron con el software Thor (Versión 2.2). La barra de escala se generó calculando la relación de píxeles a micrómetros, utilizando las medidas obtenidas a 1.0X o 0.7X de aumento. La barra de escala y las figuras finales se crearon en el programa ImageJ.

6.6. Análisis molecular

6.6.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ADN de las cepas bacterianas, se utilizó el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). A partir de un cultivo bacteriano de 24 horas, se centrifugaron 20 mL del cultivo a 10,000 rpm durante 6 minutos, obteniendo los pellets de cada bacteria. El sobrenadante fue removido y se procedió a la extracción de ADN. Brevemente, a los pellets se les añadió 200 μ L de buffer PBS, y se agitaron en vortex para resuspenderlos. Se agregaron 20 μ L de lisozima y se incubaron las muestras a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de buffer AL mix (buffer de lisis) y se mezcló en vortex, incubando las muestras a 56°C por 25 minutos, con agitación cada 10 minutos.

Se agregaron 5 μ L de solución de RNasa y los tubos se invirtieron varias veces para mezclar. Se añadieron 200 μ L de etanol frío al 100%, mezclando durante 1 minuto. Las muestras se transfirieron a las columnas del kit, incluyendo cualquier precipitado, y se centrifugaron a 8,000 rpm por 1 minuto. El tubo de colecta se descartó, y se añadieron 500 μ L de buffer AW1, repitiendo la centrifugación a 8,000 rpm por 1 minuto. Finalmente, los tubos se centrifugaron vacíos a 10,000 rpm por 2 minutos para eliminar cualquier rastro de etanol.

6.6.2. Amplificación del gen ARNr 16S por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Para la identificación taxonómica preliminar de las cepas bacterianas evaluadas, se realizó la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr. La amplificación del gen 16S ARNr se realizó utilizando los cebadores universales FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y RC1492 (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') (Tarazona et al., 2018). Para la reacción de PCR, se preparó una mezcla que contenía: agua PPI (agua Milli-Q libre de pirofosfatos), 0.4 μ M de dNTP's (Promega, Southampton, UK), 0.4 μ M de cada

cebador, 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Promega), 1x amortiguador de reacción para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl) (Invitrogen), 3 mM de $MgCl_2$ y 0.25% de DMSO (Life Science). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal).

Las condiciones de amplificación incluyeron ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión. Los productos amplificados (25 μ L) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Para determinar el tamaño de los productos, se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). El gel fue visualizado mediante luz ultravioleta en un transiluminador (T1202, Sigma Chemical Company) y los resultados se registraron mediante fotografía digital (Cámara DC290 ZOOM, Kodak). Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a la empresa Eton Bioscience en San Diego, USA.

6.6.3. Secuenciación genómica

El ADN genómico obtenido de las extracciones de cada cepa fue enviado a secuenciar al laboratorio SeqCenter (Pittsburgh, USA). Las bibliotecas genómicas se prepararon utilizando el kit Illumina DNA Prep con índices UDI IDT de 10 pb, y se secuenciaron en un equipo Illumina NextSeq 2000, generando lecturas de 2×151 pb. El proceso de demultiplexación, control de calidad y recorte de adaptadores se realizó utilizando el software bcl-convert (v3.9.3). Las estadísticas de las secuencias obtenidas fueron organizadas y almacenadas en el archivo "DNA sequencing stats.xlsx".

6.6.4. Análisis de potencial patógeno

Para predecir el potencial patógeno de las bacterias estudiadas en humanos, se empleó la herramienta bioinformática PathogenFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/PathogenFinder/>), desarrollada por el Center for Genomic Epidemiology, National Food Institute y Technical University of Denmark

(<https://genomicepidemiology.org/>). En el análisis se incluyeron secuencias de 9 genomas bacterianos, generando una matriz de proteínas identificadas para cada uno. Posteriormente, esta matriz fue convertida en una tabla de presencia y ausencia de proteínas, facilitando el análisis de su potencial patogénico. Para identificar genes adquiridos de resistencia a antibióticos en las cepas bacterianas del estudio, se empleó la herramienta bioinformática ResFinder, versión 4.6.0 (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>), disponible en la plataforma Center for Genomic Epidemiology (Bortolaia et al., 2020). Los genomas, cargados en formato FASTA, fueron analizados utilizando los parámetros predeterminados de la herramienta en línea. Este proceso generó una matriz de anotaciones con el porcentaje de identidad para cada gen identificado. Los resultados se visualizaron mediante un mapa de calor basado en los porcentajes de identidad, empleando la librería *pheatmap* en RStudio.

Además, se utilizó la herramienta bioinformática *KmerResistance* versión 2.2 (<https://cge.food.dtu.dk/services/KmerResistance/>) de la plataforma de Center For Genomic Epidemiology. Para el análisis, los genomas se cargaron en formato FASTA y se aplicaron los parámetros predefinidos de la herramienta en línea. Esto generó una matriz de anotaciones con el porcentaje de identidad para cada gen identificado. Para visualizar los resultados, se creó un mapa de calor basado en los porcentajes de identidad, utilizando la librería *pheatmap* en R.

Para identificar con precisión genes de resistencia a antimicrobianos y mutaciones puntuales asociadas, se empleó la herramienta bioinformática AMRFinderPlus versión 3.12.8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/>). La detección de patógenos se realizó utilizando la biblioteca del NCBI, cargando los genomas en formato FASTA y aplicando los parámetros predefinidos de la herramienta en línea. El análisis produjo una matriz de anotaciones que muestra el porcentaje de identidad de cada gen identificado. Para visualizarla comparación

de los porcentajes de identidad obtenidos, se generó un mapa de calor empleando utilizando la librería *heatmap* (REF) en Rstudio (REF).

Para identificar grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios en cada genoma, se empleó la plataforma antiSMASH (versión 6.0) en su modalidad en línea (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Se aplicó una detección relajada de los grupos de genes y se activaron todas las herramientas adicionales disponibles, permitiendo un análisis exhaustivo de los genomas. Este análisis incluyó comparaciones con la base de datos MiBIG y el análisis de dominios Pfam de los grupos de genes.

Los resultados obtenidos sobre los grupos de genes biosintéticos (BGC) en cada región del genoma y sus porcentajes de similitud fueron analizados en Excel (versión 18.0). Se examinaron las diferencias y similitudes entre genomas del mismo género y entre distintos géneros. Los resultados de las comparaciones se presentan en una tabla que muestra los porcentajes de similitud con las bases de datos y en un gráfico de barras apiladas que ilustra la abundancia y diversidad de cada tipo de BGC.

6.6.5. Antibiógramas

Para evaluar la susceptibilidad bacteriana contra antibióticos de uso común en la acuicultura se realizaron ensayos de antibiógramas. Para la realización de los antibiógramas, se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo TSA al 2%, estas se inocularon con 100 μ L de un cultivo bacteriano líquido previamente estandarizado a una absorbancia de 0.650, esparciendo el inóculo de manera uniforme sobre la superficie del agar. Posteriormente, se colocaron los sensidiscos de manera ordenada y concéntrica, aplicando 10 μ L de los siguientes antibióticos: Enrokarizoo (200 mg de enrofloxacin por cada 1 mL), Kariflor (10 g de florfenicol y 60 mL de propilenglicol por cada 100 mL de solución), y Oxikarizoo (300 mg de oxitetraciclina base en 1 mL).

Una vez completado el sembrado y la aplicación de los antibióticos, las cajas Petri se sellaron con papel parafilm para prevenir la contaminación, incubando a $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada antibiótico. Tras el periodo de incubación, se midieron los halos de inhibición con una regla, y los resultados se registraron en milímetros. El registro y la visualización de los resultados se realizó en el programa Excel (versión 18.0).

6.6.6. Análisis de genes relacionados con el fenómeno de iridiscencia

Para identificar los posibles genes relacionados con el fenómeno óptico de iridiscencia se llevó a cabo una búsqueda por anotación funcional en los genomas bacterianos. Primero, se buscó información en la literatura de los posibles genes relacionados a este fenómeno y se encontró que en su mayoría eran genes con funciones relacionadas con el desplazamiento celular (Johansen et al 2018), incluyendo aquellos responsables de la movilidad deslizante, de la forma celular, la respuesta estricta y la modificación de ARNt que contribuyen a la apariencia óptica de la colonia. La búsqueda se realizó manualmente utilizando las matrices de anotación de los genomas con las palabras clave de la función de los genes descritos en la literatura.

6.7. Bioensayos de patogenicidad

6.7.1. Declaración de ética

Los ejemplares de *Penaeus vannamei* utilizados fueron manejados conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que regula el uso ético de animales en investigación. Las postlarvas de camarón blanco del Pacífico se adquirieron en el Laboratorio Aquapacific, S.A. de C.V., ubicado en Sinaloa, México. Posteriormente, se transportaron a los tanques de cultivo del área de Nutriaqua en el IIO de la FCM de la UABC, cumpliendo con todos los permisos de movilidad y sanidad establecidos por CONAPESCA y SENASICA.

6.7.2. Material biológico

Las postlarvas (pl's) sanas se mantuvieron en un tanque de PVC con una capacidad de 1.1 m³, con agua de mar filtrada y aireación continua mediante piedras difusoras manteniendo el oxígeno en el agua a 7 mg/L. La salinidad se ajustó a 34 unidades prácticas de salinidad (UPS) y temperatura de 28°C. Los organismos fueron acondicionados durante 12 días y alimentados con alimento para camarón al 30% de proteína.

6.7.3. Generación de inóculo bacteriano

A partir de las curvas de crecimiento realizadas de cada cepa aislada, se identificó la *fase log* para generar inóculos con células viables. La preparación de inóculo bacteriano se llevó a cabo por triplicado en cada cepa seleccionada para las infecciones experimentales en *P. vannamei*. Cada cepa se cultivó en volúmenes de 40 mL con medio de cultivo Mueller-Hinton al 2% NaCl y, se incubaron durante 18-21 horas a 28°C. Posterior a este tiempo, se procedió a centrifugar las muestras a 2379X *g*, durante 20 minutos y, al final se generaron pellets bacterianos en el fondo de los tubos, lo siguiente fue resuspender los pellets con 1 mL de solución salina amortiguadora a base de fosfato (PBS) estéril. Las suspensiones bacterianas se ajustaron con un espectrofotómetro a una densidad óptica de 1 a 595 nm.

El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y la corroboración de la viabilidad de las células, se realizó por medio de diluciones seriadas de una réplica del inóculo. Para esto, se utilizaron cajas petri con agar TSA 2% NaCl, incubadas a 28°C x 24 horas. Una vez generado el conteo y viabilidad celular, se procedió a utilizar la suspensión bacteriana de otra réplica para inocular el agua de las unidades experimentales.

6.7.4. Determinación de la concentración letal media (DL₅₀)

Las pl's fueron transferidas a unidades experimentales de 10 L con agua de mar filtrada (1 μm), manteniendo una aireación constante y una salinidad de 34 UPS. Cada tratamiento se realizó en cuatro réplicas, con 20 pl's por réplica (n=80 por tratamiento). La inoculación del patógeno se llevó a cabo mediante inmersión de las postlarvas en 3 L de agua de mar que contenía 1,500 μL de la suspensión bacteriana. Para el control negativo, se emplearon cuatro réplicas (n=20) expuestas únicamente a una solución salina estéril, libre de bacterias. La DL_{50} se estimó utilizando cinco concentraciones bacterianas, con cuatro réplicas por dosis.

6.7.5. Bioensayos de infección con dosis específica.

Las pl's fueron transferidas al Laboratorio de Patología Experimental en Acuícola (LPEA) a unidades experimentales descritas en la sección anterior. Se evaluaron 9 cepas bacterianas de forma individual, utilizando una concentración de 3.9×10^5 UFC/mL mediante un proceso de infección por inmersión.

Durante cada bioensayo, se monitoreó la mortalidad, se registraron y se retiraron las pl's muertas. No se realizó ninguna limpieza de las unidades experimentales durante el período de experimentación. Por otra parte, la temperatura se controló a 28-30°C para promover la infección, los valores de pH, salinidad, oxígeno disuelto se monitorearon diariamente y, a las pl's se les colocó fotoperiodo (12:12) con luz artificial. Se registró la fecha y hora de mortalidad causado por cada cepa de las 30 a las 240 horas, los datos fueron analizados con el programa Excel versión 18.0.

6.8. Análisis estadístico

Para evaluar el grado de patogenicidad con base en la mortalidad generada para cada una de las 9 cepas bacterianas iridiscentes se realizaron pruebas en postlarvas de *Penaeus vannamei* mediante infecciones experimentales controladas y análisis de pruebas de pendientes de la sobrevivencia y mortalidad acumulada

(Kaplan-Mayer) y por medio de una prueba de regresión estadística con un modelo de variable dependiente dicotómica (Probit).

Estas comparaciones fueron analizadas con el programa estadístico GraphPad (versión 8.0). Las gráficas de cinética bacteriana, junto a los valores de tiempo de duplicación fueron procesadas y analizadas con el programa Microsoft Excel (versión 18.0), utilizando la prueba *t* de Student no paramétrica con dos colas. Los datos de la mortandad acumulada, se compararon con las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn no paramétrica.

7. Resultados

7.1. Caracterización general de cepas bacterianas

7.1.1. Procedencia

Se aislaron y purificaron 17 cepas bacterianas provenientes de diferentes puntos de muestreo y durante eventos de epizootias en cultivos acuícolas (Tabla I). Las cepas Bi-MM-1, y Bi-MM-3 provienen de la BTS, a partir de cultivos de semilla de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) y de microalgas (*Chaetoceros calcitrans*) durante eventos de mortalidad.

Las cepas Bi-HpVM, Bi-HLvm, Bi-BrC4 y Bi-E1fon provienen del Valle de Mexicali, a partir del agua de los cultivos y de tejidos *Penaeus vannamei* con signos de enfermedad. La cepa bacteriana VpEMS-15 fue aislada de hepatopáncreas de camarones blancos (*Penaeus vannamei*) con signos evidentes de enfermedad, de un cultivo acuícola extensivo del Valle de Mexicali en 2018.

La cepa Bi- H₂Oubp fue aislada de las tuberías principales de H₂Om que alimentan a los laboratorios de acuicultura de la FCM, durante un evento de florecimiento algal nocivo en la BTS en 2021. Por último, la cepa CSA25-Control fue utilizada como control negativo iridiscente y no patógena, y fue aislada a partir de un ambiente marino frente a las costas de Rosarito, B.C. en 2022. Las 17 cepas aisladas presentaron iridiscencia, pero solo ciertas cepas obtuvieron un porcentaje bajo de contaminación (<2%). Bajo este criterio se decidió solamente trabajar con 9 cepas iridiscentes que cumplieron con el índice bajo de contaminación (Tabla II).

Tabla I. Bacterias aisladas de diferentes puntos de muestreo durante eventos de epizootias en cultivos acuícolas en Baja California.

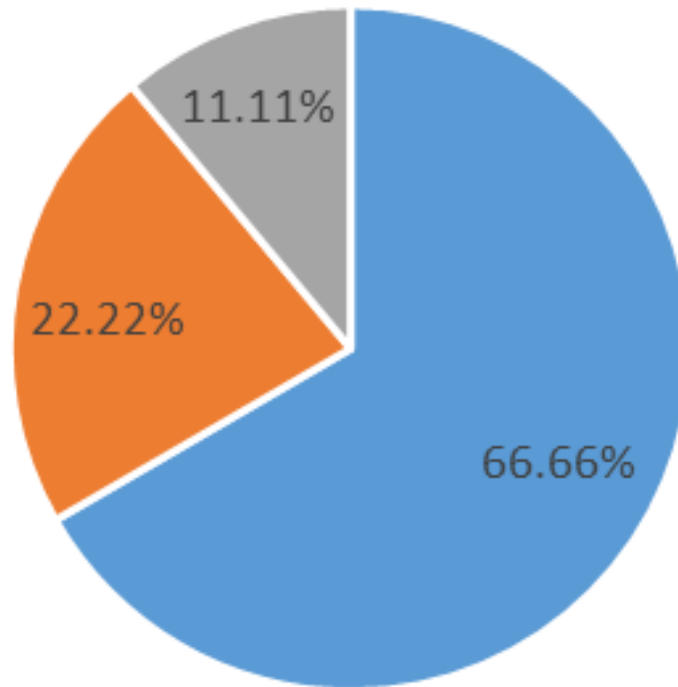
cepa	Fuente analizada	Origen geográfico	Obtención muestra	Código
1	Cultivo de molusco <i>C. gigas</i>	Maxmar mariscos S.A. de C.V., Rincón de ballenas en Ensenada, B.C	H ₂ O de sistemas de ostión japonés	Bi-MM-1M
2	Cultivo de molusco <i>C. gigas</i>	Maxmar mariscos S.A. de C.V., Rincón de ballenas en Ensenada, B.C	H ₂ O de sistemas semilla de ostión japonés	Bi-MM-2V
3	Microalgas <i>C. calcitrans</i>	Maxmar mariscos S.A. de C.V., Rincón de ballenas en Ensenada, B.C	H ₂ O de columnas para microalgas	Bi-MM-3L
4	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	UABC-LPEA, Punta morro, Ensenada, B.C	Camarones con signos de enfermedad	Bi-SR-4R
5	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1fon-VM-Na
6	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Hepatopáncreas	Bi-Hp-C1-VM
7	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1Sup-VM-Cre
8	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Hemolinfa	Bi-HI-C3-VM
9	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1-Sup-VM
10	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1-Fon-VM
11	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Branquias	Bi-Br-C4-VM
12	Alimento artesanal para <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Pellets almacenados	Bi-Alim-VM
13	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1-Fon-VM-am
14	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1-Sup-VM-cre
15	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	Acuamos S.P.R de R.L, Valle de Mexicali, B.C	Estómago y hepatopáncreas	VpEMS-15
16	Agua de mar de UBP-FCM	UABC – UBP, Ensenada, B.C	Tubería principal de abastecimiento	BV-H20-UBP-ro
17	Agua de Mar	Rosarito, B.C	Muestra de ambiente oceánico	CSA25-Control

Tabla II. Cepas bacterianas purificadas con índice bajo de contaminación de ADN genómico.

cepa	Fuente analizada	Origen geográfico	Obtención muestra	Código
Vj_1	Cultivo de molusco <i>C. gigas</i>	Maxmar mariscos S.A. de C.V., Rincón de ballenas en Ensenada, B.C	H ₂ O _m de sistemas de ostión japonés	Rb-MM1
Ms_3	Microalgas <i>C. calcitrans</i>	Maxmar mariscos S.A. de C.V., Rincón de ballenas en Ensenada, B.C	H ₂ O _m columnas para microalgas	Rb-MM3
Vp_6	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Hepatopáncreas	Bi-HpVM
Ac_8	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Hemolinfa	Bi-HLvm
Vp_11	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	Branquias	Bi-BrC4
Me_13	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	PROMAR 57, Valle de Mexicali, B.C	H ₂ O de cultivo	Bi-E1Fon
Vp_15	Cultivo de <i>P. vannamei</i>	Acuamos S.P.R de R.L, Valle de Mexicali, B.C	Estómago y hepatopáncreas	VpEMS-15
Va_16	Agua de mar de UBP-FCM	UABC – UBP, Ensenada, B.C	Tubería principal de abastecimiento	Va-H ₂ Oubp
Me_17	Agua de Mar	Rosarito, B.C	Muestra de ambiente oceánico	CSA25-Control

H₂O_m = Agua de mar

Solo una cepa (*Bi-MM3*) se encontró relacionada taxonómicamente con el filo Bacillota del género *Mammaliicoccus* (11%), dos cepas (22.22%) con el filo Actinomycetota (*Bi-E1fond* y *CSA25-control*) pertenecientes al género *Micrococcus* y *Microbacterium*, respectivamente, mientras que las seis cepas restantes (66.66%), fueron identificadas como Gammaproteobacteria de las cuales *Bi-MM1*, *Bi-HpVm*, *Bi-BrC4*, *VpEMS-15* y *Va-H₂Oubp* pertenecen al género *Vibrio* y la cepa *Bi-HLvm* al género *Aeromonas* (Fig. 1).



■ Gammaproteobacteria ■ Actinomicetos ■ Firmicutes

Figura 1. Clasificación de las cepas aisladas durante epizootias acuícolas en Baja California (n=9 cepas aisladas).

7.1.2. Identificación taxonómica bioquímica y filogenética

Para la identificación bioquímica de las cepas, se realizó un análisis de su huella fenotípica mediante la prueba GEN III, con base en la respuesta de bacterias de los factores bioquímicos de cada una de las cepas, se identificaron la presencia de bacilos, cocos gram negativos y gram positivos, catalasa y oxidasa positivos. Cada huella fenotípica al compararse con el repertorio de GEN III, demostró que las cepas correspondían a los géneros; *Vibrio*, *Mammaliicoccus*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Microbacterium* (Tabla III).

En particular, la cepa Rb-MM1 de acuerdo al software obtuvo una similitud con *Vibrio owensii* del 0.280 en probabilidad estadística. Mientras que la cepa Rb-

MM3 presentó una probabilidad estadística de 0.90 para *Staphylococcus sciuri*. Las cepas Bi-BrC4, Bi-HpVm, VpEMS-15 obtuvieron valores estadísticos de 0.89, 0.89 y 0.84 para *Vibrio parahaemolyticus* respectivamente.

Así mismo, la cepa Va-H₂Oubp se asoció a *Vibrio alginolyticus* con una probabilidad de 0.17. Por su parte, Bi-HLvm generó una probabilidad estadística de 0.83 para *Aeromonas caviae*. Finalmente, la cepa Bi-E1Fon presentó una probabilidad de 0.91 asociada a *Micrococcus endophyticus*, mientras que la cepa CSA25-control generó una probabilidad de 0.22 para *Microbacterium* spp (Tabla III).

Tabla III. Identificación bioquímica de la huella fenotípica de nueve cepas bacterianas iridiscentes basados en el kit de Biolog - Gen III

Cepa/código	Probabilidad	Opción A	Probabilidad	Opción B
Rb-MM1	0.28	<i>Vibrio owensii</i>	0.12	<i>Vibrio furnissii</i>
Rb-MM3	0.90	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.74	<i>S. sciuri</i> <i>subespecie sciuri</i>
Bi-BrC4	0.89	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.67	<i>V. harveyi</i>
Bi-HLvm	0.83	<i>Aeromonas caviae</i>	0.31	<i>Aeromonas</i> <i>veronii</i>
Bi-HpVm	0.89	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.67	<i>V. harveyi</i>
Bi-E1Fon	0.91	<i>Micrococcus endophyticus</i>	0.14	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i>
VpEMS-15	0.84	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.59	<i>V. harveyi</i>
Va-H ₂ Oubp	0.17	<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.11	<i>Vibrio diabolicus</i>
CSA25-control	0.22	<i>Microbacterium</i> spp	/	/

/ significa que no contiene dato,

probabilidad estadística de 0 a 1.

Lo siguiente que se realizó fue la identificación molecular por medio del análisis filogenético de las cepas, este indicó su afiliación taxonómica con distintos géneros bacterianos de los cuales cinco cepas (Rb-MM1, Bi-HpVm, Bi-BrC4, VpEMS-15, Va-H2Oubp) tuvieron relación con el género *Vibrio*, una cepa (Rb-MM3) con el género *Mammaliicoccus*, otra cepa (Bi-HLvm) con el género *Aeromonas*, mientras que las últimas dos cepas tuvieron relación con los géneros *Micrococcus* (Bi-E1fon) y *Microbacterium* (CSA25-control).

La resolución de este análisis permitió incluso relacionar con mayor definición jerárquica la relación filogenética de las cepas (Fig. 2). Por ejemplo, la cepa Rb-MM1 se encontró con relación a *V. jasicida*, las cepas Bi-HpVm, Bi-BrC4 y VpEMS-15 se encontraron agrupadas entre sí y con relación a *V. parahaemolyticus*. La última cepa dentro de este género fue H2Oubp con relación con *V. alginolyticus*.

La cepa Rb-MM3 se encontró en el clado de *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, y con relación a la variante de *Mammaliicoccus sciuri* subsp. *sciuri*. La cepa Bi-HLvm se encontró dentro del clado con relación a *Aeromonas enteropelogenes*, mientras que la cepa Bi-E1fon se encontró con relación con *Micrococcus endophyticus*, y la cepa CSA25-control tuvo relación con *Microbacterium esteraromaticum* (Fig. 2).

Micrococcus (Bi-E1Fon) se identificaron por su gran tamaño y color amarillo característico, mientras que la cepa de *Microbacterium* (CSA25-control) presentó colonias de tamaño medio, textura granulada y un olor distintivo.

A más detalle, Rb-MM1 formó colonias circulares grandes, de 4-6 mm de diámetro, con elevación convexa, consistencia suave y color crema (Fig. 3A). La cepa Rb-MM3 presentó colonias más pequeñas (2-4 mm), de color anaranjado pálido, con bordes bien definidos y elevación convexa (Fig. 3B). Por otro lado, Va-H₂Oubp mostró colonias ovaladas grandes (5-7 mm), de color crema oscuro, con consistencia cremosa y borde definido (Fig. 3C). La cepa Bi-HLvm formó colonias circulares pequeñas de 2 mm, blancas pálidas, con consistencia media y elevación convexa (Fig. 3D).

La cepa Bi-E1Fon se distinguió por sus colonias grandes (5-7 mm), de color amarillo mostaza, muy convexas y con consistencia pastosa (Fig. 3E). La cepa de control, CSA25-control, presentó colonias circulares de tamaño medio (5-7 mm), con textura granulada, color amarillo pálido y un olor sulfurado (Fig. 3F). La cepa Bi-HpVm exhibió colonias medianas (4-7 mm), de forma ovalada, color crema y alta actividad motil de “crecimiento en enjambre” (Fig. 3G). La cepa Bi-BrC4 generó colonias medias (4-6 mm), muy convexas, de color crema claro y consistencia viscosa, también mostrando crecimiento en enjambre (Fig. 3H). Por último, la cepa VpEMS-15 formó colonias grandes (5-8 mm), ovaladas y de color crema claro, con consistencia cremosa/viscosa, crecimiento en enjambre y un olor a gas metano (Fig. 3I).

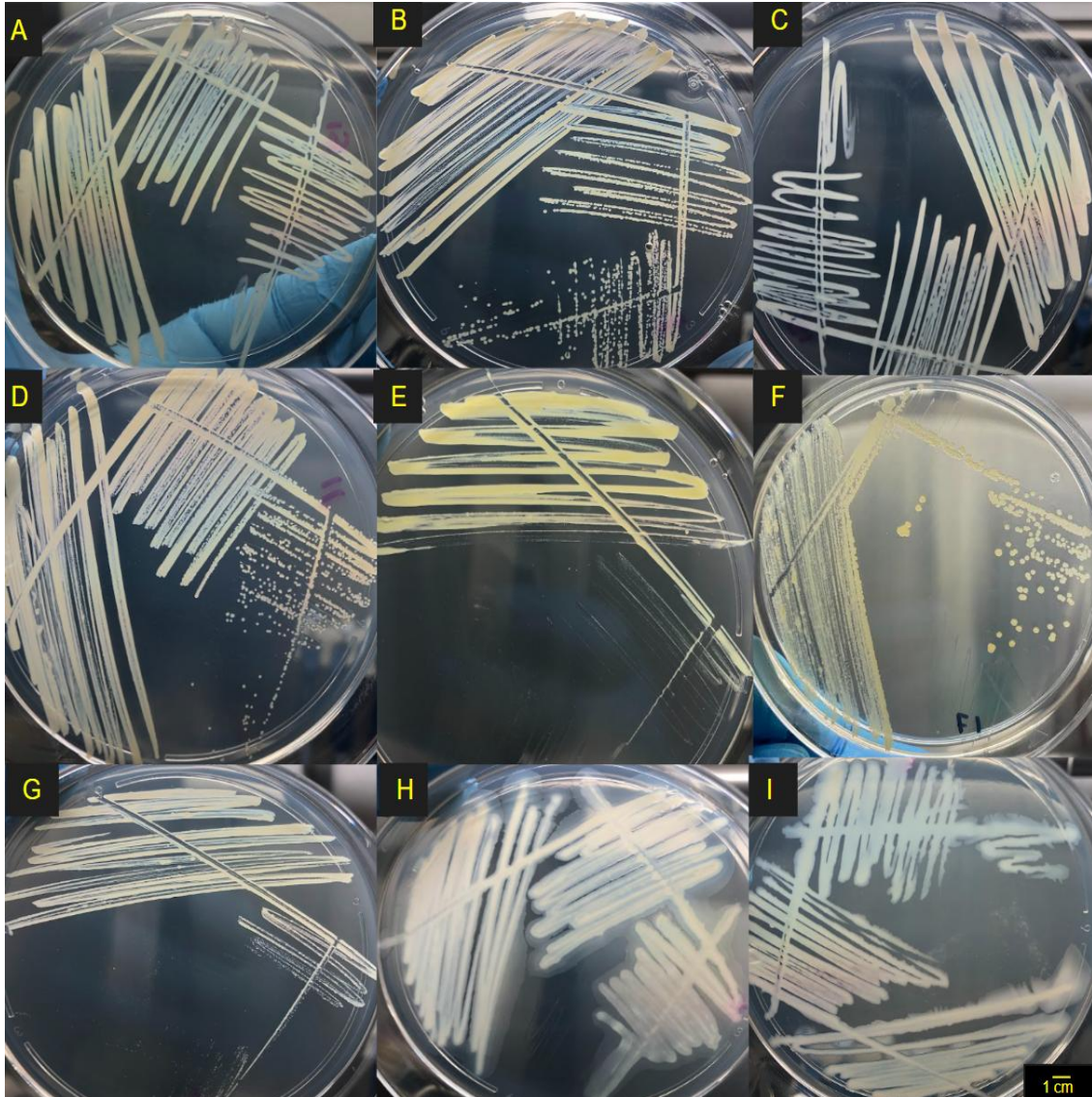


Figura 3. Purificación de colonias bacterianas aisladas a partir de epizootias en cultivos acuícolas. Crecimiento en medio de cultivo trip-caseína soja agar enriquecido al 2% con NaCl, incubadas a 28 °C x 48 – 120 horas. **A)** Rb-MM3. **B)** Rb-MM3. **C)** Va-H2Oubp. **D)** Bi-HLvm. **E)** Bi-E1Fon. **F)** CSA25-control. **G)** Bi-HpVm. **H)** Bi-BrC4. **I)** VpEMS-15. Notar la ausencia de iridiscencia de todas las cepas en este medio de cultivo por el ángulo de la luz y el crecimiento en enjambre de H e I.

En medio de cultivo ChromAgar™, la cepa de VpEMS-15 (Fig. 4A) desarrolló colonias de tamaño grandes, convexas, con borde cremoso, presentó una pigmentación color rosa fuerte, y presentó una alta actividad de crecimiento en enjambre. La cepa Va-H₂Oubp (Fig. 4B) con colonias grandes convexas, con borde blanco, consistencia viscosa, con pigmentación general de color rosa claro. La cepa Bi-HpVm (Fig. 4C) exhibió colonias grandes convexas, de borde bien definido y cremoso, presentando una pigmentación general de color rosa fuerte.

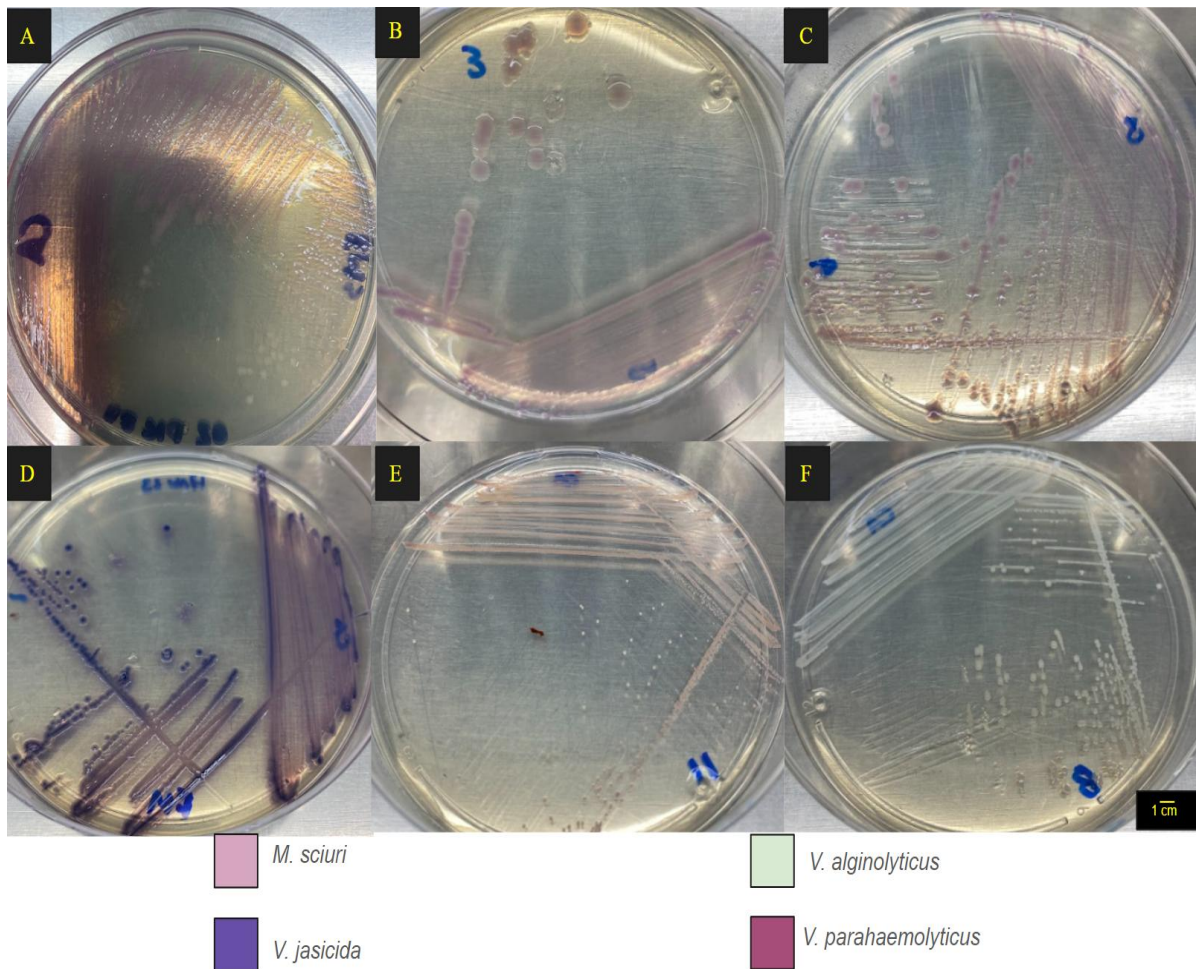


Figura 4. Colonias bacterianas en medio de cultivo ChromAgar™ específico para bacterias del género *Vibrio* spp. **A)** VpEMS-15. **B)** Va-H₂Oubp. **C)** Bi-HpVm. **D)** Bi-MM1. **E)** Bi-BrC4. **F)** Bi-HLvm. Incubadas a 28 °C X durante 48 horas.

En comparación, Rb-MM1 presentó colonias de tamaño medio, convexas, con un borde color blanco de viscosidad media y las colonias tuvieron una pigmentación magenta (Fig. 4D). La cepa Bi-BrC4, exhibió colonias de tamaño grandes, convexas, con borde claro de consistencia cremosa y presentó pigmentación color rosa fuerte (Fig. 4E). Finalmente, la cepa *Bi-HpVm* presentó colonias pequeñas, con forma convexas, bien definidas con un borde oscuro con viscosidad media y las colonias exhibieron pigmentación crema claro (Fig. 4F). Cabe destacar que las otras cepas (Bi-MM3, Bi-E1Fon, CSA25-control) no presentaron crecimiento en el medio de cultivo ChromAgar.

7.1.4. Cinética bacteriana (curvas de crecimiento y requerimientos de sal)

Para determinar las fases de crecimiento y preparar inóculos viables, se generaron curvas de crecimiento de las nueve cepas de interés (Fig. 5). Dichas curvas se realizaron por triplicado durante períodos de hasta 96 horas, utilizando medio de cultivo Mueller-Hinton al 2% NaCl.

Las nueve cepas analizadas presentaron distintas fases de crecimiento, incluyendo la exponencial, estacionaria y de muerte y se observaron diferencias significativas en la máxima absorbancia registrada en distintos tiempos de incubación (Fig. 5). A partir de la fase exponencial se calculó el tiempo de duplicación (TD) para cada cepa, encontrándose que las cepas del género *Vibrio* presentaron tiempos de duplicación que oscilaron entre 0.79 y 1.19 horas (Tabla IV).

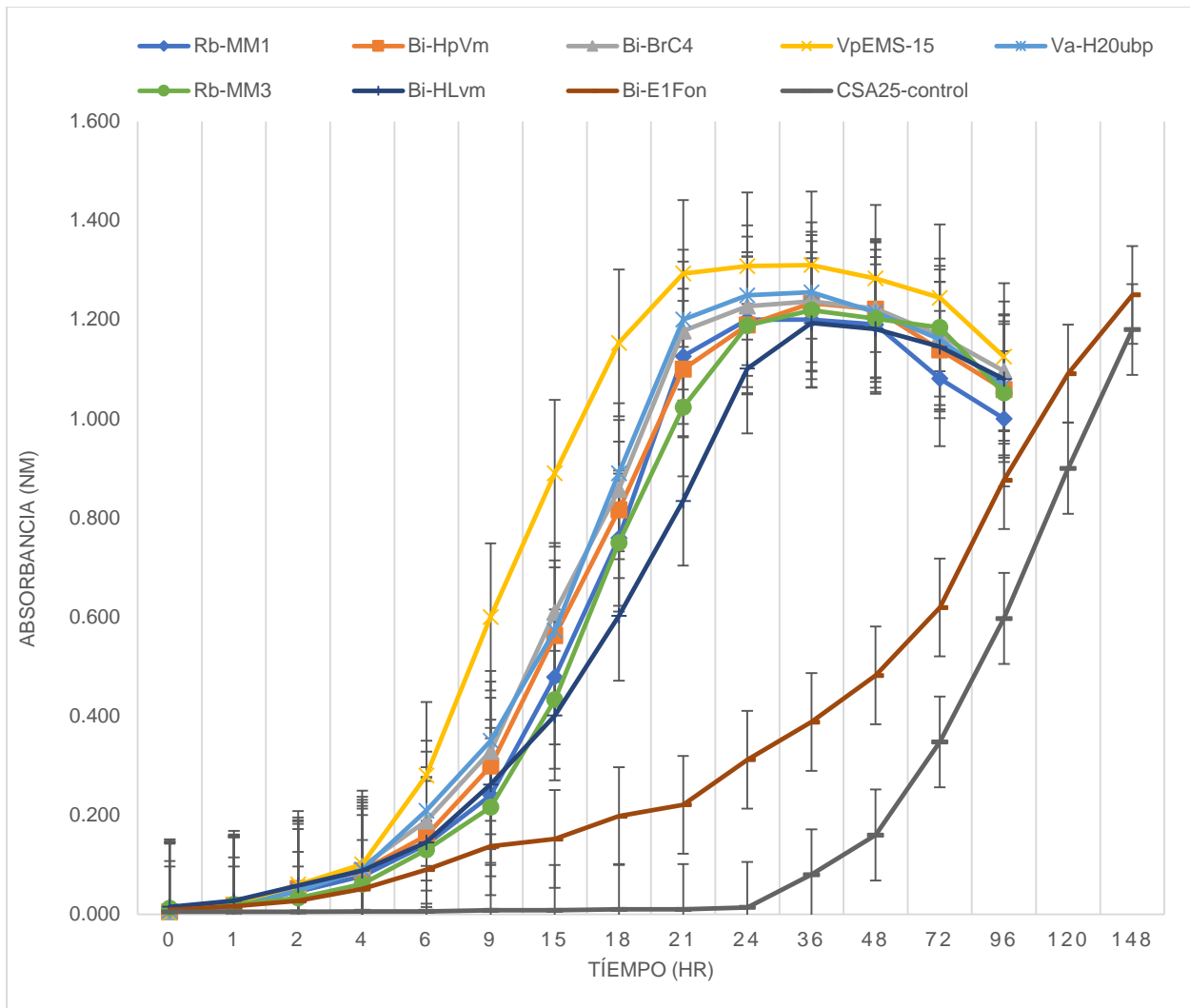


Figura 5. Curvas de crecimiento de bacterias iridiscentes aisladas en cultivos acuícolas. Inóculos medidos a 595 nm, y se realizaron con medio de cultivo líquido Mueller-Hinton al 2% de NaCl con agitación de 100 rpm x 4 días a 28 °C. Datos analizados en Excel, Microsoft versión 18.0. (CSA25-control) es una cepa no iridiscente. Barras de error son SE.

Tabla IV. Tiempos de duplicación de nueve cepas bacterianas iridiscentes

Cepa	TD (min)
<i>VpEMS-15</i>	47.89 ± 0.51
<i>Va-H₂Oubp</i>	58.03 ± 0.51
<i>Bi-HpVm</i>	63.16 ± 0.52
<i>Bi-BrC4</i>	63.66 ± 0.55
<i>Rb-MM3</i>	66.87 ± 0.52
<i>Rb-MM1</i>	71.42 ± 0.52
<i>Bi-HLvm</i>	78.61 ± 0.48
<i>Bi-E1Fond</i>	129.65 ± 0.39
<i>CSA25-control</i>	133.73 ± 0.36

Por otro lado, se evaluó el requerimiento y tolerancia de iones necesarios para el crecimiento bacteriano y se cultivaron las cepas a diferentes concentraciones (0-10%) de cloruro de sodio (NaCl). En general, de la cepa Rb-MM1 a la cepa Va-H₂Oubp mostraron el rango más amplio de tolerancia (Fig. 6). Específicamente las cepas de Bi-HpVm, Bi-BrC4 y VpEMS-15 presentaron crecimiento en concentraciones de NaCl que varían entre 0 y 10%. En particular, la cepa Va-H₂Oubp creció en concentraciones de NaCl entre el 1 y el 10%, mientras que en ausencia de sal no mostró crecimiento.

En comparación, la cepa de Rb-MM1 presentó el rango de crecimiento más estrecho, limitado a concentraciones de NaCl entre el 1 y el 6%. Además, se observó que las cepas Bi-HLvm y Rb-MM3 mostraron crecimiento a concentraciones NaCl desde 0 al 6%. Por último, las dos cepas Bi-E1Fon y CSA25-control crecen únicamente de 0 al 4% de NaCl, respectivamente (Fig. 6).

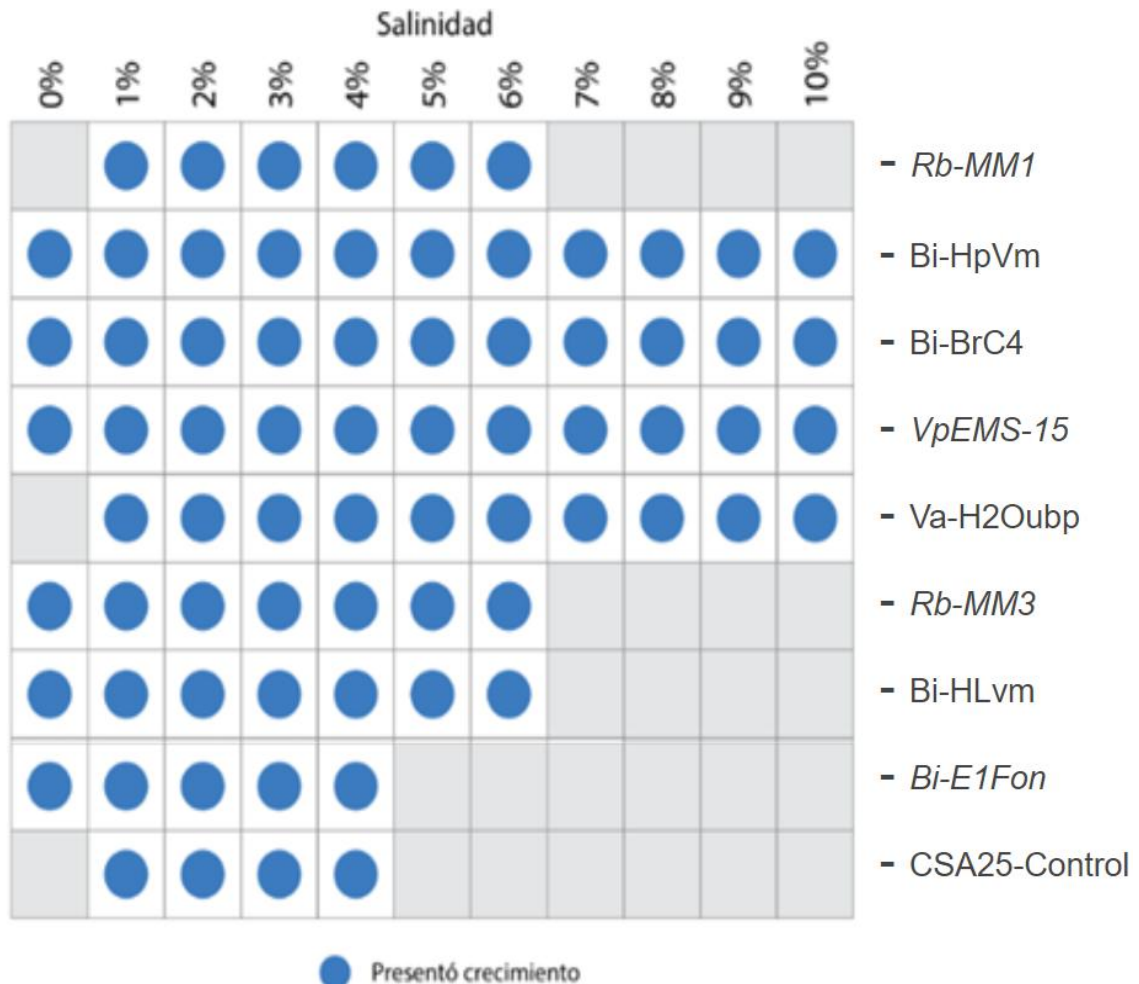


Figura 6. Crecimiento de bacterias iridiscentes en gradientes de NaCl. Representación gráfica del crecimiento de las bacterias en medio de cultivo líquido. Círculos azules indican un crecimiento positivo en cada concentración y los recuadros grises en blanco, indican que la bacteria no presentó crecimiento. Pruebas realizadas en medio de cultivo líquido Mueller-Hinton enriquecido con cloruro de sodio. La medición se realizó con espectrofotómetro a 595 nm y a las 24 horas de incubación a 28° centígrados. Figura generada con Python versión 3.12.5.

7.2. Análisis de iridiscencia de cepas bacteriana

7.2.1. Análisis y caracterización óptica

Las cepas aisladas mostraron una iridiscencia bacteriana notable en medio de cultivo TSA al 2% NaCl, a excepción del control negativo que no presentó iridiscencia. Además, se identificaron diferentes colores e intensidades en las colonias, y en algunos casos específicos distintos tipos de iridiscencia, como la de arcoíris difusa, pastel difusa y metálica (Fig. 7). Por ejemplo, la cepa Rb-MM1 presenta una iridiscencia tipo arcoíris difusa, expresando principalmente el color azul, verde y rojo sobre las colonias bacterianas (Fig. 7A). Mientras que la cepa bacteriana de *Rb-MM3* exhibe una iridiscencia que se clasifica como de tipo arcoíris (Fig. 7B).

En comparación, *Bi-HpVm* se clasifica con una iridiscencia bacteriana tipo difusa pastel, con el color azul como dominante, seguido de rojo, amarillo y verde (Fig. 7C). La cepa *Bi-HLvm* mostró una iridiscencia tipo arcoíris difusa, en donde se observa con mayor presencia el color azul sobre las colonias y estriados (Fig. 7D). La cepa de *Bi-Brc4* presentó iridiscencia bacteriana tipo difusa pastel, con colores intensos principalmente rojo, azul y un poco de amarillo respectivamente (Fig. 7E). La cepa de *Bi-E1Fon* mostró una iridiscencia tipo difusa pastel, con una intensidad baja/moderada debido al crecimiento lento de las colonias bacterianas y presenta principalmente el color azul (Fig. 7F).

En contraste, la cepa de *VpEMS-15* presenta una iridiscencia bacteriana metálica, exhibiendo diferentes colores con tonalidades intensas en los diferentes ángulos de incidencia con colores dominantes de azul y rojo (Fig. 7G). De manera similar, la cepa *Va-H₂Oubp* también presenta una iridiscencia metálica, con la presencia de diferentes colores con tonalidades intensas en los diferentes ángulos de incidencia con colores dominantes de rojo y azul (Fig. 7H). Finalmente, la cepa *CSA25-control* no presentó ningún tipo de color o efecto óptico como la iridiscencia, y las colonias fueron de un color crema opaco en los diferentes ángulos de incidencia (Fig. 7I).

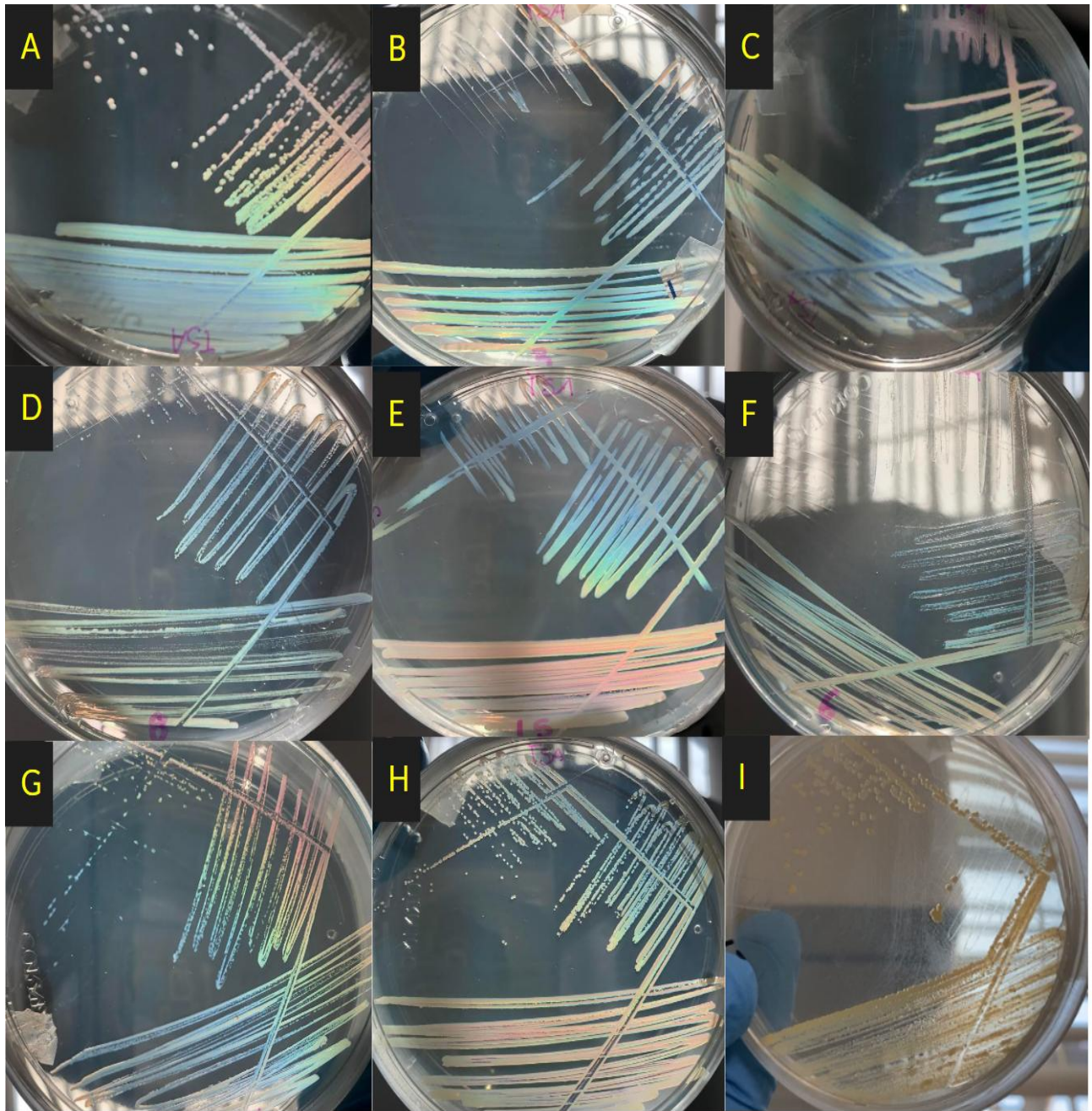


Figura 7. Iridiscencia bacteriana de 9 cepas aisladas a partir de epizootias en cultivos acuícolas. A) Rb-MM3 B) Rb-MM3. C) Bi-HpVm. D) Bi-HLvm. E) Bi-BrC4 F) Bi-E1Fon. G) VpEMS-15. H) Va-H₂Oubp. I) CSA25-control. Medio de cultivo Tripticaseína soja-agar enriquecido al 2% de NaCl e incubado a 28 °C x 24 – 120 hrs.

Se evaluó el efecto óptico de iridiscencia en cepas bacterianas mediante el análisis de la coloración estructural de sus colonias (Fig. 8). Para ello, se empleó una cámara digital de alta resolución y sensibilidad, equipada con sensor RGB, con un ángulo de incidencia de 55°, tras 21 horas de crecimiento. Las cepas del género *Vibrio* fueron analizadas con base en su espectro RGB. La cepa Rb-MM1 presentó colonias iridiscentes tipo “brillantina”, con tonalidades azul-verde evidentes y tamaño promedio de 1600 μm .

En contraste, la cepa Bi-HpVm formó colonias más grandes (2500 μm) con iridiscencia tipo arcoíris difusa, exhibiendo una gama de colores que incluía rojo, amarillo, verde y azul, además de puntos brillantes en los bordes que se difuminaban con el resto del patrón cromático. La cepa Bi-BrC4 mostró también iridiscencia tipo arcoíris difusa, aunque con una paleta limitada a rojo, amarillo y verde, generando puntos brillantes en regiones específicas del borde colonial.

Las cepas VpEMS-15 y Va-H2Oubp, también del género *Vibrio*, produjeron colonias de gran tamaño (>3500 μm) con iridiscencia tipo metálica, destacando por la intensidad de los colores, predominantemente verdes y azules, con presencia ocasional de amarillo y baja representación del rojo (Fig. 8G, H). Por su parte, la cepa Bi-HLvm del género *Aeromonas* presentó colonias intermedias (>1000 μm) con iridiscencia arcoíris difusa, caracterizada principalmente por tonalidades rojas y amarillas, con zonas verdes aisladas. La cepa Rb-MM3, del género *Mammaliicoccus*, desarrolló colonias pequeñas a medianas (>800 μm) con iridiscencia arcoíris difusa, compuesta por colores rojo, amarillo y verde.

La cepa Bi-E1Fon del género *Micrococcus* mostró una iridiscencia tipo brillantina con colores menos intensos, donde predominaron azul y rojo, y escasa presencia de verde. Esta cepa también generó puntos brillantes distribuidos a lo largo de la colonia (Fig. 8F). Finalmente, se confirmó que la cepa CSA25-control, perteneciente al género *Microbacterium*, no presentó iridiscencia bajo ningún ángulo de incidencia en condiciones de laboratorio controladas (Fig. 8I).

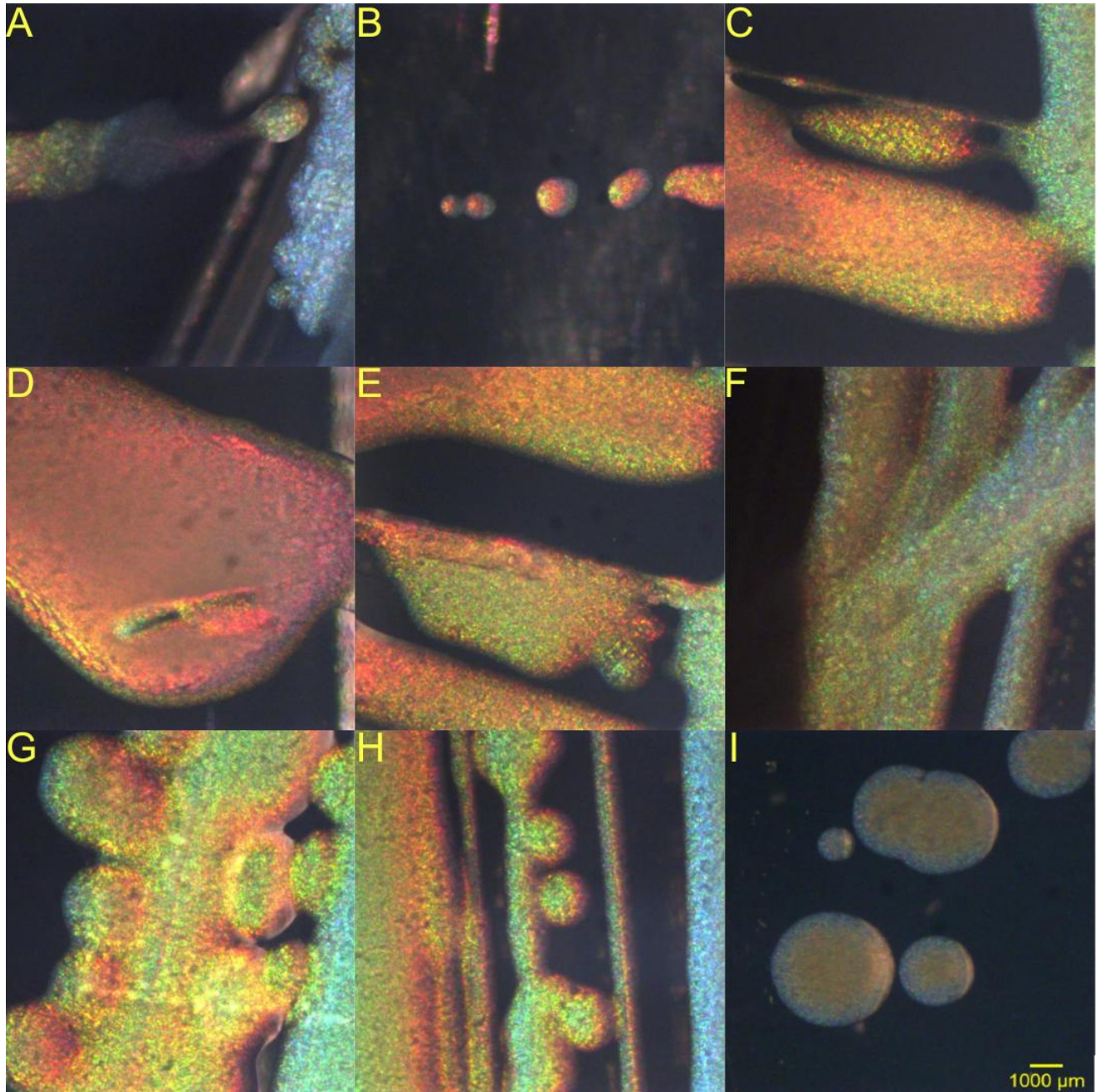


Figura 8. Características de iridiscencia bacteriana en cepas iridiscientes aisladas a partir de epizootias acuícolas. **A)** Rb-MM3 **B)** Rb-MM3. **C)** Bi-HpVm. **D)** Bi-HLvm. **E)** Bi-BrC4 **F)** Bi-E1Fon. **G)** VpEMS-15. **H)** Va-H₂Oubp. **I)** CSA25-control. Cámara digital High-Sensitivity USB 3.0 con sensor RGB (Thorlabs – U.S) y procesadas con el software Thor. Imagen editada en ImageJ versión 1.54j, con escala de 1000 μm. Se puede observar que ocho cepas presentan el efecto iridisciente o color estructural en sus colonias y cada cepa generó colores y patrones diferentes, mientras que una cepa se utilizó de control negativo iridisciente. Medio de cultivo utilizado para las pruebas fue TSA al 2% de NaCl e incubado a 28 °C x 24 – 120 hrs.

7.2.2. Genes relacionados con la iridiscencia

Se analizaron un total de 9 genomas de distintas cepas bacterianas para identificar la presencia de genes asociados a quitinasa, adhesina y ensamblaje pilar (Tabla V). Los genes de quitinasa estuvieron presentes en el 80% de los genomas analizados, excepto en las cepas Rb-MM3 (*Mammaliicoccus*) y la cepa CSA25-control (*Microbacterium*) donde no se detectaron. Por otro lado, los genes de adhesina fueron los más consistentemente detectados, encontrándose en 90% de los genomas. Solo Bi-E1Fon (*Micrococcus*) mostró ausencia de este gen y, los genes de ensamblaje pilar se identificaron en todas las cepas estudiadas.

Tabla V. Presencia / ausencia de genes relacionados con quitinasa, adhesinas y ensamblaje pilar en nueve cepas iridiscentes aisladas durante epizootias acuícolas

Genomas	Quitinasa	Adhesina	Ensamble pilar
Rb-MM1	X	X	X
Bi-Hp-C1	X	X	X
Bi-Br-C4	X	X	X
VpEMS-15	X	X	X
Va-H ₂ Oubp	X	X	X
Rb-MM3	-	X	X
Bi-HLvm	X	X	X
Bi-E1Fon	X	-	X
CSA25-control	-	X	X

(X) significa presencia

(-) significa ausencia

7.3. Análisis del potencial patogénico de las cepas bacterianas

7.3.1. Potencial genómico de patogenicidad y de resistencia

Las cinco cepas pertenecientes al género *Vibrio* presentaron un perfil de resistencia diverso y con diferencias particulares entre sí (Fig. 9). Por ejemplo, las cepas Bi-HpVm y Bi-BrC4, se caracterizaron por la presencia del gen Beta-lactamasa de clase A hidrolizante de carbenicilina (*blaCARB-44*) con 100% de identidad y el gen transportador de la familia de anti transportadores de eflujo de tetraciclina Na⁺/H⁺ (*tet35*) con una similitud menor al 40%. En comparación, la cepa Bi-HpVm presentó el gen de fosforribosiltransferasa de resistencia a la oxitetraciclina (*tet34*) con una identidad mayor al 50%, mientras que la cepa Va-H₂Oubp mostró la presencia del gen *tet35* con una identidad mayor al 80% y el gen beta-lactamasa de clase A hidrolizante de carbenicilina (*blaCARB-56*) con una identidad del 100%, el cual fue únicamente observado en este genoma. En el caso particular de la cepa VpEMS-15 se observó un perfil único con la presencia de dos genes que corresponden al gen beta-lactamasa de clase A hidrolizante de carbenicilina (*blaCARB-18*) y al gen de proteína repetida de pentapéptido resistente a quinolonas (*qnrD1*), con valores mayores al 90% de identidad. Finalmente, la última cepa de *Vibrio* (Rb-MM1) presentó solo el gen *tet35* con un porcentaje de identidad mayor al 80% (Fig. 9).

De manera similar, también para las cepas de los distintos géneros se observaron diversos patrones en la presencia de genes. Para la cepa del género *Aeromonas* (Bi-HLvm) se observó el gen beta-lactamasa de clase C (*blaTRU*), con un 100% de similitud, mientras que para la cepa del género *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) se observaron genes únicos, correspondientes al gen de proteína de protección ribosómica tipo ABC-F (*sal1*) y al gen transpeptidasa de peptidoglicano resistente a betalactámicos de la familia PBP2a (*mecA1*) con valores de 90 y 100%, respectivamente. Finalmente, se observó que las cepas asignadas al género *Actinomycetota* (Bi-E1Fon, CSA25-control) no presentaron ningún tipo de gen de resistencia adquirido.

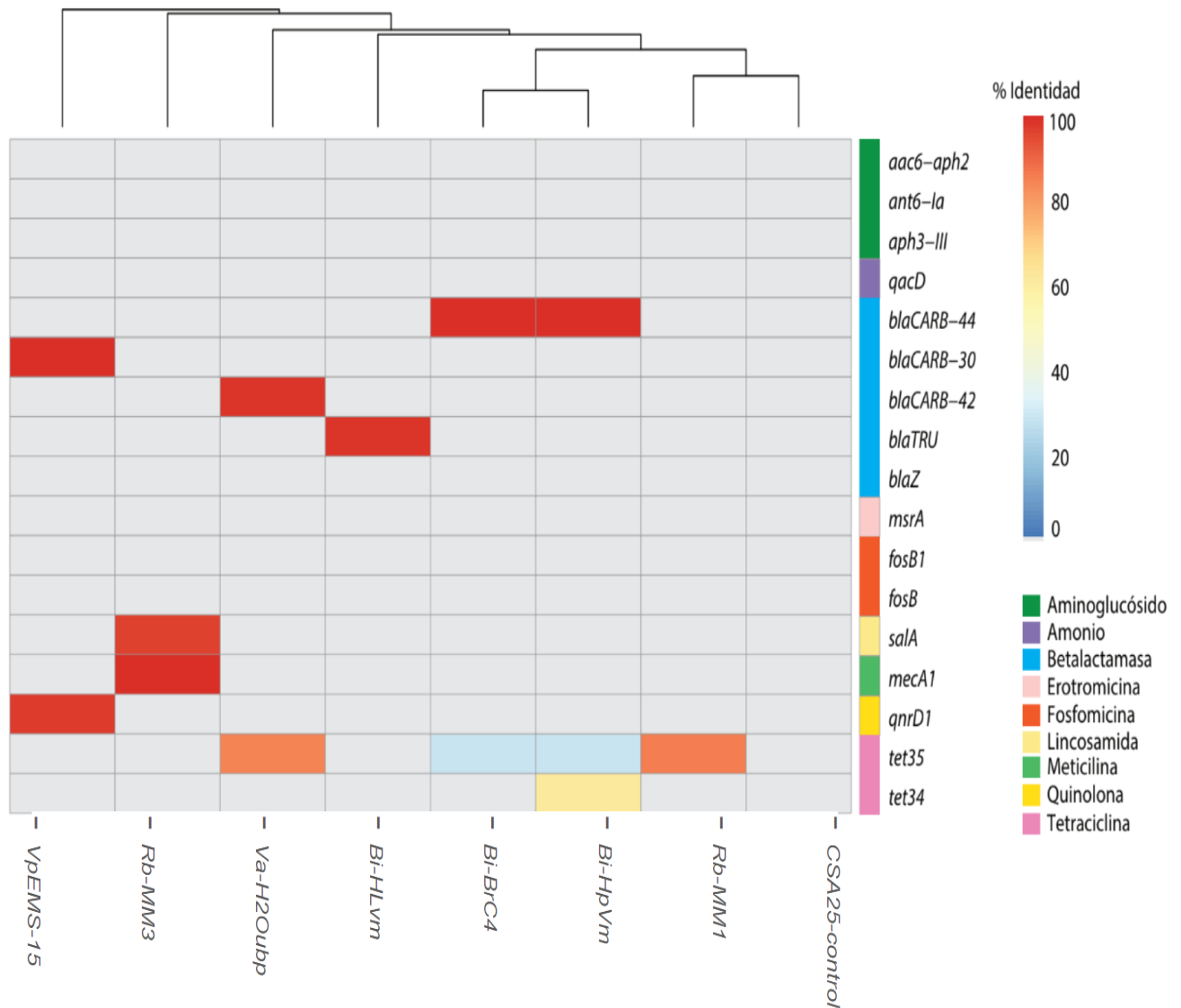


Figura 9. Análisis de matriz ResFinder con genes adquiridos y mutaciones cromosómicas de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootia. En la figura se presenta la ausencia o presencia de genes de resistencia, con su porcentaje de identidad con la secuencia comparada. Se colocó una escala de color donde el tono rojo refiere a un 100% porcentaje alto de identidad y un color azul es una similitud baja/nula. Además, se plasmó el acrónimo del gen de resistencia y con etiquetas de distintos colores se asoció a una familia de compuestos con amplio espectro de acción. Datos obtenidos con la herramienta digital ResFinder. Se implementó el programa Excel versión 18.0 para la captura de y análisis de los datos. Figura generada con Python.

Con respecto a la identificación de genes y mutaciones cromosómicas que regulan la resistencia a ciertos antibióticos, se observó que cuatro de las cepas del género *Vibrio* (Va-H₂Oubp, VpEMS-15, Bi-BrC4, Bi-HpVm) presentaron resistencia a la amoxicilina, ampicilina y piperacilina, pertenecientes a la familia de las betalactamasa con un 100% de identidad. En contraste, la cepa del género *Vibrio* (Rb-MM1) no presentó ningún gen de resistencia (Fig. 10).

De manera similar, la cepa del género *Aeromonas* (Bi-HLvm) obtuvo un perfil de genes variados de la familia de las betalactamasa, incluyendo la amoxicilina, ampicilina, piperacilina, cefotaxamina, penicilina, que corresponden a un total de nueve genes identificados con un 100% de similitud (Fig. 10).

La cepa del género *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) mostró resistencia a los doce compuestos pertenecientes a la familia de las betalactamasa con 100% de similitud, incluyendo dos genes de resistencia para la lincosamida y clindamicina y, además, presentó resistencia a tiamulina con un 93% de similitud. Adicionalmente, se observó la presencia de tres genes pertenecientes a la familia de las estreptogramina, que corresponden a la dalfopristina, pristinamicina iia, virginiamicina m con un 95% de similitud (Fig. 10). En comparación, la cepa del género *Microbacterium* (CSA25-control) y del género *Micrococcus* (Bi-E1Fon) no presentaron ningún tipo de gen de resistencia, ni tampoco presentaron mutaciones cromosómicas identificadas por medio de esta herramienta (Fig. 10).

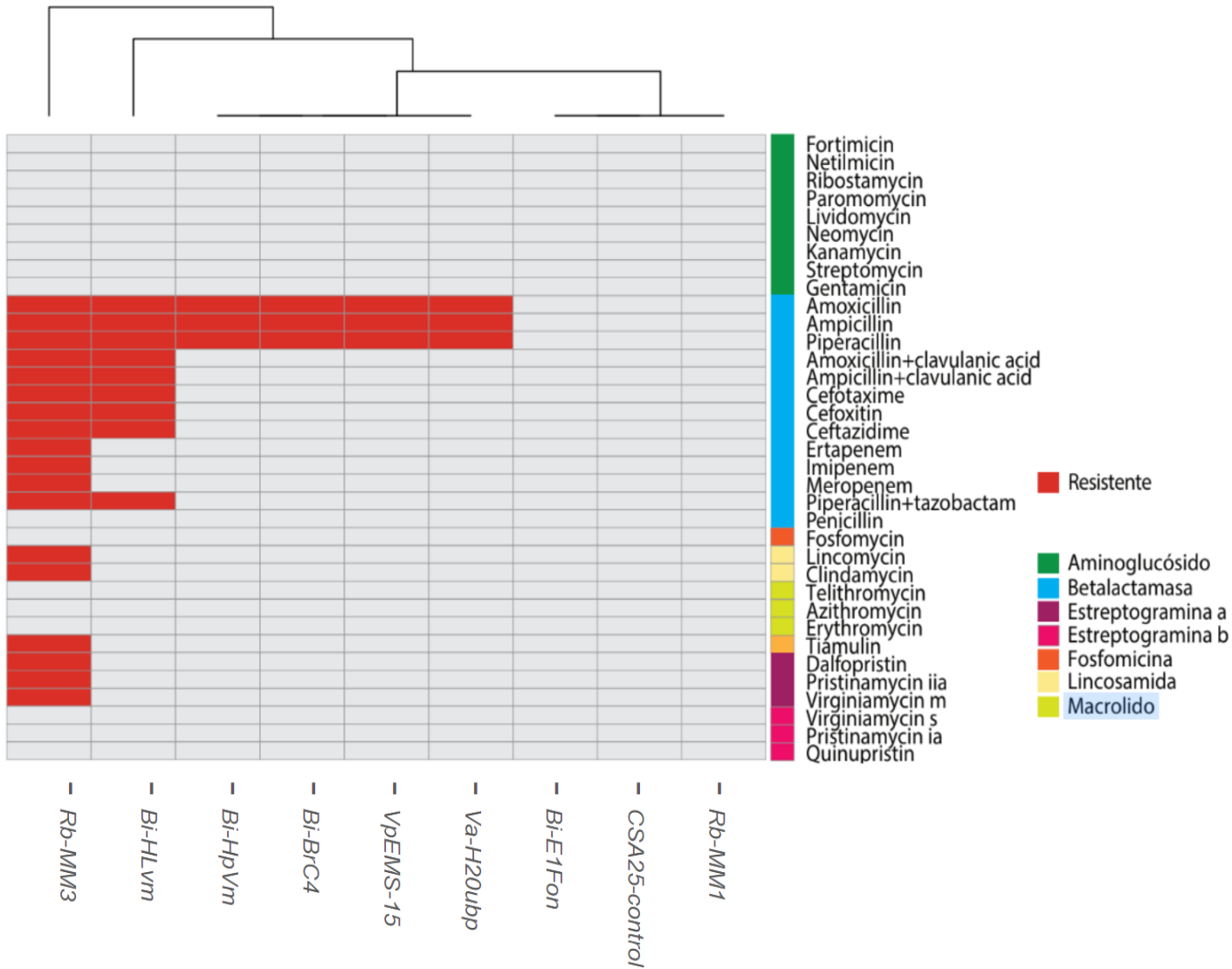


Figura 10. Presencia de genes adquiridos y de resistencia a fármacos basados en KmerResistance de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootia. En la figura se presenta la ausencia o presencia de genes de resistencia. Se colocó un indicador de color rojo donde este tono refiere a un porcentaje alto de identidad del 100%, un recuadro de color gris refiere a una similitud nula con las secuencias de referencia. Además, se colocó el nombre completo del compuesto o gen resistencia específico y con etiquetas de diferentes colores se asociaron con familias de antibióticos o compuestos químicos. Datos obtenidos con la herramienta digital KmerResistance. Se implementó el programa Excel versión 18.0 para la captura de los datos. Figura analizada y generada con el programa Python.

Mediante el análisis de genes de resistencia antimicrobiana (AMR) se identificó la presencia de 20 genes AMR en las cepas bacterianas estudiadas, con perfiles específicos según el género bacteriano (Fig. 11). Las cepas del género *Vibrio* (Bi-BrC4, Bi-HpVm, VpEMS-15, Va-H2Oubp, Rb-MM1) compartieron perfiles similares, destacando entre 3 y 5 genes de resistencia. En *Aeromonas* (Bi-HLvm) se identificaron 5 genes, en *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) 6 genes y en *Micrococcus* (Bi-E1Fon) 2 genes. Por su parte, la cepa control no iridiscente y no patógena, asignada al género *Microbacterium* (CSA25-control) no presentó genes AMR.

En particular, las cepas Bi-HpVm y Bi-BrC4 mostraron perfiles idénticos con genes *tet(34)* y *tet(35)* relacionados a la clase de tetraciclinas. Además, la presencia del gen cloranfenicol O-acetiltransferasa tipo B (*catC*) y, el gen *blaCARB-18* con similitudes de hasta el 100%. La cepa Va-H2Oubp presentó estos mismos genes, además del gen codificante para cefalosporinas de la clase C de la familia de beta-lactamasa (*ampC*) (47.87%) y el gen beta-lactamasa de clase A hidrolizante de carbenicilina (*blaCARB-56*) (99.65%). En VpEMS-15 se detectaron los genes *tet(34)*, *tet(35)*, *catC*, *blaCARB-56* y *qnrD1* (95.54%). La cepa Rb-MM1 compartió genes *blaCARB*, *tet(34)* y *tet(35)*, con similitudes que oscilaron entre 88.03% y 95.12%.

En la cepa identificada como *Aeromonas* (Bi-HLvm), se detectaron cinco genes, el primero correspondió a carbapenem beta-lactamasa de la clase C (*bla-TrU*) con un 98.95% de similitud, el gen arsenato reductasa dependiente de glutaredoxina (*arsC*) con un 81.56% de similitud. Otro gen identificado fue el transportador de eflujo de arsenito metalochaperona (*arsD*) con un 52.46% de identidad, el gen estreptogramina A O-acetiltransferasa (*vat*) con similitud del 67.63%. Finalmente, el gen de glutatión transferasa resistente a la fosfomicina (*fos*) con similitud del 57.78%. En la cepa *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) mostró seis genes, destacando el gen de subunidad de membrana del transportador de eflujo de arsenito (*arsB*), el gen de arsenato reductasa dependiente de tiorredoxina (*arsC*), también se identificó el gen de proteína de protección ribosómica tipo ABC-

F (*salA*), el gen beta-lactamasa de clase A hidrolizante de penicilina (*bla*), el codificante para la transpeptidasa de peptidoglicano resistente a betalactámicos (*mecA1*) y el gen de proteína de protección ribosómica tipo ABC-F asociada a macrólidos (*abc-f*), con similitudes variables desde 34.83% hasta 99.70%. Finalmente, en la cepa *Actinomycetota* (Bi-E1Fon) se identificaron los genes reductasa mercúrica (*merA*) con una similitud del 44.61% y, el gen para la proteína mediadora de expulsión de cloranfenicol (*cml*) con similitud del 74.62% (Fig. 11).

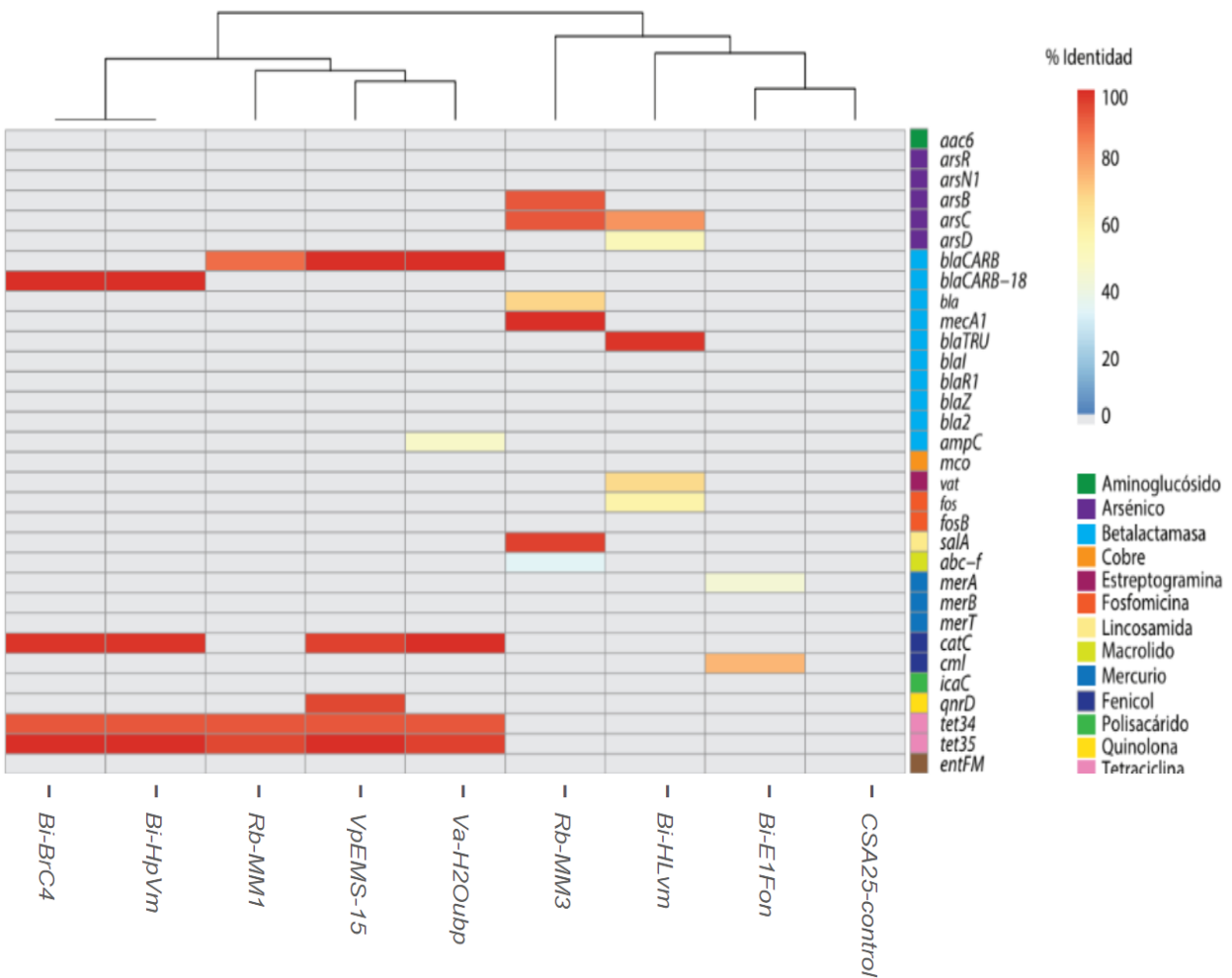


Figura 11. Matriz AMRfinder de genes adquiridos y mutaciones cromosómicas de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootia. En la figura se presenta la ausencia o presencia de genes de resistencia, con su porcentaje de identidad con la secuencia comparada. Se colocó una escala de color donde el tono rojo refiere a un 100% porcentaje alto de identidad y un color azul es una similitud baja/nula. Datos obtenidos con la herramienta digital ResFinder. Se implementó el programa Excel versión 18.0 para la captura y análisis de datos. Figura generada con programa "R".

7.3.2. Pruebas de sensibilidad química (antibiogramas)

Para evaluar la sensibilidad de las cepas bacterianas a distintos antibióticos se registró el efecto inhibitorio de tres antibióticos (enroflaxacina, florfenicol y oxitetraciclina) mediante ensayos de antibiogramas. Se observó que la enroflaxacina fue el compuesto químico que generó mayor efecto inhibitorio en las 9 cepas (>35 mm) (Fig. 12). El siguiente fue el florfenicol, con halos de tamaño medio (18 – 32 mm) y, por último, la oxitetraciclina presentó los halos más pequeños (< 20 mm), con el menor efecto inhibitorio sobre las cepas probadas (Tabla VI).

Tabla VI. Halos de inhibición generados por nueve cepas bacterianas iridiscente

Cepa	Inhibición Florfenicol (mm)	Inhibición Enroflaxacina (mm)	Inhibición Oxitetraciclina (mm)
Bi-MM1	15.3 ± 1.2	18.7 ± 4.0	13.0 ± 1.7
Bi-BrC4	18.3 ± 0.6	21.7 ± 0.6	11.7 ± 0.6
Bi-HpVm	16.0 ± 1.4	23.0 ± 1.0	10.7 ± 1.2
VpEMS-15	15.7 ± 0.6	19.7 ± 0.6	9.7 ± 1.2
Va-H₂Oubp	17.0 ± 0.0	22.3 ± 1.5	12.3 ± 1.2
Rb-MM3	16.0 ± 1.7	17.7 ± 1.2	11.0 ± 0.0
Bi-HLvm	18.3 ± 2.5	21.0 ± 3.5	13.7 ± 1.5
Bi-E1Fon	15.7 ± 0.6	23.0 ± 1.7	12.7 ± 1.2
CSA25-control	49.7 ± 3.5	54.3 ± 2.8	41.0 ± 1.7

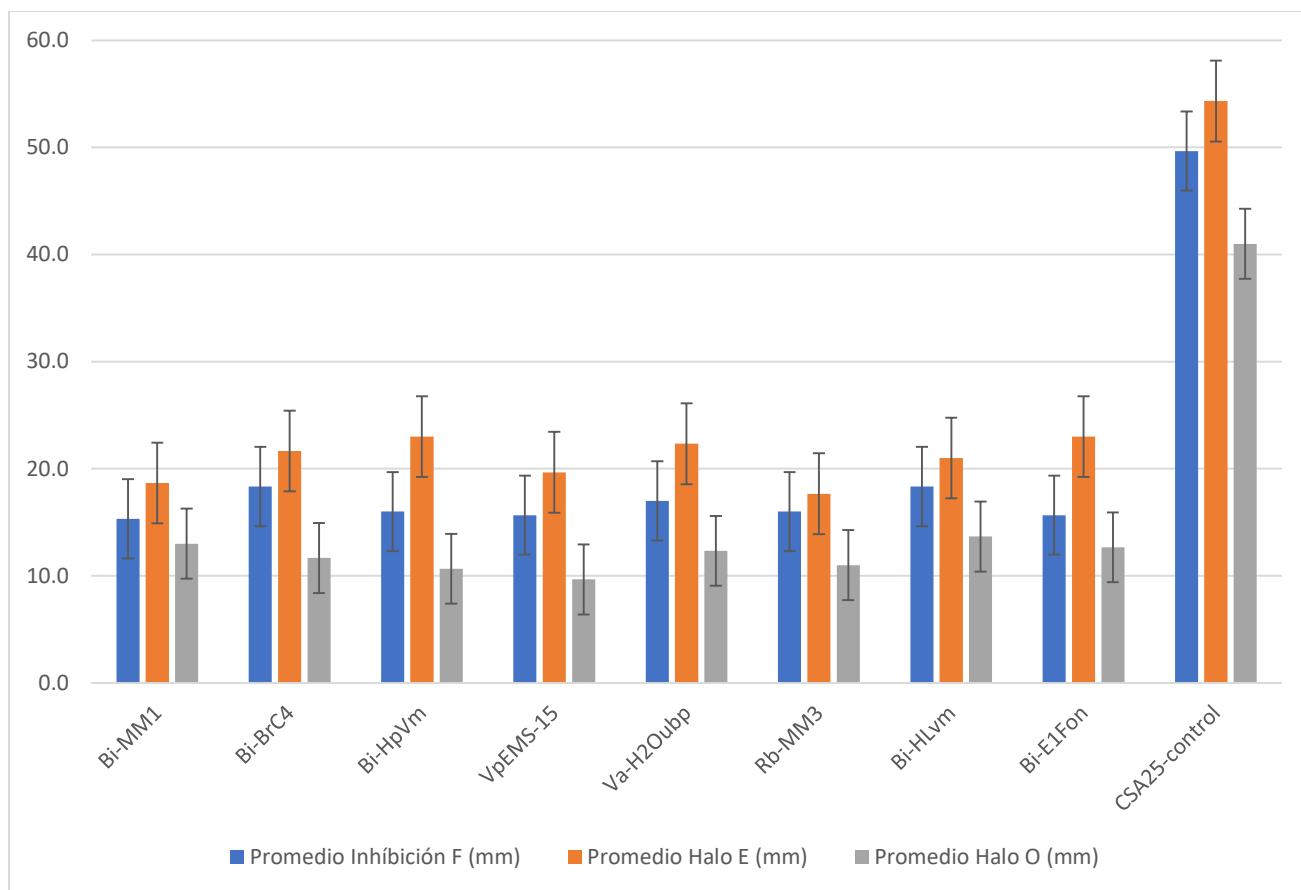


Figura 12. Sensibilidad química de bacterias iridiscentes aisladas a partir de epizootias acuícola. Se evaluó la resistencia a tres antibióticos de uso común en acuicultura, diluidos 1/10 de Enrokarizoo (enroflaxacina), Kariflor (florfenicol), Oxikarizoo (oxitetraciclina). Crecimiento evaluado en medio de cultivo TSA al 2% de NaCl, con 48 horas de incubación a 28 °C. Figura generada con Excel versión 18.0. Cepa CSA25-control es una bacteria no iridiscente.

7.3.3. Análisis genómico

Se secuenció el genoma de las cepas bacterianas de interés, el cual se analizó para obtener información filogenética, de potencial genómico para la resistencia de antibióticos y para la identificación de genes relacionados con el desplazamiento y acomodo celular en relación al fenómeno de iridiscencia. Las observaciones que resultaron del análisis de genomas se detallan en la sección correspondiente.

Con respecto a las características generales de los genomas se evaluó la diferencia en el tamaño, completitud del genoma, densidad de regiones

codificantes y contenido GC, principalmente. En general, los tamaños de los genomas obtenidos se encontraron con una longitud de 2.9 hasta 5.9 Mpb y con <2% de contaminación después de la secuenciación. Las cinco cepas asociadas al género *Vibrio* presentaron genomas >5 Mpb (Fig. 13A), de las cuales la cepa Rb-MM1 mostró el genoma más grande, con un tamaño de 5, 941, 599 pb (Fig. 13A).

En comparación, la cepa asociada al género *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) tuvo el genoma más pequeño con 2, 989, 028 pb (Fig. 13A). Además, los genomas generados tuvieron en su mayoría porcentajes de completitud del 99.85 – 100% (Fig. 16B), y valores de densidad de codificación en un rango de 84.5 hasta 92.8% con el valor máximo para la cepa CSA25-control (Fig. 13B). Referente a los valores obtenidos del porcentaje de guanina-citosina (GC), se observaron en un rango de 33 al 71%, de los que los genomas de las cepas de actinobacterias tuvieron los valores más altos de 67.9% y 71%, para las cepas CSA25-control y Bi-E1Fon, respectivamente (Fig. 13B).

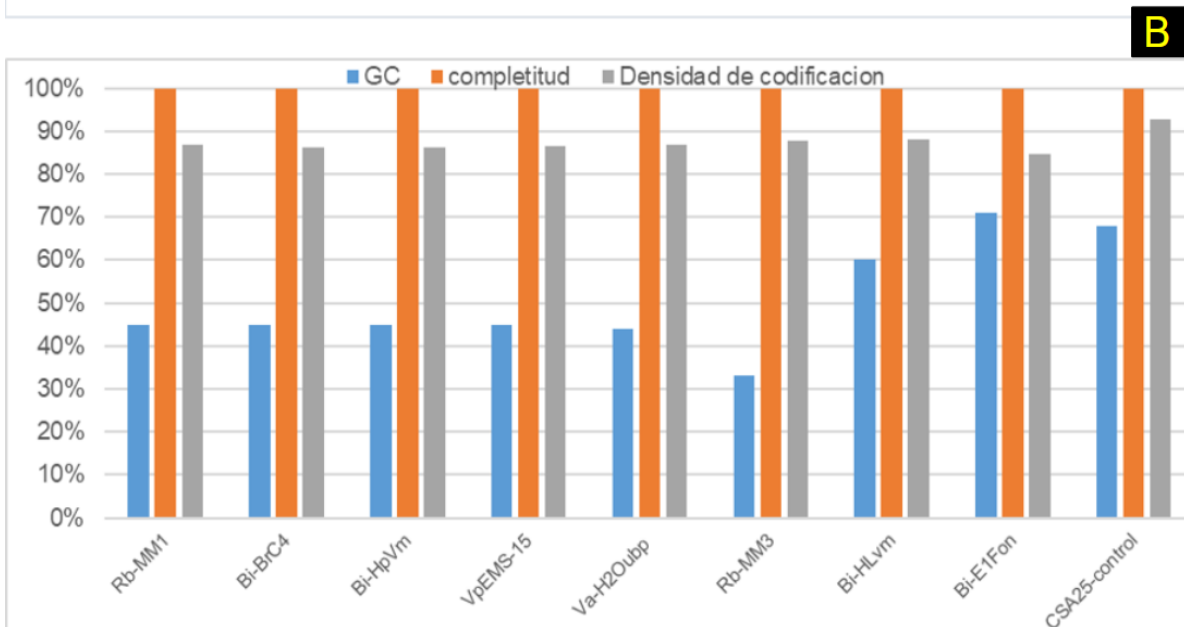
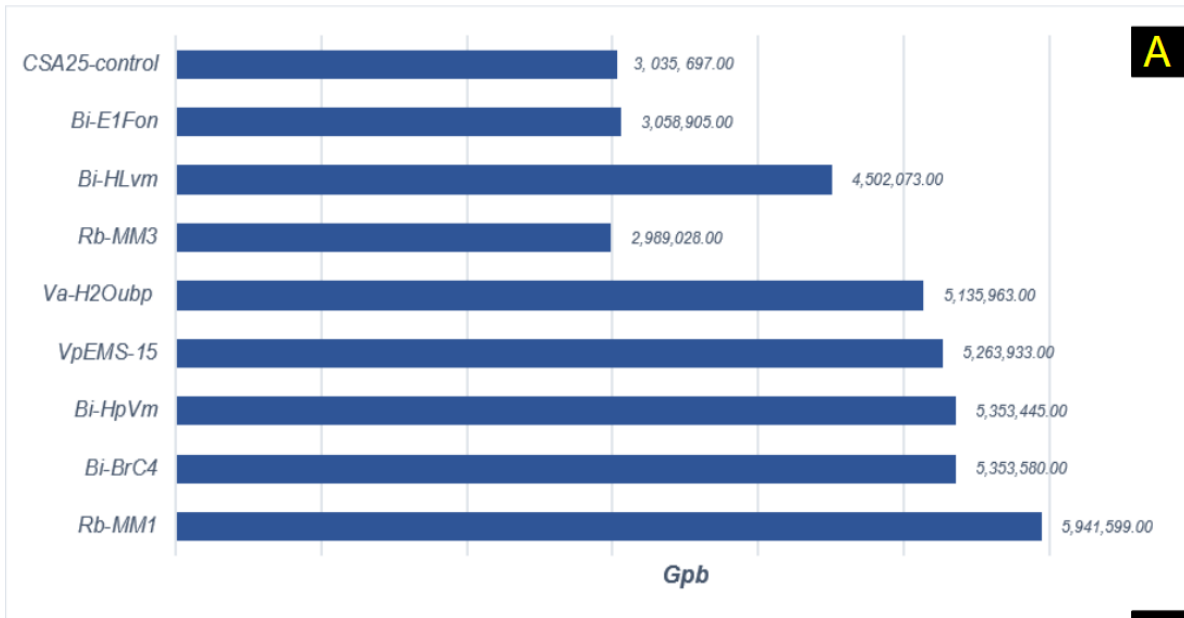


Figura 13. Datos genómicos obtenidos de nueve cepas aisladas durante eventos de epizootias. El método de secuenciación utilizado fue Illumina NextSeq 2000, con lecturas de 2x151 pb. A) Corresponde a los tamaños de genomas bacterianos obtenidos en Giga pares de bases (Gpb). B) En azul se muestra contenido de guanina-citosina, en anaranjado la completitud de la secuenciación genómica y, en gris la densidad de codificación con valores representados en porcentaje. Gráficas generadas con el programa excel versión 18.0.

En el mismo contexto, se analizó el metabolismo secundario de las nueve cepas bacterianas estudiadas mediante antiSMASH, se identificaron 66 grupos de genes biosintéticos (BGC), lo que resalta la diversidad de rutas metabólicas asociadas a metabolitos secundarios (Fig. 14).

En las cepas del género *Vibrio* (Bi-BrC4, Bi-HpVm, VpEMS-15, Va-H2Oubp, Rb-MM1), se observaron patrones comunes, incluyendo la presencia de genes asociados con la biosíntesis de arilpolienos, betalactonas y ectoínas. Además, cuatro de estas cepas (Bi-BrC4, Bi-HpVm, VpEMS-15 y Va-H2Oubp) contenían un gen de vibrioferrina, mientras que en la cepa Va-H2Oubp, se detectó un BGC específico para la síntesis de vancrobactina. La cepa Rb-MM1 destacó por la presencia de dos BGC RiPP, dos genes NPRS y un gen metalóforo NRP.

En la cepa *Aeromonas* (Bi-HLvm), se identificaron BGC únicos, incluyendo los asociados a la producción de cromobactina y lactona de hemoserina. Además, presentó genes relacionados con la biosíntesis de arilpolieno, betalactona, ectoína, un gen metalóforo NRP y uno NPRS. Por otro lado, la cepa identificada como *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) destacó por la presencia de cuatro BGC exclusivos: enterobactina, equibactina, autoinductor de lactona y venezolina.

También presentó dos genes sideróforos y un gen NPRS, aunque careció de genes de betalactona y ectoína. En la cepa de *Micrococcus* (Bi-E1Fon) y *Microbacterium* (CSA25-control), se identificaron genes para rutas únicas, como la producción de carotenoides y sacáridos. La cepa Bi-E1Fon mostró BGC exclusivos para la biosíntesis de estenotricina, microansamicina, cianuro de hidrógeno y un tiopéptido, mientras que ambas compartieron un gen sideróforo.

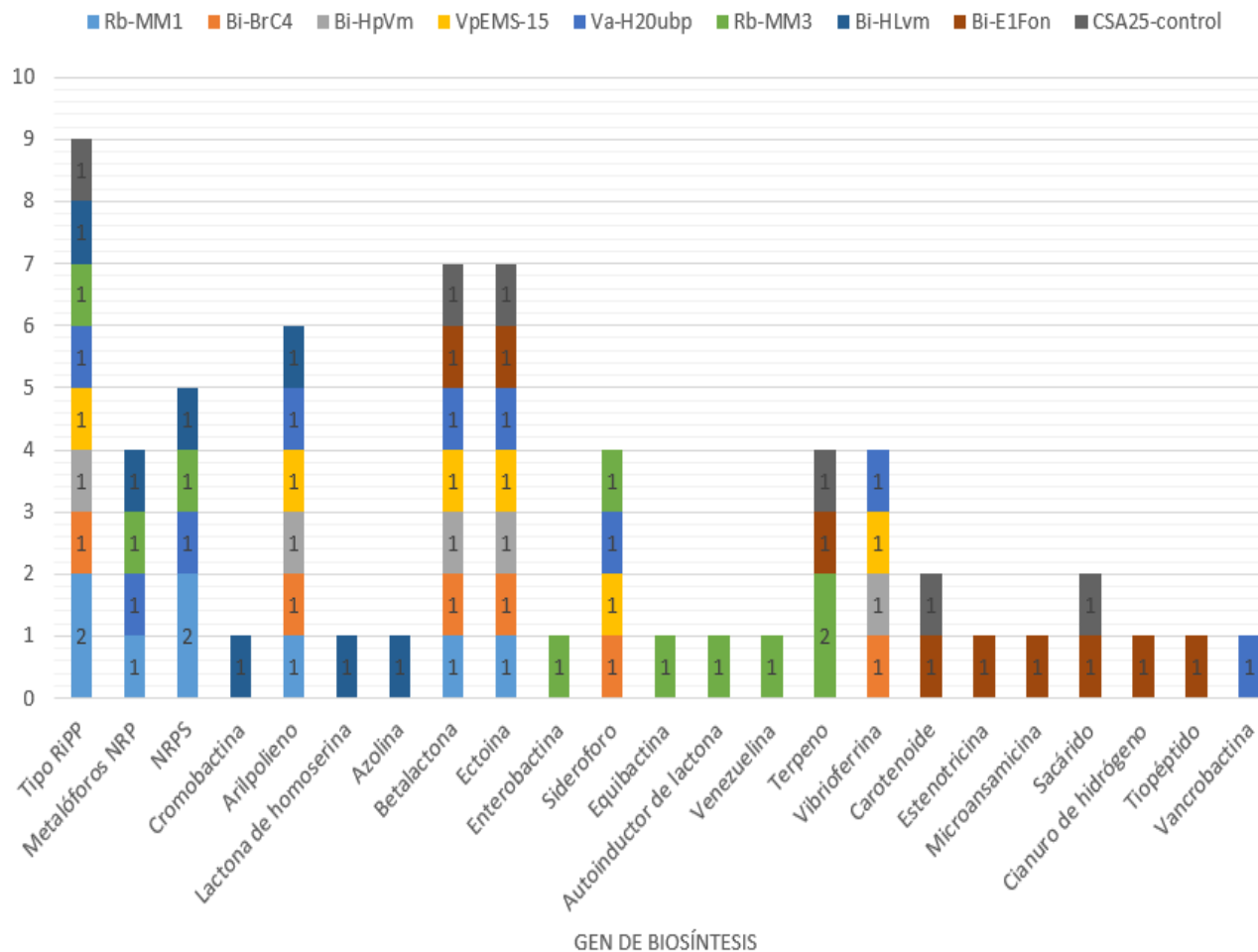


Figura 14. . Grupos de genes biosintéticos encontrados en el metabolismo secundario de distintas bacterias aisladas durante eventos de epizootias. En general se detectaron 23 grupos de genes asociados a rutas del metabolismo secundario, dentro de las nueve cepas analizadas y plasmados en una tabla acumulativa. El color de la barra corresponde a un género y especie bacteriana, datos obtenidos con la herramienta bioinformática antiSMASH versión 15.1.0. Gráficas generadas con programa Excel versión 18.0.

7.3.4. Bioensayos de patogenicidad

Para la realización de los bioensayos de infecciones bacterianas, se mantuvieron ejemplares de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en etapa de postlarvas bajo condiciones de cultivo hasta alcanzar una talla promedio de 12 milímetros (Fig. 15 y 16) y un peso de 0.01 gramos, momento en el cual fueron utilizadas para los desafíos de patogenicidad en laboratorio LPEA.

Durante el periodo de cultivo, se verificó que los parámetros físico-químicos del agua de mar se mantuvieran dentro de los valores establecidos para el bioensayo (salinidad: 34 UPS, temperatura: $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, OD: 5.0 - 8.0 mg/L; pH 7.5 ± 0.5 ; NAT: menor que 0.5 mg/L). En general, el acondicionamiento de las postlarvas resultó exitoso, ya que no se presentaron picos anormales de mortalidad ni signos de canibalismo.

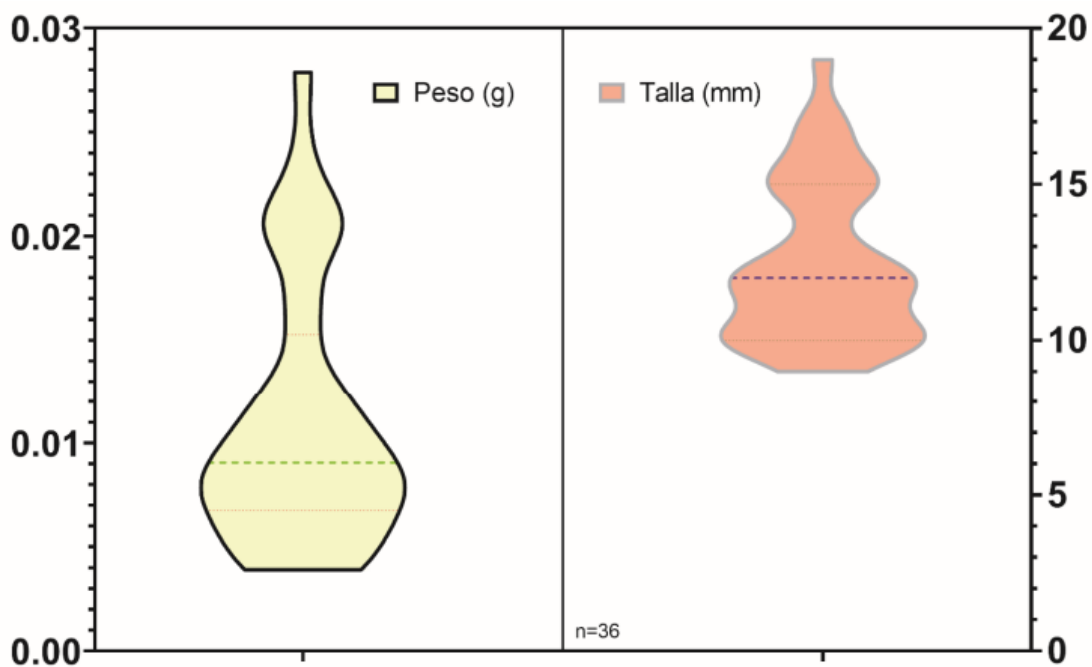


Figura 15. Peso y talla de postlarvas de camarón blanco *Penaeus vannamei* durante el acondicionamiento inicial para bioensayos.

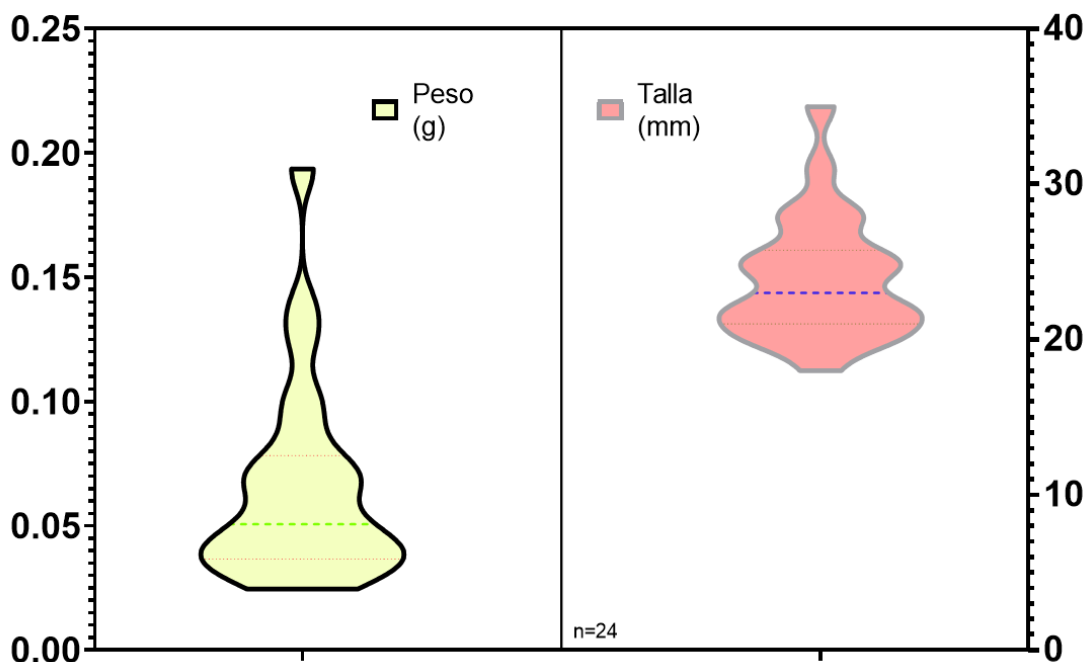


Figura 16. Peso y talla de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*), utilizadas durante las infecciones experimentales con bacterias iridiscentes.

Para estimar la dosis letal media de las bacterias iridiscentes, se utilizaron 5 concentraciones de inóculo bacteriano. Las células para el inóculo fueron cultivadas en una suspensión de medio de cultivo líquido Mueller-Hinton enriquecido al 2% NaCl. Además, se incluyó un control negativo libre de bacteria. En este bioensayo, la cepa VpEMS-15, positiva para los genes PirA/PirB asociadas a la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHNPD) se empleó como control positivo de patogenicidad iridiscente.

La concentración más baja de 3.9×10^1 UFC alcanzó una sobrevivencia mínima del 66% a las 90 hpi. Para la dosis de 3.9×10^2 UFC, la mínima sobrevivencia fue del 64% a las 90.54 hpi. En el caso de 3.9×10^3 UFC, se registró un 68% de sobrevivencia a las 90.54 hpi (Fig. 11). En la infección experimental con 3.9×10^4 UFC, la sobrevivencia mínima fue del 60% a las 90.54 hpi (Fig. 11). Para la concentración de 3.9×10^5 UFC, se obtuvo la menor tasa de sobrevivencia, alcanzando un 44% a las 90.54 hpi (Fig. 11).

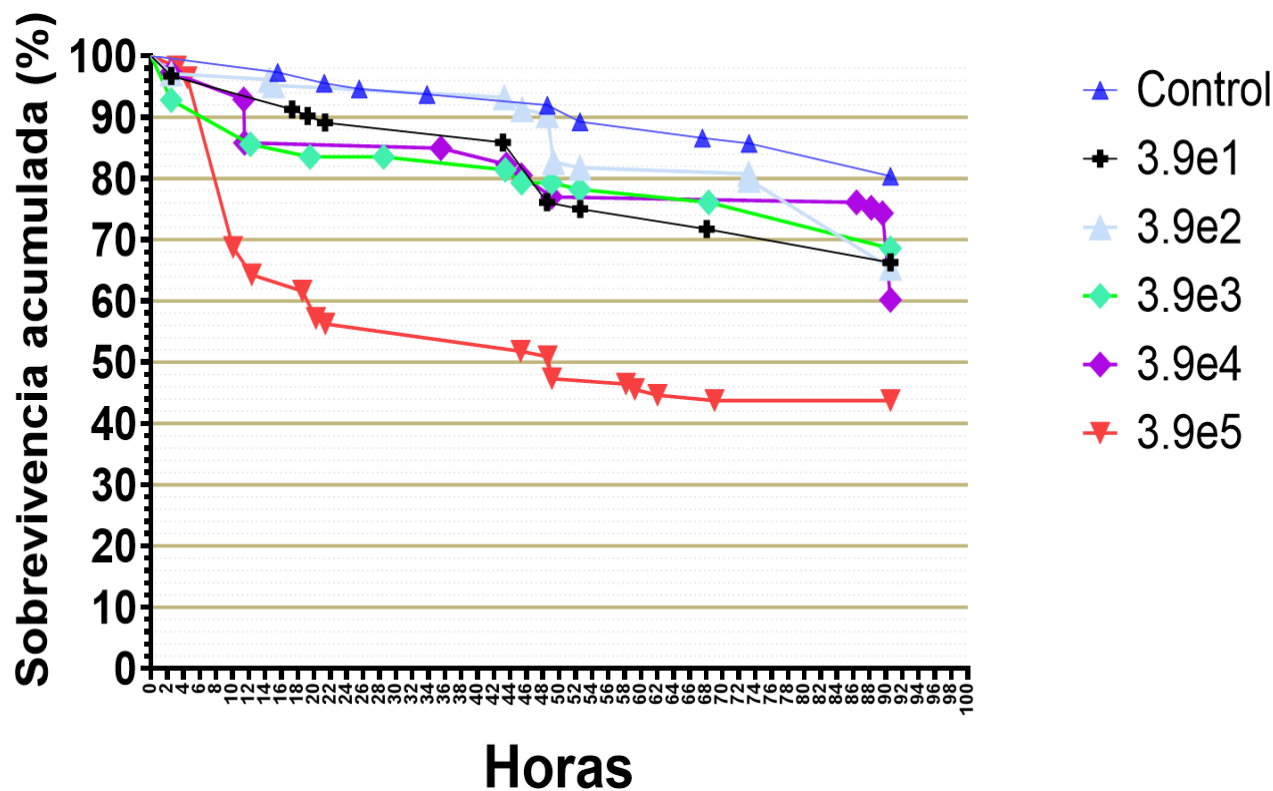


Figura 17. Curvas de sobrevivencia de *Penaeus vannamei* infectado experimentalmente con la cepa VpEMS-15. Se implementó el uso de 6 tratamientos a diferentes concentraciones de inóculo bacteriano y se presentan los distintos porcentajes de sobrevivencia obtenidos durante 90 horas. Datos anotados en programa Excel versión 18.0. Imagen generada y analizada con el programa GraphPad 8.3.0.

Durante el tiempo de experimentación se estimó la mortalidad y se analizaron las diferencias entre tratamientos. La dosis control presentó una tasa de mortalidad acumulada del 18%, siendo estadísticamente diferente a los otros cinco tratamientos. Los tratamientos correspondientes a 3.9×10^1 y 3.9×10^4 UFC presentaron distintas tasas de mortalidad con un rango de 34% al 56% y no mostraron ser significativamente diferentes. En comparación, el tratamiento de 3.9×10^5 fue el que generó un 56% de mortalidad acumulada durante las 90.54 horas que duró el experimento. Por lo que, resultó el tratamiento con más tasa de mortalidad acumulada y se diferenció significativamente de los otros cinco tratamientos (Fig. 17).

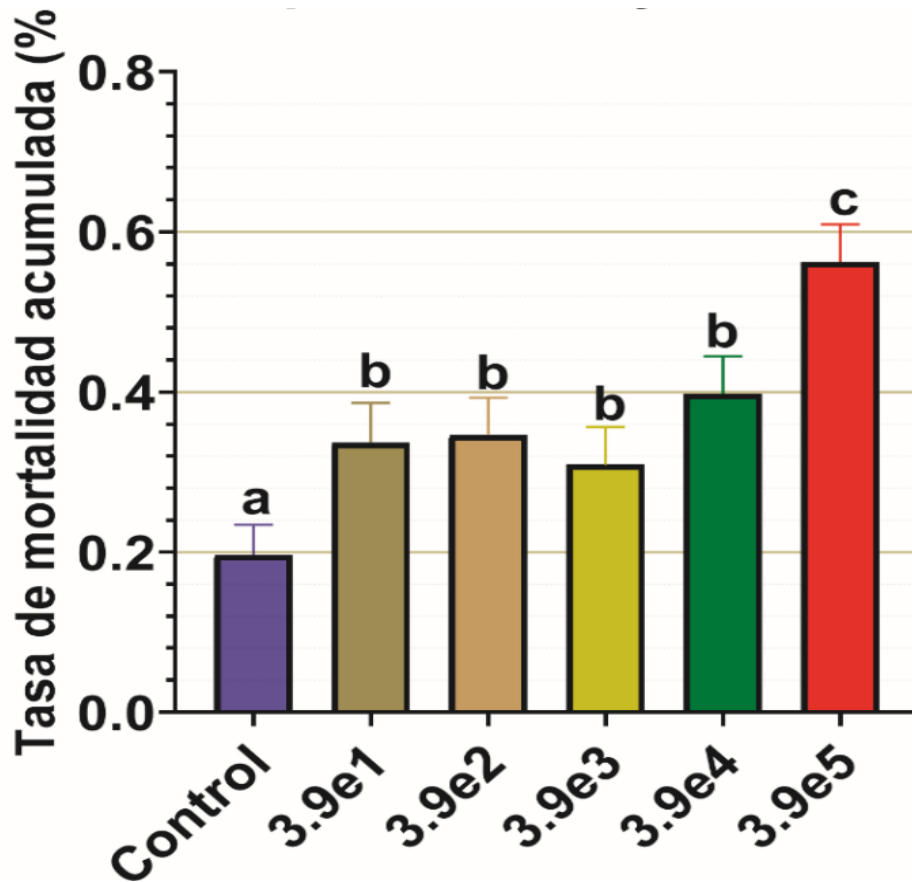


Figura 18. Tasa de mortalidad acumulada en pl's de camarón blanco, generada por la cepa VpEMS-15. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0.05$ (^{a,c} significativo; ^b no significativo).

Para evaluar las diferencias en la dosis letal media (LC50) de cada cepa se realizó una prueba Probit. Se observó que para la cepa VpEMS-15 el valor de LC50 fue de 36,308 UFC. En contraste, el valor de LC50 para los tratamientos de las cepas *Vibrio* Bi-BrC4 y Bi-HpVm resultaron significativamente iguales entre si y significativamente diferente a VpEMS-15. Finalmente, el tratamiento con concentración de 3.9×10^5 resultó ser diferente a los demás. Por último, con esta última concentración se logró generar más del 50% de mortalidad de los organismos infectados (Fig. 18).

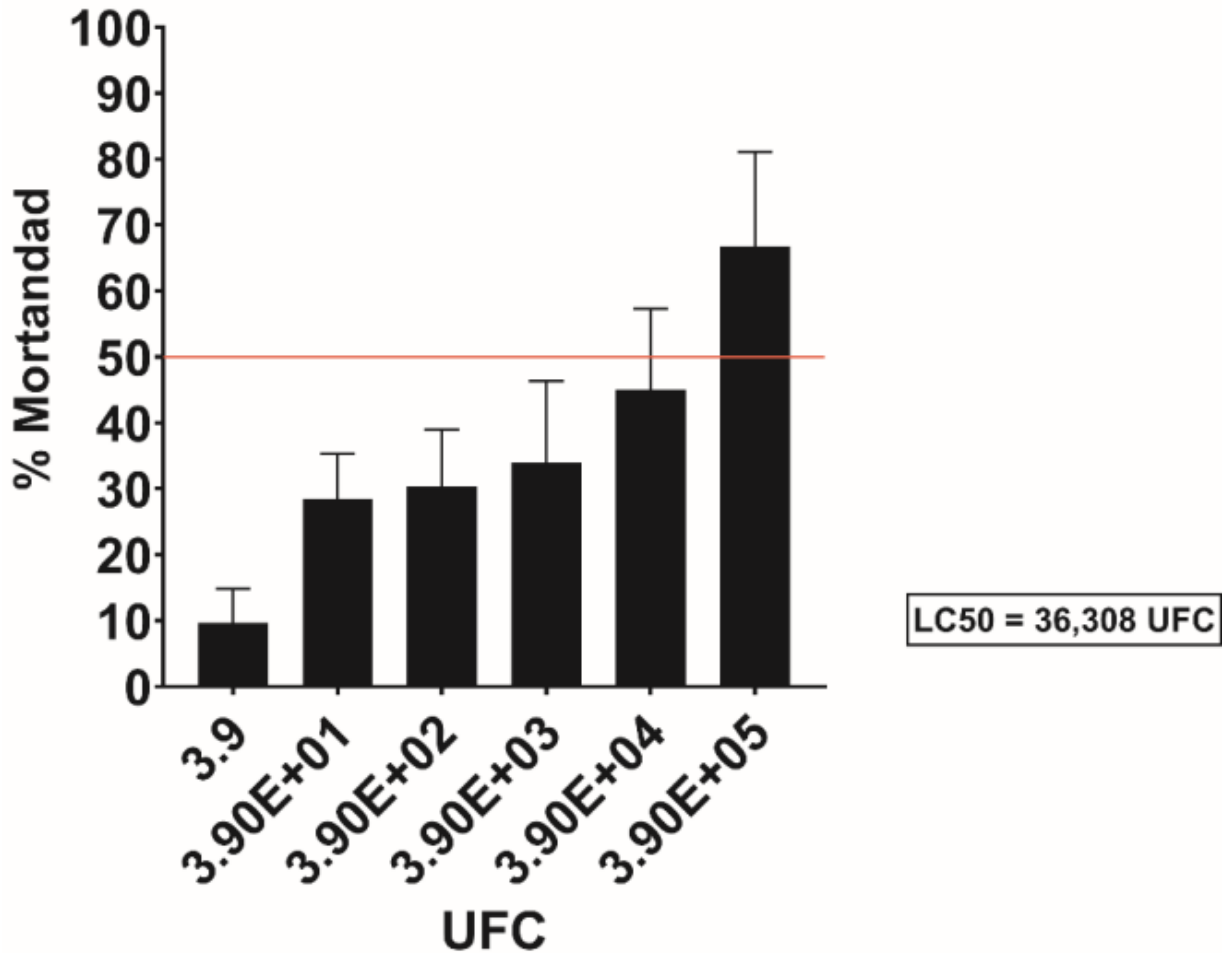
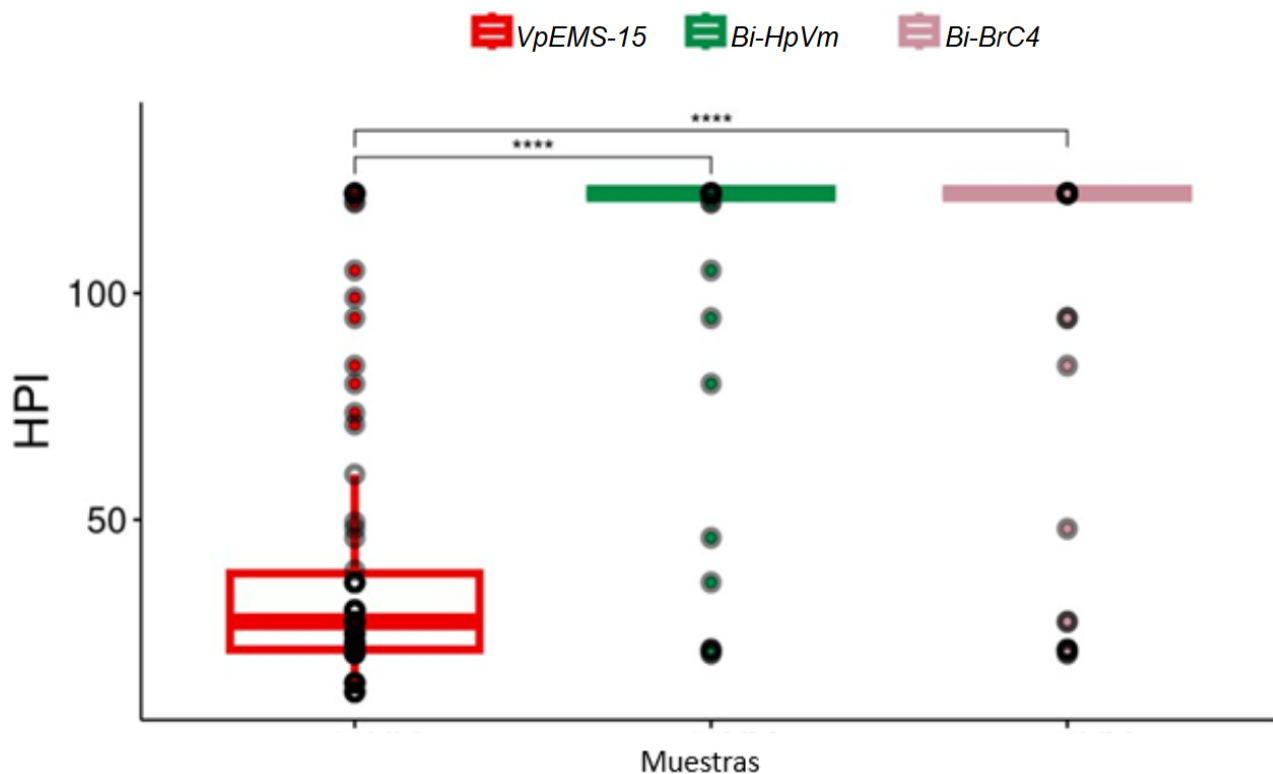


Figura 19. Implementación de prueba Probit para el cálculo de dosis media letal (LC50). Cantidad de bacterias en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la cepa VpEMS-15 necesarias para causar el 50% de mortalidad en una población específica de postlarvas de camarón blanco.

Con base en los resultados LC50 para las cepas evaluadas, se tomó la concentración de 3.9×10^5 para realizar las siguientes pruebas de infección. Se observó que la cepa VpEMS-15 resultó ser la más patógena, con una LC50 de 36,308 UFC a las 27.5 horas post infección (hpi) y presentó diferencias estadísticamente significativas con las cepas Bi-HpVm y Bi-Brc4 (Fig. 19). En comparación, entre las cepas Bi-HpVm y BrC4 no se encontró diferencias significativas, con valores de LC50 de 25,115 UFC y con una mortalidad inicial a las 20.5 hrs hpi, que resultan 8.5 hrs después de lo observado para VpEMS-15.



Kruskal-Wallis, $X^2(2) = 144.9$, $p < 0.0001$, $n = 270$. pwc: Prueba Dunn; ajuste: Bonferroni

Figura 20. Mortalidad registrada por tres cepas de *V. parahaemolyticus* (VpEMS-15, Bi-HpVm y Bi-BrC4) iridiscentes.

Una vez estandarizada la dosis letal media, se procedió a postular otros seis inóculos bacterianos correspondientes; tres cepas de *Vibrio* (Rb-MM1, VaH₂Oubp y VpEMS-15), una cepa de *Aeromonas* (Bi-HLvm), otra cepa asignada al género *Mammaliococcus* (Rb-MM3), y la cepa de *Actinomycetota* (CSA25-control) (Fig. 21). De manera general, las cepas de *Vibrio* obtuvieron diversos porcentajes de sobrevivencia (77.5 – 82.8%).

En específico, la cepa Rb-MM1 al final del experimento, presentó un total de 80.47% de sobrevivencia, mientras que la cepa VaH₂Oubp generó en el transcurso de 5 días, un total de 82.85% de sobrevivencia. De manera similar, la cepa VpEMS-15 resultó con un total de 77.50% de sobrevivencia acumulada (Fig. 21). En comparación, la cepa Bi-HLvm presentó un 83.81% de sobrevivencia al final del bioensayo, mientras que la cepa Rb-MM3 obtuvo un total de 88.09%, y la

cepa CSA25-Control registró un total de 92.38% en un transcurso de 120 horas de experimentación. Finalmente, la suspensión libre de bacteria control presentó una sobrevivencia del 95.14% (Fig. 21).

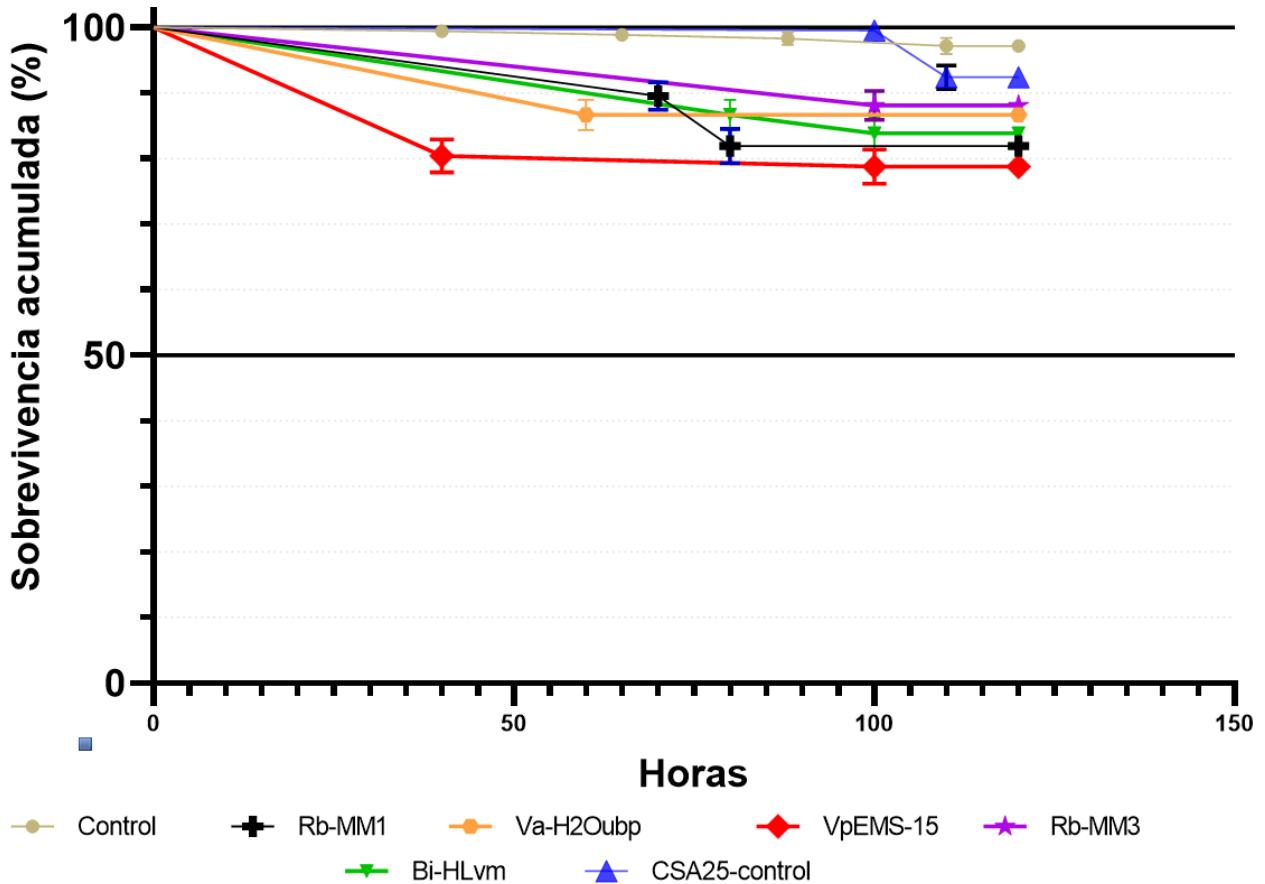


Figura 21. Curvas de sobrevivencia de *Penaeus vannamei* infectado experimentalmente con seis cepas bacterianas. Infección sumergida con dosis 3.9×10^5 UFC. *Vibrio* (Rb-MM1, Va-H₂Oubp) *Aeromonas* (Bi-HLvm) *Mammaliicoccus* (Rb-MM3) *Microbacterium* (CSA25-control). Se implementó el uso de 6 cepas distintas a una misma concentración de inóculo bacteriano y se presentan los distintos porcentajes de sobrevivencia obtenidos durante 120 horas de experimentación. Datos anotados en programa Excel versión 18.0. Imagen generada y analizada con el programa GraphPad 8.3.0.

8. Discusiones

Con este trabajo logramos obtener muestras de tejidos biológicos, de agua de cultivos acuícolas y de agua de mar del Valle de Mexicali y la Bahía de Ensenada. Fue posible obtener, purificar y secuenciar el genoma completo de diversas bacterias iridiscentes, pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Mammaliicoccus*, *Micrococcus* y *Microbacterium*. Estas bacterias fueron aisladas principalmente durante episodios de mortalidad en los cultivos. Es importante destacar que las pruebas microbiológicas convencionales no fueron suficientes para una identificación precisa a nivel de especie, siendo las moleculares las de mejor resolución taxonómica.

La caracterización microbiológica permitió evaluar el crecimiento y la composición bacteriana. No obstante, estos métodos presentan limitaciones significativas, como una alta probabilidad de contaminación y la falta de especificidad, lo que dificulta la diferenciación entre especies, y el cultivo de bacterias con requerimientos bioquímicos particulares. Por esta razón, como recomiendan Nigro & Steward (2015), se complementaron estos métodos con análisis adicionales para mejorar la identificación. Para respaldar este enfoque, se utilizó el medio ChromAgarTM-*Vibrio* que incorpora tecnología cromogénica, permitiendo así la diferenciación visual de especies bacterianas a través de los pigmentos presentes en las colonias, resultado de reacciones bioquímicas específicas con los sustratos asimilados por las bacterias (Canal et al. 2017; Hong et al., 2020).

El análisis microbiológico de muestras provenientes del Valle de Mexicali y la Bahía de Todos Santos reveló una notable diversidad bacteriana. En particular se obtuvo el aislamiento de *Vibrio*, el cual es un género ampliamente distribuido en ambientes oceánicos y en la microbiota de organismos acuáticos (Arias 2023). Además, se ha reportado que *Vibrio* pueden colonizar cultivos acuícolas en agua de bajas salinidad (Díaz, 2020), lo que nos evidencia su capacidad cosmopolita

de adaptación a distintos ambientes (Arias, 2023; Canal et al., 2017; Galaviz et al., 2018).

Una característica sobresaliente de estas bacterias aisladas fue la presencia de iridiscencia, con variaciones en tipo e intensidad. Este fenómeno se atribuye a estructuras físicas micrométricas responsables de la dispersión angular de la luz (Meadows et al., 2009; Vukusic, 2009). Aunque su función en bacterias no está completamente esclarecida, se ha propuesto su posible rol en la señalización, protección o termorregulación (Johansen et al., 2018). En este estudio, se aislaron cepas iridiscentes de *Vibrio* (Bi-HLvm, Bi-BrC4, VpEMS-15, Va-H2Oubp) y *Micrococcus* (Bi-E1fon) provenientes de ambientes desérticos, lo que sugiere que la iridiscencia podría estar relacionada con mecanismos de organización celular para la supervivencia y colonización en condiciones extremas. En el contexto de la acuicultura, donde los tanques de cultivo favorecen altas tasas de replicación bacteriana y tiempos de duplicación cortos, este fenómeno podría influir en la dinámica de interacción entre microorganismos y en la salud de los organismos cultivados.

Kientz et al. (2012) propusieron una clasificación de cuatro tipos de iridiscencia: arcoíris difusa, metálica, borde arcoíris e iridiscencia tipo brillantina. Además, proponen que la iridiscencia en bacterias suele estar asociada a la formación de biopelículas, cápsulas o capas de mucus, como se observa en diversas especies, incluyendo una cepa del género *Cellulophaga* caracterizada con una iridiscencia tipo arcoíris difusa. En el presente trabajo, se identificaron cepas del género *Vibrio* que expresaron iridiscencia tipo arcoíris difusa (*Rb-MM1*, *Bi-BrC4* y *Bi-HpVm*), así como cepas con iridiscencia metálica (*VpEMS-15* y *Va-H2Oubp*), observadas tanto en colonias individuales como en biopelículas bajo condiciones controladas. En todas ellas se aplicó la clasificación de Kientz et al. (2012), y se documentó que la intensidad del efecto óptico disminuía conforme la biopelícula aumentaba su grosor, lo cual es consistente con lo reportado por Johansen et al. (2018) en cepas de *Flavobacterium*.

No obstante, la iridiscencia no siempre está ligada a la formación de biopelículas. Por ejemplo, en géneros como *Flavobacterium*, la coloración estructural puede persistir en colonias sin biopelícula evidente y suele restaurarse al repicar en un nuevo medio. Este comportamiento también se observó en las 9 cepas aisladas, sugiriendo que existen mecanismos adicionales involucrados. Además, las observaciones en este estudio revelan patrones de organización celular que podrían estar vinculados con estrategias de colonización (Kientz et al., 2016).

Los datos obtenidos en este estudio revelan una diversidad morfológica e iridiscente entre las bacterias aisladas de ambientes acuáticos en Baja California, México. La iridiscencia en colonias de *Vibrio* y otras especies sugiere la posible presencia de genes asociados con el crecimiento y la motilidad bacteriana (Johansen et al., 2018; Kientz et al., 2012). En este trabajo, las cepas del género *Vibrio* mostraron patrones de organización celular y crecimiento que evidencian su capacidad de colonización, lo que coincide con los hallazgos reportados por Kientz et al. (2016), quienes describieron la iridiscencia en biopelículas de *Cellulophaga lytica*. Esta adaptación podría estar vinculada con estructuras especializadas que favorecen la supervivencia en ecosistemas acuáticos fluctuantes (Kientz et al., 2012; McBride, 2001). Además, la variabilidad en la iridiscencia entre las diferentes cepas sugiere que estos microorganismos podrían cumplir roles ecológicos diversos y cabe destacar que podría utilizarse como un indicador de salud microbiana. Por otro lado, el hecho de que géneros como *Aeromonas*, *Mammaliicoccus*, *Micrococcus* y *Microbacterium* también presenten iridiscencia, sugiere que no es exclusiva de un solo grupo, ampliando así las perspectivas sobre su funcionalidad en distintos entornos (Johansen et al., 2018).

La iridiscencia en colonias bacterianas cultivadas en medios sólidos se presentó como una característica fenotípica destacada en una cepa patógena de *Vibrio alginolyticus* aislada de camarón blanco. Se ha planteado que esta propiedad podría estar relacionada con la capacidad patogénica de la cepa (Mata, 2022). Diversos autores han asociado la iridiscencia con la presencia de

estructuras superficiales, biopelículas, sistemas de secreción y matrices extracelulares con un ordenamiento espacial definido, las cuales interactúan con la luz para generar este efecto óptico (Johansen et al., 2018; Kientz y et al., 2012). Estas estructuras no solo contribuyen a la iridiscencia, sino que también podrían desempeñar un papel clave en la adhesión a los tejidos del hospedador, la resistencia a factores ambientales y evasión del sistema inmunológico. En este contexto, es importante resaltar que algunos microorganismos patógenos podrían haber desarrollado la iridiscencia como una ventaja adaptativa, favoreciendo su capacidad de colonización y supervivencia en el hospedador.

Por otro lado, no se ha encontrado una correlación directa entre la iridiscencia y el potencial patogénico en relación con la producción de metabolitos secundarios o la expresión de genes específicos. Por lo que, la observación de este fenómeno en las bacterias estudiadas no solo proporciona información relevante sobre sus características fenotípicas, sino que también plantea la hipótesis sobre su posible papel en la patogenicidad. La iridiscencia podría servir como un marcador fenotípico para identificar microorganismos con un mayor potencial infeccioso, lo cual abre la posibilidad de estudios futuros enfocados en explorar los mecanismos moleculares que sustentan esta asociación.

Además de las diferencias en los tiempos de duplicación, se observó que las cepas presentaron variaciones significativas en sus patrones de crecimiento, lo que sugiere una diversidad funcional que podría estar relacionada con su adaptación a diferentes ambientes. Las cepas del género *Vibrio* no solo presentaron tiempos de duplicación más cortos, sino que también alcanzaron la fase exponencial en un tiempo menor en comparación con las cepas de otros géneros, lo que indica una mayor capacidad de proliferación. Fernández et al. (2017), describieron una cepa patógena de *V. alginolyticus* que presentó su fase exponencial de crecimiento en un lapso de tiempo de 300 min. En este trabajo, la cepa de *V. alginolyticus* (Va-H₂Oubp) presentó un tiempo de duplicación de 58.03 min, lo que representa una diferencia considerable y sugiere una capacidad de replicación que puede estar relacionada con su alta patogenicidad. En contraste,

las cepas de *Aeromonas*, *Mammaliicoccus* y *Actinobacterias* mostraron un crecimiento más lento, lo que podría indicar una adaptación a nichos ecológicos específicos donde la competencia por recursos es diferente.

En este contexto, Pantoja y colaboradores (2018) describieron una cepa del género *Microbacterium* con un tiempo de duplicación de 33,64 horas. En contraste, la cepa CSA25-control analizada en este estudio presentó un tiempo de duplicación de 2.22 horas, evidenciando una notable diferencia en la dinámica de crecimiento. Esta variabilidad sugiere que CSA25-control posee una mayor eficiencia metabólica en las condiciones evaluadas (Yamamoto & Asano, 2015). Cabe destacar que una duplicación rápida puede traducirse en ventajas competitivas en procesos productivos, como la generación de biomasa o la producción de metabolitos secundarios (Park et al., 2008).

En cuanto a la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl en los medios de cultivos, la cepa de *Micrococcus endophyticus* (Bi-E1Fon) mostró similitudes con la cepa descrita por Chen y colaboradores (2009), quienes reportaron una cepa de *M. endophyticus* con un crecimiento óptimo a 28 °C, en un rango de pH 7.0–8.0 y tolerancia a NaCl de hasta el 10%. Sin embargo, mientras la cepa estudiada por Chen et al. mostró una mayor tolerancia a la salinidad, alcanzando hasta un 10% de NaCl, la cepa Bi-E1Fon analizada en este trabajo presentó un rango más limitado, creciendo únicamente entre 0 y 4%. Estas diferencias podrían estar relacionadas con variaciones metabólicas o en los mecanismos de osmoregulación entre ambas cepas.

Por otro lado, el análisis de genes de resistencia en las cepas *Vibrio* sugiere que estos microorganismos han estado expuestos a ambientes con un uso predominante de antibióticos o a prácticas de aplicación indiscriminada de estos compuestos. En particular, la cepa Va-H₂Oubp identificada como *V. alginolyticus* presentó un perfil ligeramente más diverso, incluyendo el gen *ampC*, asociado a una beta lactamasa de clase C, aunque con un porcentaje de similitud relativamente bajo (47.87%), lo que indica que podría estar desarrollando o

manteniendo mecanismos de resistencia menos conservados en comparación con otras cepas. Este hallazgo es particularmente relevante dado que la presencia de múltiples genes de resistencia en una cepa incrementa su capacidad de supervivencia en entornos con antibióticos, lo que representa un desafío para el tratamiento de brotes infecciosos en la industria acuícola.

De forma complementaria, se identificaron en este estudio perfiles de resistencia antimicrobiana diversos incluso dentro del mismo género, como en el caso de las cepas *Vibrio* Bi-BrC4, Bi-HpVm, Va-H2Oubp y VpEMS-15, las cuales compartieron genes como *tet(34)*, *tet(35)*, *catC* y distintas variantes de *blaCARB*, pero también presentaron combinaciones únicas como *qnrD1* o *ampC*, reflejando una posible presión de selección específica del ambiente.

El hallazgo de genes relacionados con la resistencia a metales pesados en la cepa Bi-HLvm es especialmente significativo, ya que sugiere que estas cepas podrían estar adaptándose a ambientes contaminados por estos compuestos, lo cual podría representar una ventaja competitiva en dichos entornos. Asimismo, la identificación de genes relacionados con la biosíntesis de sideróforos y metalóforos, junto con la presencia de rutas metabólicas específicas para la asimilación de metales pesados (mercurio, plomo y arsénico), sugiere que estas bacterias han desarrollado mecanismos complejos para aprovechar y resistir ambientes con condiciones extremas, como aquellos con contaminación metálica. Esto genera especial relevancia a la luz de las respuestas transcriptómicas observadas en *Crassostrea gigas*, donde la homeostasis de metales se activa como parte de la respuesta al estrés inducido por *V. tasmaniensis*, indicando que estos metales también podrían estar involucrados en la dinámica patógeno-hospedador (Rubio et al., 2019).

Además, estos genes podrían estar co-localizados con genes de resistencia a antibióticos en elementos genéticos móviles, facilitando su transferencia horizontal a otras bacterias, aumentando así la propagación de mecanismos de resistencia. Además, la cepa Rb-MM3, perteneciente al género

Mammaliicoccus, presentó un perfil de resistencia amplio, con seis genes AMR, incluyendo *mecA1*, que confiere resistencia a meticilina. Este resultado sugiere que esta cepa podría representar una amenaza debido a que no solo afecta a los organismos cultivados, sino que también representa un peligro para la salud humana, especialmente en escenarios donde la resistencia a betalactámicos limita las opciones terapéuticas.

Es interesante destacar que una de las cepas *Actinomycetota* (CSA25-control) no presentó genes AMR detectables, mientras que la cepa Bi-E1Fon sí presentó dos genes, lo que resalta la heterogeneidad en la capacidad de resistencia dentro de este filo. La cepa Bi-E1Fon presentó el gen *merA* asociado con la resistencia al mercurio, lo que sugiere que ha estado expuesta a ambientes contaminados por este metal, el segundo gen *cmI* refuerza su resistencia a fenicoles como el cloranfenicol. Los resultados sugieren que las cepas bacterianas estudiadas no sólo han desarrollado resistencia frente a antibióticos de amplio espectro, como las tetraciclinas, sino también a metales pesados como el arsénico y el mercurio. Este fenómeno podría estar relacionado con procesos de co-selección en ambientes contaminados o expuestos a altas concentraciones de antibióticos y metales pesados, lo que favorece la supervivencia de cepas con perfiles AMR complejos.

La diversidad de genes biosintéticos (BGC) encontrados, como los relacionados con la síntesis de betalactonas, ectoínas, arilpolienos, sideróforos y compuestos antimicrobianos como la estenotricina, refuerza la idea de que estas cepas poseen una notable plasticidad metabólica que podría estar asociada a ventajas ecológicas, competencia microbiana, patogenicidad y se involucren indirectamente con el fenómeno de iridiscencia.

Específicamente, los genes de quitinasa (*chiA*, *COD*, *chbG*) codifican enzimas capaces de degradar quitina, un polisacárido estructural abundante en el exoesqueleto de crustáceos y en el peritrofo epitelial de algunos moluscos y peces, lo que sugiere un posible rol ecológico y patogénico. Se identificaron en el

80% de los genomas analizados en este estudio, predominando en gammaproteobacterias del género *Vibrio* (Bi-MM1, Bi-HpVm, Bi-BrC4, VpEMS-15 y Va-H₂Oubp), seguido de *Aeromonas* (Bi-HLvm) y finalmente, en la cepa gram positiva *Micrococcus* (Bi-E1fon). Diversos estudios han señalado que las quitinasas bacterianas no solo facilitan la obtención de nutrientes en ambientes acuáticos ricos en materia orgánica, sino que también actúan como factores de virulencia al romper las barreras estructurales de los hospedadores, promoviendo así la colonización e infección (Zhang et al., 2020; Liu et al., 2011). La presencia de genes de quitinasa podría estar vinculada con la capacidad de las cepas patógenas para invadir tejidos quitinosos y causar enfermedad, lo que refuerza su relevancia funcional en entornos de cultivo intensivo.

En contraste, las cepas *Mammaliococcus sciuri* (Rb-MM3) y *Microbacterium esteraromaticum* (CSA25-control) fueron las únicas en las que no se detectaron genes de quitinasas. Estos hallazgos son congruentes con los reportados por Cottrell et al. (2000), quienes observaron que la mayoría de las bacterias con genes de quitinasas eran bacterias gram negativas pertenecientes a la clase Gammaproteobacterias, y en menor proporción las gram positivas aisladas de ambientes oceánicos y estuarinos. Esto resalta las posibles diferencias adaptativas y formas de colonizar presentes en los genomas de estas especies.

Las adhesinas permiten a las bacterias adherirse a superficies biológicas como mucosas, tejidos epiteliales o estructuras quitinosas, facilitando así la invasión del hospedador (Kline et al., 2009; Luo et al., 2021). Además, estas estructuras participan en la formación de biopelículas y una mayor capacidad de las cepas para colonizar, adquirir resistencia y ser más patógena (Dang & Lovell, 2016; Karatan & Watnick, 2009). Los genes de adhesina estuvieron presentes en el 90% de las cepas analizadas en este trabajo, mientras que los genes asociados al ensamblaje piloso se detectaron en el 100%. Esto podría indicar que la presencia generalizada de genes de adhesina y ensamblaje piloso son funciones esenciales y posiblemente conservadas en las interacciones bacteria-

hospedador, particularmente en contextos acuáticos. Esta observación concuerda con estudios previos, como el de Rubio et al. (2019), donde cepas patógenas de *Vibrio* demostraron una inducción transcripcional localizada de genes de adhesión, secreción y toxinas durante la colonización de ostras. Finalmente, la presencia combinada de factores de adhesión, ensamblaje piloso y genes AMR, junto con la posible asociación entre iridiscencia bacteriana y organización estructural, refuerza la importancia de estos elementos en la dinámica de colonización y virulencia bacteriana.

Los bioensayos de patogenicidad realizados en *Penaeus vannamei* confirmaron que algunas cepas bacterianas iridiscentes aisladas durante eventos de epizootias presentan un alto potencial patógeno, destacando la cepa VpEMS-15 (*Vibrio parahaemolyticus* iridiscente) como la más virulenta, con una concentración letal media (LC₅₀) de 36,308 UFC a las 27.5 horas post-infección. Otras cepas iridiscentes del mismo género, como Bi-HpVm y Bi-BrC4, también mostraron capacidad patogénica, aunque con valores de LC₅₀ significativamente distintos. En contraste, la cepa no iridiscente CSA25-control (*Microbacterium esteraromaticum*) mostró una alta tasa de sobrevivencia, lo que refuerza la hipótesis de que el fenómeno iridiscente podría estar vinculado a la patogenicidad. Esta correlación se ve fortalecida al considerar que las cepas más virulentas compartieron no solo la iridiscencia como rasgo fenotípico, sino también perfiles genómicos con presencia de genes clave relacionados con virulencia, como adhesinas, estructuras pilosas y quitinasas. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la iridiscencia podría ser utilizada como un biomarcador visual útil para la detección temprana de cepas bacterianas potencialmente patógenas en ambientes acuáticos.

La correlación entre la iridiscencia y la patogenicidad sigue siendo un área de estudio poco explorada en acuicultura. Si bien este trabajo no establece una relación directa entre la iridiscencia y genes específicos responsables del fenómeno óptico, la fuerte asociación fenotípica de la iridiscencia con cepas patógenas en este estudio, junto con la presencia de un arsenal genético de

virulencia y resistencia, apoya la idea de que la iridiscencia podría ser un indicativo de cepas con mayor capacidad de colonización y daño en ambientes acuáticos, posiblemente relacionada con una compleja organización celular que optimiza la interacción con el huésped y el ambiente.

9. Conclusiones

En este estudio se aislaron bacterias iridiscentes a partir de cultivos acuícolas en Baja California, asociadas con eventos de mortandad en crustáceos y moluscos. Las cepas aisladas pertenecen a cinco géneros: *Vibrio*, *Mammaliicoccus*, *Aeromonas*, *Micrococcus* y *Microbacterium*, siendo *Vibrio* el género predominante. Entre las cepas identificadas, tres mostraron una estrecha relación filogenética con *Vibrio parahaemolyticus* (Bi-HpVm, Bi-BrC4 y Vp-EMS15), destacando esta última por ser positiva para el síndrome de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), según pruebas microbiológicas clásicas, perfiles bioquímicos, pruebas de resistencia a antimicrobianos y análisis moleculares.

Aunque no todas las cepas iridiscentes demostraron ser patógenas, aquellas con mayor virulencia también presentaron una iridiscencia notable, lo cual podría estar relacionado con un alto grado de organización celular. Este rasgo podría favorecer la asimilación eficiente de sustratos, una intensa comunicación celular a través de biopelículas y una regulación metabólica que facilita la expresión de factores de virulencia, contribuyendo así a la enfermedad y mortalidad en los hospedadores. La cepa Vp-EMS15, con iridiscencia metálica prominente, fue la más patógena del estudio. A una concentración de 3.9×10^5 UFC generó más del 50% de mortalidad en *Penaeus vannamei*, con una LC_{50} estimada de 36,308 UFC, en contraste con el control no iridiscente (CSA25-control), que mostró una supervivencia del 92.38% a la misma concentración. Aunque la iridiscencia es un fenómeno óptico y no se ha vinculado directamente con genes específicos, en todas las cepas iridiscentes patógenas se detectaron

genes clave como adhesinas, genes de ensamblaje pilus (*PilN*, *GspM*) y quitinasas (*chiA*, *COD*, *chbG*), los cuales podrían estar implicados en procesos de colonización, formación de biopelículas, motilidad bacteriana y organización celular. La activación de estos genes podría facilitar la colonización rápida de superficies y estar relacionada con la manifestación fenotípica de la iridiscencia.

Además, se identificaron en los genomas bacterianos de estas cepas iridiscentes genes asociados con resistencia antimicrobiana (*qnrD1*, *tet*, *blaCARB*, *blaTRU*, *ampC*, *catC*, *fos*, *vat*, *clm*) y con resistencia a metales pesados (*arsB*, *arsC*, *arsD*, *merA*), lo que sugiere que estas bacterias están adaptadas a ambientes contaminados y representan un riesgo potencial tanto para la salud acuícola como humana, constituyendo un desafío para el control de infecciones bacterianas en sistemas de cultivo intensivo.

Para la identificación de las cepas bacterianas se emplearon múltiples estrategias, incluyendo pruebas microbiológicas clásicas, perfiles bioquímicos de resistencia a antimicrobianos, análisis fenotípicos metabólicos y pruebas moleculares. Aunque los métodos microbiológicos y bioquímicos brindaron información preliminar, presentaron importantes limitaciones como contaminación, resultados parciales o perfiles genéricos. En contraste, las pruebas moleculares resultaron ser más eficaces y definitivas, permitiendo una identificación precisa y filogenéticamente respaldada, consolidándose como una herramienta clave en estudios bacteriológicos complejos.

Los resultados de este trabajo validan parcialmente la hipótesis de investigación, demostrando que las cepas iridiscentes especialmente del género *Vibrio* aisladas durante epizootias poseen un alto potencial patogénico y albergan genes relevantes de virulencia y resistencia. La iridiscencia se perfila como un rasgo fenotípico útil para el monitoreo rápido, visual y de bajo costo en sistemas acuícolas. No obstante, la relación mecanicista entre iridiscencia, organización

celular y patogenicidad aún requiere estudios adicionales que permitan esclarecer su rol funcional y ecológico.

10. Perspectivas a futuro

Los hallazgos obtenidos a partir del aislamiento y caracterización microbiológica y genómica de bacterias iridiscentes provenientes de ambientes acuáticos de Baja California abren diversas líneas de investigación que pueden ser desarrolladas en el futuro. Una de las principales radica en el estudio funcional de la iridiscencia como rasgo fenotípico distintivo, no solo como una característica morfológica, sino también como un posible marcador biológico asociado con mecanismos de adhesión, formación de biopelículas y evasión inmune en hospedadores acuáticos. Comprender el papel ecológico de esta propiedad podría aportar información clave sobre la competitividad y persistencia de estas bacterias en entornos naturales y cultivados.

Asimismo, la detección de genes relacionados con resistencia antimicrobiana y tolerancia a metales pesados como *ampC*, *mecA1*, *tet*, *blaCARB* y *merA* plantea la necesidad de evaluar su expresión funcional y el riesgo potencial que implican para la sanidad acuícola. Estudios transcriptómicos y proteómicos. Por otro lado, los perfiles genómicos obtenidos revelan una considerable plasticidad metabólica y la presencia de rutas biosintéticas de interés biotecnológico, incluyendo la producción de sideróforos, betalactonas, ectoínas y compuestos con posible actividad antimicrobiana.

11. Referencias

Aguirre, G., López, A., & Vázquez, S. (2013). Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas. México, *Revista Scientia Agropecuaria*. 4(1), pp.121-127.
www.sciagropecu.unitru.edu.pe

Arias Saenz, F. D. (2023). *Influencia de microorganismos benéficos (levaduras marinas) en la reducción de bacterias patógenas (Vibrio sp.) en el agua de piscinas camaroneras*. [Tesis de licenciatura, Universidad Técnica de Machala]. <https://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/22703>

Austin, B., & Austin, D. A. (2012). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* (5th ed.). Springer.

Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* (6th ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>

Ayala-García, J.C. (2021). Efecto inhibitorio de dos especies de diatomeas contra *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. campbellii*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Científica y de Educación Superior de Ensenada]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3596/1/Tesis%20JCAG%20200821.pdf>

Biolog. (4 de diciembre de 2023). *Gen III test panel*. <https://www.biolog.com/products/microbial-identification-microplates/gen-iii-test-panel/>

Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Moser, C., Kirketerp-Møller, K., Johansen, H. K., Høiby, N., Jensen, P. Ø., Sørensen, S. J., & Bjarnsholt, T. (2010). Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS immunology and medical microbiology*, **59**(3), 324–336. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x>

- Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AR, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wieczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12),3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Canal, B., Cruz, S., Valle, V., Agurto, T. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias del género VIBRIO en muestras de AULACOMYA ATRA “choro” procedentes del terminal pesquero de Villa María del Triunfo, Lima, Perú. *Rev. Biotempo*. 14(1), 1-5. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v14i1.833>
- Chen, H. H., Zhao, G. Z., Park, D. J., Zhang, Y. Q., Xu, L. H., Lee, J. C., Kim, C. J., & Li, W. J. (2009). *Micrococcus endophyticus* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Aquilaria sinensis* roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 5), 1070–1075. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006296-0>
- Choez Holguín, B. S., & Rosado Loor, G. D. R. (2021). *Determinación de Vibrio cholerae en camarón y pescado expendidos en el Mercado de la Florida de la ciudad de Guayaquil* (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas). <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58740>
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca [CONAPESCA]. (septiembre del 2023). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca*. [https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2023/ANUARIO ESTADISTICO DE ACUACULTURA Y PESCA 2023.pdf](https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2023/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUACULTURA_Y_PESCA_2023.pdf)

- Coronado, M., Bravo, A., Meléndez, B. S., Rodríguez-Román, E., Vázquez, B., De La Rosa, O., ... & Serrano, A. T. (2018). Aislamiento e identificación molecular de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* en leche de cabra (*Capra hircus*). *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, UCV, 59(1), 18-27. <http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revisfcv/issue/view/1831>
- Cottrell, M. T., Wood, D. N., Yu, L., & Kirchman, D. L. (2000). Selected chitinase genes in cultured and uncultured marine bacteria in the alpha- and gamma-subclasses of the proteobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1195–1201. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1195-1201.2000>
- Cugini, C., Morales, D. K., & Hogan, D. A. (2010). Candida albicans-produced farnesol stimulates Pseudomonas quinolone signal production in LasR-defective Pseudomonas aeruginosa strains. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 10), 3096–3107. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037911-0>
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 91–138. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00037-15>
- Doucet, S. M., & Meadows, M. G. (2009). Iridescence: a functional perspective. *Journal of the Royal Society, Interface*, 6 Suppl 2(Suppl 2), S115–S132. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0395.focus>
- Díaz Díaz, C. R. (2020). *Aislamiento e identificación de Vibrio sp. en truchas (Oncorhynchus mykiss y Salmo trutta) provenientes de dos piscigranjas de Huaral, Perú*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nerbert Wiener]. <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/20.500.13053/5376>

- Dickinson, L., & Codd, S. (1952). The bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*. II. Bacteriophage reproduction in an iridescent strain. *Journal of general microbiology*, 6(1-2), 1–13. <https://doi.org/10.1099/00221287-6-1-2-1>
- Eger, A., Aguirre, J. D., Altamirano, M., Arafeh-Dalmau, N., Arroyo, N. L., Bauer-Civiello, A. M., ... & Vergès, A. (2024). The Kelp Forest Challenge: A collaborative global movement to protect and restore 4 million hectares of kelp forests. *Journal of applied phycology*, 36(2), 951-964. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03103-y>
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Versión resumida. La sostenibilidad en acción. Roma. DOI: <https://doi.org/10.4060/ca9231es>
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- García-Márquez, J. (2018). *Selección de extractos vegetales como inhibidores de bacterias patógenas de peces y utilización en acuicultura*. [Tesis de Maestría, Universidad de Cádiz]. <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/20197/TFM%20Extractos%20vegetales%20inhibidores%20de%20bacterias%20patogenas%20acuicultura%20Jorge%20Garcia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García-Medel, D. I. (2022). Seguridad alimentaria: retos y desafíos de la acuicultura en México. *Journal of Behavior and Feeding*, 2(2), 10–19. <https://doi.org/10.32870/jbf.v2i2.31>

- Gerwick, W.H. & Lang, N.J. (1977). Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (RHODOPHYTA). *Journal of Phycology*, **13**(2). 121-127. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1977.tb02898.x>
- Giffard-Mena, I., González, B.R., Arredondo-García, M., Lafarga, C.F., Granados-Machuca, C., López, A.L. y David-True, C. (2014). La acuicultura en el valle de Mexicali: Especies y áreas de cultivo. Universidad Autónoma de Baja California.
https://www.researchgate.net/publication/271136630_La_acuicultura_en_el_Valle_de_Mexicali_Especies_y_areas_de_cultivo
- Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Emerson, J., Houston, L. S., Burns, J. L., Ramsey, B. W., & Miller, S. I. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, **8**(1), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.09.006>
- Hong To, T. T., Yanagawa, H., Khanh Thuan, N., Hiep, D. M., Cuong, D. V., Khai, L. T. L., Taniguchi, T., Kubo, R., & Hayashidani, H. (2020). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* Causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Shrimp in Shrimp, Molluscan Shellfish and Water Samples in the Mekong Delta, Vietnam. *Biology*, **9**(10), 312. <https://doi.org/10.3390/biology9100312>
- Holt, A., Vahidinia, S., Gagnon, Y., Morse, D. E. & Sweeney, A. (2014). Photosymbiotic giant clams are transformers of solar flux. *J. R. Soc. Interface*.112014067820140678. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0678>
- INAPESCA. (21 de marzo de 2018). *Acuicultura del Ostión Japonés*. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-ostion-japones>

- INAPESCA. (2018). *Acuacultura | Camarón blanco del Pacífico*. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico9>
- INAPESCA. (2021). *Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la carta nacional acuícola*. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5615929&fecha=15/04/2021
- Johansen, V.E., Catón, L., Hamidjaja, R., Oosterink, E., Wilts, B.D., Rasmussen, T.S., Sherlock, M.M., Ingham, C.J., & Vignolini, S. (2018). Genetic manipulation of structural color in bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 2652 - 2657. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716214115>
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310–347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-08>
- Kientz, B. (2016). Una autoorganización única de subcomunidades bacterianas crea iridiscencia en biopelículas de colonias de *Cellulophaga lytica*. *Ciencia representante* 6, <https://doi.org/10.1038/srep19906>
- Kientz, B., Ducret, A., Luke, S., Vukusic, P., Mignot, T. & Rosenfeld, E. (2012). Glitter-Like Iridescence within the Bacteroidetes Especially *Cellulophaga spp.*: Optical Properties and Correlation with Gliding Motility. *PLoS ONE* 7(12): e52900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052900>
- Kientz, B., Vukusic, P., Luke, S., & Rosenfeld, E. (2012). Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. *Applied and*

environmental microbiology, **78**(7), 2092–2099.
<https://doi.org/10.1128/AEM.07339-11>

Kinoshita S, Yoshioka S & Miyazaki J. (2008) Physics of structural colors. *Rep. Prog. Phys.* 71, 1–30. [https://DOI 10.1088/0034-4885/71/7/076401](https://DOI.10.1088/0034-4885/71/7/076401)

Kline, K. A., Falker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host–microbe interactions. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>

Larios-Soriano., E. (2018). Estudio sobre la fisiología térmica, metabolismo respiratorio y nutrición de *Seriola lalandi*. [Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2448/1/tesis_Larios_Soriano_Ernesto_11_sep_2018.1.pdf

Lassudrie, M., Hégaret, H., & Wikfors, G. H. (2020). Effects of marine harmful algal blooms on bivalve cellular immunity and infectious diseases: A review. *Developmental & Comparative Immunology*, 108, 103660. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103660>

Levy-Lior A., Shimoni E., Schwartz O., Gavish-Regev E., Oron, D., Oxford, G. (2010). Guanine-based biogenic photonic-crystal arrays in fish and spiders. *Adv Funct Mater.* **20**(2):320–9. <https://doi.org/10.1002/adfm.200901437>

Li, L., Kolle, S., Weaver, J., Ortiz, C., Aizenber, J. & Kolle, M. (2015). A highly conspicuous mineralized composite photonic architecture in the translucent shell of the blue-rayed limpet. *Nat Commun* **6**, 6322. <https://doi.org/10.1038/ncomms7322>

- Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(1), 110–130. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.010>
- Liu, Y., Zhou, Z., Miao, W., Zhang, Y., Cao, Y., He, S., et al. (2011). A chitinase from *Aeromonas veronii* CD3 with the potential to control myxozoan disease. *PLoS ONE*, 6(12), e29091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029091>
- Lucas, G. V. S., Jaime, K. E. C., & Parrales, E. N. L. (2021). Staphylococcus aureus: factores asociados a su hipervirulencia y adhesión y formación de biopelículas. *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 6(9), 1826-1860. <https://dialnet.unirioja.es/ejemplar/586820>
- Luo, Y., He, F., Luo, F., Zhang, D., & Shi, Y. (2021). Outer membrane proteins and adhesion of *Vibrio alginolyticus* to fish epithelial cells. *Aquaculture Reports*, 20, 100725. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100725>
- Martínez, G. (18 de junio del 2018). Baja California se posiciona en acuacultura. *El Economista*. <https://www.economista.com.mx/estados/Baja-California-se-posiciona-en-acuacultura-20180617-0094.html>
- Mata-Torres, F.G. (2022). *Identificación y caracterización de tres cepas de Vibrio spp. potencialmente patógenas aisladas en sistemas de cultivo cerrados de Penaeus vannamei*. [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California]. <https://doi.org/10.57840/uabc-475>
- McBride M. J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual review of microbiology*, 55, 49–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.49>

- Meadows, M. G., Butler, M. W., Morehouse, N. I., Taylor, L. A., Toomey, M. B., McGraw, K. J., & Rutowski, R. L. (2009). Iridescence: views from many angles. *Journal of the Royal Society, Interface*, 6 Suppl 2(Suppl 2), S107–S113. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0013.focus>
- Montes Pérez, D. A. (2022). *Especies del género Aeromonas como patógenos oportunistas en mamíferos, peces y humanos* (Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/7d654ee7-0417-4008-ac54-570d049d4a6c>
- Nigro, O.D., & Steward, G.F. (2015). Differential specificity of selective culture media for enumeration of pathogenic vibrios: advantages and limitations of multi-plating methods. *Journal of microbiological methods*, 111, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.014>
- Noyes, J., Sumper, M. & Vukusic, P. (2008). Light manipulation in a marine diatom. *Journal of Materials Research* 23, 3229–3235. <https://doi.org/10.1557/JMR.2008.0381>
- Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE]. (2019). *Informe de actividad 2019, Su sanidad, nuestro futuro*. <https://www.report2019oie.fr/es/>
- Pantoja Guerra, M. F., Mendoza Reyes, S., & Valero Valero, N. O. (2018). Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium* sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 31-41. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>

- Parker A. R. (1998). The diversity and implications of animal structural colours. *The Journal of experimental biology*, 201(Pt 16), 2343–2347. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.16.2343>
- Park, M. J., Kim, M. K., Kim, H. B., Im, W. T., Yi, T. H., Kim, S. Y., Soung, N. K., & Yang, D. C. (2008). *Microbacterium ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(Pt 2), 429–433. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65226-0>
- Parrish, C., Kort, T., Maginnis & Cummings, M. (2013). Polaro-cryptic mirror of the lookdown as a biological model for open ocean camouflage. *PNAS*, 110(24), 9764-9769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222125110>
- Preisz, H. (1904). Studien über Morphologie und Biologie des Milzbrandbacillus (mit besonderer Berücksichtigung der Sporenbildung auch bei anderen Bacillen). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Orig*, 35, 280-293.
- Pijper, A. (1947). Diffraction in biological structures. *South African Medical Journal*, 21(11), 243-248
- Pittman M. (1931). variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *The Journal of experimental medicine*, 53(4), 471–492. <https://doi.org/10.1084/jem.53.4.4714>
- Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., Chaparro, C., Torres, M., de Lorgeril, J., Haffner, P., Vidal-Dupiol, J., Lagorce, A., Petton, B., Mitta, G., Jacq, A., Le Roux, F., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2019). Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America, 116(28), 14238–14247.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>

Sullivan, C. J., Brown, K., Hung, C. S., Tang, J. K., DeSimone, M., Chen, V., Lloyd, P. F., Gupta, M., Juhl, A., Crookes-Goodson, W., Vasudev, M., Dennis, P. B., & Kelley-Loughnane, N. (2023). Iridescent biofilms of *Cellulophaga lytica* are tunable platforms for scalable, ordered materials. *Scientific reports*, 13(1), 13192. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38797-0>

Tadepalli, S., Slocik, J. M., Gupta, M. K., Naik, R. R., & Singamaneni, S. (2017). Bio-Optics and Bio-Inspired Optical Materials. *Chemical reviews*, 117(20), 12705–12763. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00153>

Thomas, J., Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Acharya, K., Shinge, D., Seelan, T. S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 116, 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.019>

Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious agent causing Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>

Universidad del País Vasco. (s.f.). *Tema 1: Estructura de las bacterias patógenas*. OpenCourseWare. Recuperado de <https://ocw.ehu.eus/file.php/134/tecnicasmol/tema1pdf.pdf>

Universidad Nacional Autónoma de México. (2023). *Estructura microbiana*. Facultad de Química. Recuperado de

https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/1442/mod_folder/content/0/T02-Estructura_microbiana-252A.pdf

Varela, A., y Choc-Martínez, L. (2020). Artículo de revisión: Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 31(3): e18165. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18165>

Vásquez-Álvarez, J.U. (2021). *Sistemas acuícolas: Compuestos bioactivos de macroalgas para el control de bacterias patógenas. Un análisis bibliográfico.* [Tesis de licenciatura, Universidad Estatal Península de Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/6615/1/UPSE-TBM-2021-0015.pdf>

Vukusic, P., & Sambles, J. R. (2003). Photonic structures in biology. *Nature*, 424(6950), 852–855. <https://doi.org/10.1038/nature01941>

Vukusic, P., Sambles, J., Lawrence, C. & Wootton, R. (2001). Now you see it — now you don't. *Nature* 410, 36. <https://doi.org/10.1038/35065161>

Vukusic, P. (2009). Evolutionary Photonics with a twist. *Science*, **325**(5939), 398-399. DOI:[10.1126/science.1177729](https://doi.org/10.1126/science.1177729)

Whitney, H. M., Kolle, M., Andrew, P., Chittka, L., Steiner, U., & Glover, B. J. (2009). Floral iridescence, produced by diffractive optics, acts as a cue for animal pollinators. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1166256>

- Wiedenmann, J., Oswald, F. & Nienhaus, G. U. (2009). Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations and challenges. *IUBMB Life* 61, 1029–1042. <https://doi.org/10.1002/iub.256>
- William, Trevor. (2008). Iridoviruses of Invertebrates. Encyclopedia of Virology. Mahy B W J y Van Regenmortel M H V. Elsevier, Oxford, Uk. Third Edition. 161-167. DOI: [10.1016/B978-012374410-4.00513-6](https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00513-6)
- Williams, R.C. & Smith, K.M. (1958). The polyhedral form of the tipula iridescent virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 28. 464-469. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90507-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(58)90507-9)
- Wilts, B. D., Apeleo Zubiri, B., Klatt, M. A., Butz, B., Fischer, M. G., Kelly, S. T., Spiecker, E., Steiner, U., & Schröder-Turk, G. E. (2017). Butterfly gyroid nanostructures as a time-frozen glimpse of intracellular membrane development. *Science advances*, 3(4), e1603119. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603119>
- Yagui-Moscoso, Martín. (2024). El enfoque Una Salud y la resistencia a los antimicrobianos: Implementación en el Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*, 85(1), 85-91. Epub 31 de marzo de 2024. <https://doi.org/10.15381/anales.v85i1.25866>
- Yanong, R. P. E., Francis-Floyd, R., & Petty, B. D. (2021). *Bacterial Diseases in Aquaculture*. Merck Veterinary Manual. Recuperado de <https://www.merckvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/aquaculture/bacterial-diseases-in-aquaculture>
- Yang, F., Xu, L., Wanzhen, H. y Li, F. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737605>

- Yamamoto, K., & Asano, Y. (2015). Efficient production of lumichrome by *Microbacterium* sp. strain TPU 3598. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), 7360–7367. <https://doi.org/10.1128/AEM.02166-15>
- Zhang, Y., Wang, Y., Liu, Y., Li, H., & Zhang, X. (2020). Chitinases are important virulence factors in *Vibrio* for degrading the chitinous exoskeleton of crustaceans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1382–1390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.236>
- Zierdt C. H. (1971). Autolytic nature of iridescent lysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37(3), 319–337. <https://doi.org/10.1007/BF02218503>