



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE
Exiguobacterium sp. nov., EN JUVENILES DE TILAPIA DEL
NILO *Oreochromis niloticus*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Jesús Eduardo Contreras Romero

La Paz, Baja California Sur, junio de 2025.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:40 horas del día 20 del Mes de mayo del 2025, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

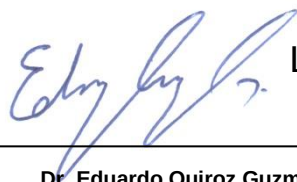
"CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Exiguobacterium* sp. nov., EN JUVENILES DE TILAPIA DEL NILO *Oreochromis niloticus*."

Presentada por el alumno:

Jesús Eduardo Contreras Romero

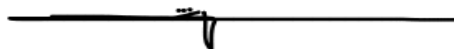
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis

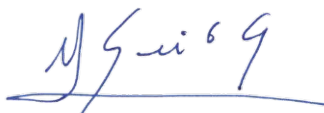
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. José Arturo Sánchez Paz
Revisor de Tesis



Dr. José Luis Balcázar Rojas
Revisor de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.



La Paz, Baja California Sur, a 21 de mayo de 2025.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante **Jesús Eduardo Contreras Romero** del Programa de la Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Bibliografía
Citas textuales
Coincidencias pequeñas
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis
Posgrado
Se muestra captura de
pantalla



Co/Director

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Estudiante

Jesús Eduardo Contreras Romero

Personal técnico de asesoría en el análisis

M. en C. Ana María Talamantes Cota

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Subsede Mazatlán
Co-Directora de Tesis

Dra. Susana del Carmen de la Rosa García
Universidad Autónoma Juárez de Tabasco
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dr. José Arturo Sánchez Paz
Dr. José Luis Balcázar Rojas

Jurado de Examen

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dr. José Arturo Sánchez Paz
Dr. José Luis Balcázar Rojas

Suplente

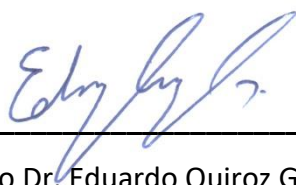
Dra. Paola Magallón Servín

Resumen

El sector acuícola enfrenta actualmente una de sus mayores problemáticas, principalmente adversidades sanitarias derivadas del surgimiento de patógenos que amenazan la productividad, calidad y supervivencia de los cultivos. En este contexto, el uso de bacterias probióticas ha cobrado gran relevancia para mejorar dichos aspectos, por lo que el presente trabajo investigó la caracterización de la cepa *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT-01, aislada originalmente de cultivos de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), con el objetivo de evaluar su aplicación y efecto en un cultivo de juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Los análisis fenotípicos, realizados mediante técnicas convencionales, revelaron que la cepa presenta movilidad activa en medios líquidos y semisólidos, destacando la ausencia total de actividad hemolítica, un indicador fundamental de seguridad. Los estudios de crecimiento mostraron que su desarrollo depende de las condiciones ambientales, con un rango óptimo de temperatura y salinidad entre 30–35 °C y 1% de NaCl, alcanzando su máximo entre las 2–8 horas post infección, con una densidad de 8.8 Log UFC/mL. El análisis filogenético, basado en la Identidad Nucleotídica Promedio (ANI), mostró un 96.7% de similitud con *Exiguobacterium profundum*, superando el umbral del 95% para la delimitación de especies. En los bioensayos con tilapia, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, con tasas de supervivencia entre 93.3% y 100%. Los resultados respaldan el potencial probiótico de *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT-01 en sistemas de cultivo de tilapia, dada su seguridad, adaptabilidad y compatibilidad. No obstante, se recomiendan estudios complementarios para evaluar sus efectos a largo plazo y su impacto en la acuicultura comercial.

Palabras clave: Caracterización, *Exiguobacterium*, Tilapia nilótica, Probiótico y Salud acuícola.

ORCID: 0000-0003-3698-1296



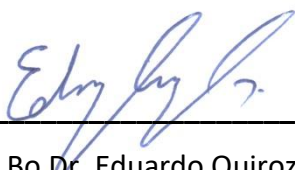
Vo.Bo Dr. Eduardo Quiroz Guzmán.
Co-Director de Tesis.

Summary

The aquaculture sector is currently facing one of its greatest challenges, primarily health-related adversities stemming from the emergence of pathogens that threaten the productivity, quality, and survival of cultured species. In this context, the use of probiotic bacteria has gained significant relevance to improve these aspects. Therefore, this study investigated the characterization of the bacterial strain *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT-01, originally isolated from tropical gar (*Atractosteus tropicus*) cultures, with the objective of evaluating its application and effect on a juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. Phenotypic analyses, performed using conventional techniques, revealed that the strain exhibits active motility in both liquid and semisolid media, with a notable absence of hemolytic activity a key safety indicator. Growth studies showed that its development is dependent on environmental conditions, with optimal temperature and salinity ranges between 30–35 °C and 1% NaCl, reaching peak growth between 2–8 hours post-infection, with a maximum density of 8.8 Log CFU/mL. Phylogenetic analysis based on Average Nucleotide Identity (ANI) showed 96.7% similarity with *Exiguobacterium profundum*, exceeding the 95% threshold established for bacterial species delimitation. The bioassays with Nile tilapia showed no significant differences among the experimental groups, with survival rates ranging from 93.3% to 100%. The results support the probiotic potential of *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT-01 in tilapia farming systems, given its safety, adaptability, and compatibility. However, complementary studies are recommended to assess its long-term effects and its impact on commercial aquaculture systems.

Keywords: Characterization, *Exiguobacterium*, Nile tilapia, Probiotic, and Aquatic health.

ORCID: 0000-0003-3698-1296



Vo.Bo Dr. Eduardo Quiroz Guzmán.
Co-Director de Tesis.

Dedicatoria

A mi prometida Laura Elena Cota Ortega, quien estuvo a mi lado desde el primer día, quien siempre brindo su mano y apoyo para continuar aun cuando el mundo parecía venirse abajo. Tus palabras y amor fueron siempre una razón más para continuar mi vida, porque sin ti, definitivamente esto no hubiera sido posible, agradezco progresar y crecer a tu lado. Gracias por todos tus consejos, dedicación y sobre todo gracias por ser mi compañera de vida y de aventuras. Te amo.

A mi familia, mi mamá Leonor Romero y mi hermana Melissa Guadalupe Contreras Romero, quienes vivieron junto a mi esta experiencia, siempre me escucharon y brindaron su mejor consejo. Gracias mamá por todos sus sacrificios y su amor, porque sin usted y su hermosa manera de educarme, no estaría hoy en donde me encuentro. A mi papá, Agustín Eduardo Contreras Avilés, quien siempre me preguntó cómo iba en mi trabajo y brindo sus mejores consejos. Los amo.

A mi perrita Moly, quien hoy me ve desde el cielo de los perritos, pero compartió toda su vida a mi lado, brindándome siempre besos y cariños incondicionales, porque siempre estaba para mi cuando la necesitaba, quien siempre me escucho y quien fue mi mejor amiga. Gracias por enseñarme a ser más fuerte y saber soltar cuando más lo necesitaba, te amo y te extraño mi gordita hermosa.

A todos mis seres queridos, quienes siempre preguntaron por mi trabajo, por saber que era lo que hacía en el CIBNOR y sobre todo que se alegran de que hoy este terminando esta etapa.

A todos mis amigos, que formaron parte del proceso, con quienes nunca faltaron días de risas y carcajadas en los cubículos y quienes hicieron de la maestría un momento lindo.

Esto es de todos nosotros, un logro que fue gracias a ustedes. Quiero que lo disfrutemos y gocemos, porque nos costó mucho. Los amo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y hacer uso de sus instalaciones y recursos, además de todo el apoyo y consideraciones que tuvieron hacia mi persona, pues nunca me dejaron solo y abrieron las puertas de sus oficinas cada que lo requería.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada (No.829137).

A mi Co-Director, el Dr. Eduardo Quiroz Guzmán y a mis revisores, el Dr. José Arturo Sánchez Paz y Dr. José Luis Balcázar Rojas, quienes brindaron su apoyo y experiencia para lograr que este trabajo de investigación culminara de manera exitosa.

Al Laboratorio de Biotecnología de Bacteriófagos y Microalgas el CIBNOR por proporcionarme los insumos y herramientas necesarias para esta investigación.

A mis amigos y maestros de Laboratorio, Dra. Iraís Ramírez Sánchez y Dr. Bernardo Veyrand Quiros, por todo su apoyo y orientación en mi fase experimental, así como para la obtención de resultados.

A la M.C. Karla Guadalupe Aguilar Rendón, M.C. María del Carmen Bolán Mejía y MVZ Rodolfo Lozano Olvera, por su valioso apoyo, orientación y disposición para ayudarme siempre de la mejor manera.

A mi prometida Laura Elena Cota Ortega, por todo su apoyo en esta travesía llena de bajadas y subidas, por siempre estar a mi lado y brindarme siempre tu apoyo en todo momento, por desvelarte conmigo. Por todo tu amor, cariño y comprensión en todo esto. Sin ti, no hubiese sido posible.

A mi familia, mi mamá Leonor Romero y mi hermana Melissa Guadalupe Contreras Romero, quienes fueron parte de este proceso, vivieron y apoyaron en esta nueva etapa. Sin ustedes, no sería posible.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Aislamiento de bacterias con potencial probiótico	3
2.2 Descripción de <i>Exiguobacterium</i>	4
2.3 Descripción genómica de <i>Exiguobacterium</i>	6
2.4 Importancia de <i>Exiguobacterium</i> en acuicultura	7
2.5 <i>Oreochromis niloticus</i>	8
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	12
5.1 Objetivo general	12
5.2 Objetivos particulares	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1 Caracterización fenotípica de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov. (UJAT-01)	13
6.2 Movilidad, Indol y Ornitina (MIO)	13
6.3 Citrato de Simmons	14
6.4 Rojo de metilo	14
6.5 Curva de crecimiento	14
6.6 Temperatura	15
6.7 Salinidad	16
6.8 Hemólisis	16
6.9 Sensibilidad antimicrobiana	17
6.10 Pruebas de motilidad: Swimming, Swarming y Twitching	17
6.11 Aislamiento de ADN genómico y secuenciación	18
6.12 Ensamble y análisis genómico	18
6.13 Desafío de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01 en tilapia	19
6.13.1 Aclimatación	19
6.13.2 Preparación de inóculo	20
6.13.3 Desafío	21
6.13.3.1 Inoculación Intraperitoneal	22
6.13.3.2 Inmersión	23
6.13.3.3 UFCs en fondo de columna de agua y fondo de acuarios	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Pruebas bioquímicas y hemólisis	24
7.1.1 Hemólisis	24
7.2 Concentración mínima inhibitoria	25
7.3 Motilidad Swimming, Swarming y Twitching	26
7.4 Cinética de crecimiento bacteriano	27
7.5 Temperatura óptima de crecimiento	28
7.6 Salinidad óptima de crecimiento	29

7.7 Infección intraperitoneal de <i>O. niloticus</i> con <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01	31
7.8 Densidad de bacterias durante el bioensayo por inmersión	32
7.9 Identificación genómica y relación filogenética de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov. (UJAT-01)	36
7.10 Mapa genómico de <i>Exiguobacterium</i>	37
7.11 Análisis de similitud entre especies.....	38
7.12 Análisis genómico de clústeres de genes potencialmente asociados con la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en <i>Exiguobacterium</i> sp. nov....	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	51
10. LITERATURA CITADA.....	52
11. ANEXOS	59
ANEXO A. Concentraciones finales de antibióticos puestos en placa de 96 pocillos para <i>Exiguobacterium</i> sp., en prueba de sensibilidad antimicrobiana.	59
ANEXO B. Concentración mínima inhibitoria (MIC) en µg/ml de Enrofloxacin; Furazolidona; Florfenicol; Oxitetraciclina en <i>Exiguobacterium</i> sp. nov.....	59
ANEXO C. Cinética de crecimiento de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., en medio de cultivo TSB a 30°C.....	60

Lista de figuras

Figura 1. Prueba de Hemolisis a <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01.....	25
Figura 2. Curva de crecimiento de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01 evaluada durante 26 h a 30 °C en medio de cultivo TSB. Las barras indican la desviación estándar. N=3	27
Figura 3. Crecimiento de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01 evaluada a distintas temperaturas de prueba en medio de cultivo TSB durante 24 horas. Las barras indican la desviación estándar y los asteriscos (*) las diferencias significativas entre tiempos. N=3.	29
Figura 4. Crecimiento de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01 a diferentes porcentajes de NaCl, N=3 y los asteriscos (*) las diferencias significativas entre tiempos.	30
Figura 5. Porcentaje de supervivencia de <i>O. niloticus</i> durante la infección por inoculación intraperitoneal con una P=0.47. N=3	32
Figura 6. Promedio de la densidad de bacterias heterótrofas totales (UFC/mL) del control negativo registradas en muestras de la columna de agua durante el bioensayo de inmersión, las barras indican la desviación estándar. N=3	33
Figura 7. Promedio de la densidad de bacterias heterótrofas totales y colonias con fenotipo anaranjado (UFC/mL) en TSA, registradas en muestras de la columna de agua durante el bioensayo de inmersión, las barras indican la desviación estándar en cada uno de los conteos realizados, con una P=0.011 y N=3	33
Figura 8. Densidad de colonias heterótrofas totales registradas en muestras de agua en el fondo del estanque de control positivo durante el bioensayo de inmersión. Con una P=0.006 y N=3.....	34
Figura 9. Densidad de colonias color naranja registradas en muestras de agua tanto de la columna de agua como del fondo del estanque durante el bioensayo de inmersión (control positivo). N=3	34
Figura 10. Mapa genómico de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01. De adentro hacia afuera se representa la posición genómica, el GC Skew, el contenido de GC, las secuencias codificantes en cada hebra de ADN y finalmente la posición de los genes de resistencia.....	38
Figura. 11. Mapa de calor de acuerdo del porcentaje de ANI del genoma correspondiente a <i>Exiguobacterium</i> sp. nov. en comparación con distintas especies del género <i>Exiguobacterium</i> . Las especies más similares presentarán tonalidades rojizas más intensas, a diferencia de la gama de azules, que refleja una menor similitud entre sí.	41
Figura 12. Posición genómica de los genes de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov. Del cluster de síntesis de terpenos. del cluster determinado en <i>Exiguobacterium</i> sp. (parte superior) directamente con cluster de bacterias registradas en NCBI, mostrando una mayor similitud con <i>Halobacillus halophilus</i>	42
Figura 13. Comparación entre el <i>cluster</i> de genes asociados a los terpenos en <i>Exiguobacterium</i> sp. nov. (primera línea) con el presente en otras especies de bacterias del género <i>Exiguobacterium</i>	42

Lista de tablas

Tabla 1. Tratamientos utilizados en desafío por inoculación intraperitoneal.....	21
Tabla 2. Resultados de pruebas bioquímicas de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01.....	24
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en µg/mL de enrofloxacin; furazolidona; florfenicol; oxitetraciclina en <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01	25
Tabla 4. Resultados de movilidad mediante Swimming, Swarming y Twitching de <i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01.....	26
Tabla 5. Diferencias significativas entre grupos correspondiente a las temperaturas analizadas	29
Tabla 6. Diferencias significativas entre grupos correspondiente a las salinidades analizadas.	31
Tabla 7. Tasas de supervivencia de <i>Oreochromis niloticus</i> : Grupos homogéneos según la prueba de Tukey.....	32
Tabla 8. Aislados bacterianos obtenidos tras la fase experimental de inoculación intraperitoneal e inmersión.	35
Tabla 9. Identificación de especies.	37
Tabla 10. Análisis de calidad del ensamblaje genómico utilizando SPAdes, SKESA y A5-miseq.	37
Tabla 11. Especies del género <i>Exiguobacterium</i> utilizadas para el análisis comparativo reportadas en NCBI.	39

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, como sector en constante crecimiento, enfrenta desafíos significativos relacionados con la aparición de diversos patógenos en los cultivos (López-Marín y Solís-Muñoz, 2024). Entre las herramientas más importantes desarrollada en los últimos años para contrarrestar los efectos negativos de estos agentes, se encuentra el uso de bacterias benéficas. Estas bacterias desempeñan un papel crucial en diversos aspectos de la acuicultura, contribuyendo al éxito de las operaciones acuícolas mediante el aumento de la productividad y la mejora en la calidad de los organismos (Das, 2019).

Un ejemplo de la aplicación de las bacterias en el cultivo de especies acuícolas es su participación en la degradación de desechos orgánicos, lo cual ayuda a mantener la calidad del agua y prevenir la acumulación de compuestos tóxicos (Austin, 2020). Además, algunas bacterias pueden establecer simbiosis benéficas con los organismos acuáticos, promoviendo su salud y crecimiento (Gatesoupe, 2007).

Los probióticos son suplementos alimenticios diseñados para ser ingeridos vía oral y que están compuestos por diferentes cepas de bacterias no patógenas vivas. Los probióticos son de interés en acuicultura ya que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero (Verschuere *et al.*, 2000; FAO/OMS, 2001). Estas bacterias, como por ejemplo los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*, poseen la capacidad de mejorar la digestión, aumentar la resistencia a enfermedades e incrementar la calidad del agua en entornos acuícolas (Zorriehzahra *et al.*, 2016). Sin embargo, para que estas bacterias puedan ser consideradas probióticas, deben cumplir ciertos estándares establecidos. Así, en humanos se considera principalmente la ausencia de factores de virulencia, poseer la capacidad para sobrevivir al tránsito gástrico (tolerancia a los ácidos gástricos y bilis), y de adherirse y colonizar el epitelio intestinal, además de estabilizar la microbiota saludable e inhibir el crecimiento y colonización de patógenos (Kapsea *et al.*, 2018). En organismos acuáticos, como peces, los estándares para considerar una bacteria como probiótica incluyen características específicas adaptadas a su entorno, estas bacterias deben ser capaces de adherirse al epitelio intestinal para impedir o limitar la colonización de patógenos, además de contribuir al fortalecimiento del sistema inmunitario del hospedero y mejorar la absorción de nutrientes, asimismo, es fundamental que sean viables en condiciones de almacenamiento y compatibles

con procesos tecnológicos como la liofilización. El proceso de selección de las bacterias que se utilizarán como probióticos contempla evaluar su seguridad, capacidad para competir con patógenos, efectos positivos en el organismo hospedero y la relación costo-beneficio de su uso. Dependiendo del sistema, los probióticos pueden administrarse a través de alimento vivo, baños, incorporación al agua de cultivo o en dietas artificiales, asegurando así su eficacia y adaptación al entorno acuático (Balcázar, 2006; Butt *et al.*, 2021). Los probióticos pueden competir con patógenos por recursos y espacio, contribuyendo así a un microbioma equilibrado y una microbiota intestinal saludable en los organismos acuáticos. Esto crea un entorno microbiano único en cada una de las etapas de desarrollo que presenten los organismos (Gómez y Balcázar, 2008; El-Saadony *et al.*, 2021).

Un candidato que ha despertado interés en acuicultura son las bacterias que pertenecen al género *Exiguobacterium*, bacterias extremófilas que ha demostrado tener una amplia adaptabilidad a condiciones ambientales adversas, como alta salinidad y variaciones de temperatura (Vishnivetskaya *et al.*, 2000). Estudios recientes han revelado los efectos positivos de *Exiguobacterium* sp., debido a que la administración de esta bacteria puede modular la microbiota intestinal de los organismos acuáticos (Artemias, camarones e incluso peces), promoviendo la diversidad microbiana y la estabilidad del ecosistema intestinal, aumentando la resistencia a enfermedades y mejorando el crecimiento (Etyemez *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2023). Además, se ha explorado la funcionalidad de *Exiguobacterium* en la degradación de desechos orgánicos y la mejora de la calidad del agua en sistemas acuícolas (Kim *et al.*, 2022).

De igual forma *Exiguobacterium* ha mostrado efectos benéficos en la respuesta inmune de *Penaeus vannamei*, aumentando su resistencia ante patógenos y enfermedades (Kasana y Pandey, 2018). Adicionalmente, debido a su resistencia y adaptabilidad, *Exiguobacterium* ha atraído la atención en el ámbito biotecnológico, ya que estudios recientes han demostrado su capacidad para producir enzimas y metabolitos de interés industrial, como enzimas termoestables, biosurfactantes y compuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante (Sun *et al.*, 2023). Esta capacidad de síntesis de productos de interés biotecnológico tiene aplicaciones potenciales en la industria alimentaria, farmacéutica y de biorremediación. Por ello, en el presente trabajo se propone evaluar el efecto de *Exiguobacterium* sp. nov., como un potencial probiótico en el cultivo de *Oreochromis niloticus*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aislamiento de bacterias con potencial probiótico

El término probiótico proviene del griego *pro* y *bios* que significa “a favor de la vida”, este término ha cambiado con el paso del tiempo, adentrándose a diversas áreas de aplicación, actualmente se toma mucho en cuenta en la acuicultura, en donde se define como microorganismos vivos administrados mediante el alimento o el agua, capaces de mejorar el equilibrio microbiano y beneficiar la salud de los organismos acuáticos (Gatesoupe, 1999; Verschueren *et al.*, 2000; Amoah *et al.*, 2019; Azad *et al.*, 2019). De manera general y de acuerdo con FAO (2006), un probiótico es un microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confiere un beneficio a la salud del huésped. En la acuicultura, se propone el uso de probióticos como alternativa para el control y prevención de enfermedades (Wang *et al.*, 2018), demostrando su eficacia en la reducción de patógenos, la estabilización de la microbiota y la inmunidad que pudiera conferir de los propios organismos (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Sotomayor y Balcázar, 2003). Entre los mecanismos de acción más reconocidos se encuentra la estimulación del sistema inmune, la producción de compuestos antagonistas que confieren un efecto probiótico y la exclusión competitiva de nutrientes, o espacio (Balcázar *et al.*, 2006; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). En la actualidad, de la mano con el creciente interés de la microbiota y la salud de los organismos de cultivos acuícolas, los probióticos son uno de los objetos de estudio de mayor peso e impacto, además, su alcance y aplicaciones se amplía, subrayando la importancia de seleccionar cuidadosamente los microorganismos utilizados, asegurando no presentar riesgos para el sistema productivo (Idrees *et al.*, 2022). Aunado a lo anterior, la acuicultura ha presentado grandes retos en sus cultivos, principalmente enfermedades, una baja productividad y un deterioro ambiental, lo cual ha generado una gran alarma en la búsqueda de alternativas sustentables a estas problemáticas como el uso de probióticos. Su primera aplicación ocurrió en 1986, enfocado a mejorar el crecimiento de hidrobiontes, después, se emplearon con la finalidad de mantener un control de infecciones bacterianas y mejorar la calidad del agua en cultivos. Actualmente, existe evidencia sobre su capacidad para optimizar la digestibilidad de nutrientes, aumento en tolerancia al estrés, mejorar y estimular la reproducción, así como reforzar la salud general de organismos acuáticos. Diversos productos comerciales basados en bacterias como *Bacillus*, *Lactobacillus*,

Enterococcus, *Carnobacterium* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan bajo lineamientos de manejo responsable (Martínez-Cruz *et al.*, 2012).

Ntiantiasi y Lianou (2023) realizaron un aislamiento de bacterias probióticas a partir de diversas fuentes, incluyendo alimentos fermentados y organismos acuáticos como el camarón de río *Macrobrachium tenellum*. Este estudio puso de manifiesto el potencial de estas bacterias para su uso en acuicultura, destacando su papel en la promoción de la salud de especies cultivadas y en la prevención de enfermedades.

En 2024, Golnari *et al.*, llevaron a cabo un trabajo enfocado en la identificación y caracterización de bacterias probióticas mediante secuenciación del gen 16S rDNA y análisis bioquímicos. Su estudio destacó la capacidad de estas cepas para resistir condiciones adversas del tracto gastrointestinal, como la exposición a ácidos gástricos y sales biliares, además de formar biopelículas protectoras. Estos hallazgos subrayan la importancia de las bacterias probióticas en la mejora de la salud intestinal y la respuesta inmunitaria del hospedero.

Lathief y Alphonsa (2024), identificaron que las bacterias probióticas producen compuestos bioactivos, como vitaminas y sustancias antimicrobianas, que no solo fortalecen la salud intestinal, sino que también contribuyen al desarrollo de alimentos funcionales al mejorar la digestión y la absorción de nutrientes. Además, enfatizaron el papel crucial de estas bacterias en la sustitución de antibióticos en sistemas acuícolas, promoviendo prácticas más sostenibles y seguras.

2.2 Descripción de *Exiguobacterium*

Vishnivetskaya *et al.*, (2000) documentaron la capacidad de *Exiguobacterium* para subsistir en ambientes extremos, como alta salinidad, temperaturas extremas y pH ácido o alcalino, lo que abrió nuevas líneas de investigación sobre sus adaptaciones a entornos hostiles. Estos hallazgos fueron fundamentales para entender las estrategias de supervivencia de *Exiguobacterium* en condiciones extremas, lo que generó un interés considerable en su potencial uso biotecnológico. Posteriormente, Vishnivetskaya *et al.*, (2009) llevaron a cabo la identificación y caracterización de diversas especies del género *Exiguobacterium*, proporcionando una visión más profunda de sus capacidades metabólicas y de adaptación.

Este trabajo marcó un hito en la comprensión de cómo estas bacterias pueden prosperar en ambientes difíciles y sentó las bases para explorar sus aplicaciones prácticas en campos como la biotecnología y la acuicultura.

En cuanto a la adaptación de *Exiguobacterium* a condiciones extremas, varios estudios han destacado sus capacidades únicas, por ejemplo, Galván *et al.*, (2025) demostraron que la cepa *Exiguobacterium* sp., S17 posee un robusto resistoma UV, con 113 genes relacionados con la resistencia a la radiación UV, lo que le permite sobrevivir en ambientes con alta radiación UV. Liu *et al.*, (2021) informaron que especies como *E. qingdaonense* pueden prosperar en condiciones salinas extremas, creciendo en ambientes con hasta un 14% de NaCl, lo que refleja su capacidad halotolerante. Mishra *et al.*, (2024) también encontraron que *Exiguobacterium* sp., tiene un gran potencial en la degradación de microfibras de poliéster, alcanzando una pérdida de peso de la fibra tratada con la cepa bacteriana seleccionada de 19.2% en condiciones optimizadas, lo que resalta la capacidad de esta cepa para la biodegradación de fibras sintéticas.

Además, Cavanaugh *et al.*, (2021) identificaron que algunas cepas de *Exiguobacterium*, como *Exiguobacterium* sp., RIT 452, producen compuestos antibióticos eficaces contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, lo que subraya su potencial en la producción de compuestos bioactivos. Sin embargo, a pesar de este potencial en áreas como la biorremediación y la producción de antibióticos, las funciones e interacciones ecológicas dentro de las comunidades microbianas de *Exiguobacterium* aún son áreas que requieren más investigación.

Vishnivetskaya *et al.*, (2009) contribuyeron sobre la identificación y caracterización de *Exiguobacterium*, estableciendo una mejor comprensión de sus estrategias de supervivencia, abriendo nuevas perspectivas para su aplicación en biotecnología y acuicultura, estos avances científicos han sentado las bases para explorar el uso de *Exiguobacterium* en una variedad de campos, consolidándose como un recurso valioso para abordar desafíos ambientales y de salud.

2.3 Descripción genómica de *Exiguobacterium*

Desde su primer aislamiento por Collins *et al.*, (1983) a partir de residuos del procesamiento de papa, *Exiguobacterium* ha sido objeto de estudio, y actualmente cuenta con 27 especies registradas en NCBI (2024). Srivastava *et al.*, (2020) han destacado la notable diversidad genómica y metabólica del género *Exiguobacterium*, lo que le permite prosperar en una variedad de ambientes. En su estudio, el genoma de la cepa PHM11 de *E. profundum*, que comprende aproximadamente 2.92 Mb y 3,033 genes codificantes de proteínas, mostró gran similitud con otras especies de este género, lo cual respalda la existencia de un núcleo genómico conservado con funciones adaptativas clave, útil para inferir el potencial funcional de nuevas cepas. Además, el análisis pan-genómico reveló 3,806 grupos de genes entre diversas cepas, con 2,723 clústeres compartidos, lo que sugiere un alto grado de conservación genética (Srivastava *et al.*, 2020). Si bien, la similitud entre las mismas es esperada debido a que pertenecen al mismo género bacteriano, el análisis genómico podría identificar funciones que estén siendo conservadas a través de las etapas evolutivas, evidenciando información valiosa para respaldar la adaptabilidad del propio género y posibles funciones que pudieran ser aplicadas a diversas áreas.

Por su parte, Zhang *et al.*, (2021) informaron que las especies de *Exiguobacterium* tienen la capacidad de utilizar diversos polisacáridos y proteínas, lo que les permite sobrevivir en hábitats con diferentes condiciones ambientales. Esta capacidad de adaptarse a condiciones extremas, como altas temperaturas o salinidad, resalta la plasticidad metabólica del género, lo que lo convierte en un recurso valioso para aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Zhang *et al.*, 2013).

Rincón-Rosales *et al.*, (2023) detallaron el genoma completo de la cepa TSS-3 de *E. profundum*, revelando que esta tiene un cromosoma de 2.8 Mb, un plásmido de 4.6 Kb, genes como la cardiolipina sintetasa y operones involucrados en la función de los antiportadores de Na^+/H que le ayudan a crecer en condiciones salino-alcálinas extremas. Además, cepas como *Exiguobacterium* sp., S17 han mostrado resistencia a radiación UV y arsénico, lo que sugiere estrategias genómicas específicas para su supervivencia en ambientes extremos (Galván *et al.*, 2025). Los análisis filogenéticos han clasificado a *Exiguobacterium* en dos grupos genéticos, con 27 especies putativas, incluidas algunas nuevas. La cepa HF60T, recientemente

identificada, muestra un 97.2% de similitud con *E. sibiricum*, lo que destaca las estrechas relaciones genéticas dentro del género (Meng *et al.*, 2020). Aunque la adaptabilidad de *Exiguobacterium* está bien documentada, los efectos ecológicos de su distribución generalizada plantean interrogantes sobre su competencia en nichos y el impacto de los cambios ambientales en sus diversas especies (Zhang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018).

2.4 Importancia de *Exiguobacterium* en acuicultura

Vishnivetskaya *et al.*, (2009) analizaron diversas bacterias, entre las que se incluían cepas de *Exiguobacterium*, en diversos entornos extremos, como el permafrost siberiano y las aguas termales de Yellowstone, destacando su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y su potencial para influir en el crecimiento y la salud de las plantas. Aunque el estudio no se relaciona con la acuicultura, sus resultados arrojaron interés sobre el potencial de algunas cepas de *Exiguobacterium* para fomentar el desarrollo y la salud de organismos vivos en sistemas biológicos. Estos hallazgos proporcionaron valiosa información sobre las capacidades de *Exiguobacterium* para actuar como promotores del crecimiento y agentes protectores contra enfermedades en diversos entornos biológicos, lo que podría tener implicaciones relevantes en la acuicultura para mejorar la salud y el rendimiento de los organismos acuáticos.

Villamil y Esguerra (2017) identificaron cepas con potencial probiótico a partir del intestino de tilapia, destacando su actividad antibacteriana contra patógenos relevantes, adherencia al mucus intestinal y buen perfil de crecimiento. Las cepas seleccionadas (*Exiguobacterium* sp. I9, *Enterococcus faecalis* I15 y *Myroides odoratimimus* I19) mejoraron el crecimiento y la supervivencia de los peces tras un desafío con *Edwardsiella* tarda, sin causar mortalidad durante su administración. Estos resultados refuerzan su aplicación como promotores de crecimiento y agentes preventivos en piscicultura.

Aparte de su función como potencial probiótico, *Exiguobacterium* puede intervenir positivamente en la calidad del agua en sistemas acuícolas (Kim *et al.*, 2022). De acuerdo con Zhang *et al.*, (2013) algunas cepas de *Exiguobacterium* han demostrado habilidades para descomponer materia orgánica y compuestos nitrogenados, esta capacidad de degradación contribuye a preservar la calidad del agua al reducir la carga de contaminantes orgánicos e

inorgánicos. Tomando en cuenta lo anterior, y de acuerdo con Akhter *et al.*, (2015) se minimiza el riesgo de contaminación en los sistemas acuícolas y partiendo de la importancia de los probióticos como una alternativa para disminuir la dependencia de la industria acuícola a los antibióticos. Los probióticos deben ser un suplemento alimenticio microbiano vivo que interfiera de manera benéfica al animal hospedero y mejorar el equilibrio microbiano, generando así, mediante diferentes mecanismos de acción, efectos benéficos tanto al hospedero como a su entorno, es decir al sistema de cultivo acuícola (Lazado y Caipang, 2014). Una de las aplicaciones más recientes reportadas para *Exiguobacterium* es el estudio de Kim *et al.*, (2022), en el que se evaluó el uso de *Salipiger thiooxidans* y *Exiguobacterium aestuarii* como probióticos en agua de cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Este estudio demostró que ambas especies bacterianas mejoraron significativamente la calidad del agua en comparación con el control negativo; sin embargo, *E. aestuarii* destacó por generar un mayor aumento en peso y una mejor tasa de eficiencia alimenticia en *P. vannamei*. Estos hallazgos sugieren el potencial de *Exiguobacterium* como una herramienta efectiva para el manejo y mejora de la calidad del agua en la acuicultura, con beneficios importantes tanto para la salud de los organismos acuáticos como para la sostenibilidad ambiental de las operaciones acuícolas.

Una de las características más destacadas del género *Exiguobacterium* es su capacidad de adaptarse y prosperar en ambientes extremos, lo que ha generado interés en sus aplicaciones biotecnológicas y ecológicas, estos hallazgos subrayan el valor de *Exiguobacterium* no solo como modelo de estudio para la adaptación microbiana, sino también como recurso valioso en aplicaciones biotecnológicas que incluyen la seguridad alimentaria y la mejora de la calidad ambiental.

2.5 *Oreochromis niloticus*

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es una especie de pez omnívora, con una gran adaptabilidad y de rápido crecimiento, lo cual, lo convierte en una excelente opción para la acuicultura en regiones de climas ya sean tropicales o subtropicales. Su resistencia a diversas condiciones ambientales, como bajos niveles de oxígeno y altas densidades en cultivos acuícola (Ashouri *et al.*, 2023), contribuyen de manera general a la alta eficiencia de cultivo y desarrollo, produciendo más de 6 millones de toneladas a nivel mundial cada año. En México,

resulta ser de gran importancia, predominando estados como Chiapas, Veracruz y Tabasco, crucial para las economías locales y la seguridad alimentaria. Este organismo, al presentar dieta omnívora puede prosperar con dietas diversas propiciando la mejora en su crecimiento, adaptabilidad y buena tasa de conversión alimenticia, apto para sistemas de acuicultura tanto extensivo como intensiva (Ashouri *et al.*, 2023; Murphy *et al.*, 2024).

A nivel mundial es la especie de pez más cultivada, siendo China e Indonesia los productores más importantes (Murphy *et al.*, 2024), aunque esto, conlleva grandes problemáticas, como enfermedades bacterianas y estrés por un exceso en las densidades de población en cultivo, lo que lleva a una mayor utilización de antibióticos para contrarrestar dichas problemáticas (Ashouri *et al.*, 2023). Una de las alternativas que resaltan más en las últimas décadas es la utilización de bacterias probióticas para mejorar la salud de los peces y reducir la dependencia de antibióticos, con resultados positivos para mejorar el crecimiento y la salud (Ashouri *et al.*, 2023).

Con base en estas propiedades y lo anterior mencionado, el presente trabajo se enfoca en la caracterización fenotípica y genómica de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, explorando su potencial probiótico y su inocuidad en juveniles de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus*.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades son un problema recurrente en la acuicultura, y las soluciones tradicionales, como el uso de antibióticos, suelen ser insuficientes. El uso excesivo de estos antibióticos genera efectos adversos, como la resistencia antimicrobiana, que afecta la salud de los organismos acuáticos. Por esta razón, ha crecido el interés en investigar el potencial de microorganismos con propiedades probióticas, como *Exiguobacterium*, un género bacteriano con aplicaciones prometedoras en este campo. *Exiguobacterium* ha sido utilizado en organismos como *Artemia*, camarón y tilapia, destacándose por su capacidad para adaptarse a condiciones extremas y producir compuestos antimicrobianos como bacteriocinas y metabolitos secundarios, además, ha demostrado ser un eficaz promotor del crecimiento y fortalecer el sistema inmunitario de los organismos, pues su capacidad para generar compuestos bioactivos antimicrobianos le otorga una ventaja sobre otros probióticos, ya que no solo favorece el desarrollo de los organismos acuáticos, sino que también reduce la carga patógena en el entorno. En este contexto, la presente investigación se centra en la caracterización de una cepa aislada en el sureste de México, *Exiguobacterium* sp. (UJAT-01), no descrita previamente en la literatura científica. Se realizó una evaluación de sus propiedades fenotípicas, genómicas y funcionales, tanto in vitro como in vivo, con el objetivo de explorar su potencial como probiótico en tilapia. Este enfoque busca aportar nueva información sobre cepas nativas y su posible aplicación en acuicultura local.

4. HIPÓTESIS

Las características fenotípicas de la cepa *Exiguobacterium* sp. Nov., UJAT-01 inducen un efecto benéfico sobre juveniles de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante el cultivo, incrementando así su supervivencia y mejorando su estado de salud.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar la cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 y evaluar su efecto en la supervivencia de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) durante un experimento de desafío.

5.2 Objetivos particulares

- a) Caracterizar fenotípicamente a *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 mediante su determinación morfológica y pruebas bioquímicas.
- b) Determinar la presencia o ausencia de genes de virulencia y resistencia a antibióticos en el genoma de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01.
- c) Evaluar el efecto de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 en la supervivencia de juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) durante un experimento de desafío.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Caracterización fenotípica de *Exiguobacterium* sp. nov. (UJAT-01)

Con la finalidad de determinar la seguridad, funcionalidad y eficacia como probiótico de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 previo al cultivo de *Oreochromis niloticus* se llevó a cabo su caracterización morfológica y bioquímica empleando metodologías generales propuestas por MacFaddin (2003). La cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 fue donada por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, específicamente del Departamento de Microbiología de la División Académica de Ciencias Biológicas (DAC-Biol), responsable del aislamiento bacteriano a partir de un cultivo de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).

6.2 Movilidad, Indol y Ornitina (MIO)

Se determinó la motilidad, la producción de indol y la actividad de ornitina descarboxilasa (MIO) de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 en medio semisólido. Para esto, se utilizó el medio comercial MIO semisólido (Difco™, Becton Dickinson) que se preparó disolviendo 30.5 g del medio deshidratado en 1 L de agua destilada, ajustando el pH a 6.5 antes de la esterilización con la finalidad de expresar adecuadamente la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa y se pueda observar con claridad el cambio de color en presencia del indicador. El medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min y se distribuyó en tubos de ensaye (5-7 mL por tubo), manteniéndolos en posición vertical para conservar la consistencia semisólida. La motilidad se estima mediante una nubosidad en el crecimiento extendido desde la línea de inoculación realizada con una punción en el centro del agar (TSA) utilizando un aza estéril, con la cual se realizó previamente un raspado a una muestra de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, los tubos inoculados se incubaron a 30 °C durante 24 h en condiciones estáticas. La actividad de ornitina descarboxilasa se define por el cambio de color del medio de amarillo (ácido) a púrpura (alcalino), lo que indicaría que esta bacteria posee la enzima para catalizar la descarboxilación del aminoácido ornitina, y sintetizando putrescina, una diamina que puede influir en la salud intestinal (Hissen *et al.*, 2023). tras la incubación se añadieron cuidadosamente 5 gotas de reactivo de Kovac (Difco™) a la superficie del medio para detectarla producción de indol, por consecuencia, la formación de un anillo rojo en la capa superior resultaría positivo, indicando la presencia de enzima triptofanasa. (Ederer y Clark, 1970).

6.3 Citrato de Simmons

Esta prueba permite evaluar si una bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento y producir compuestos benéficos, como ácidos orgánicos y diacetilo, que pueden influir en la microbiota intestinal y la salud digestiva. Para esto se empleó el agar citrato de Simmons (7.8 mM citrato de sodio, 6.7 mM fosfato de amonio, 85.5 mM cloruro de sodio, 1.23 mM cloruro férrico, agar (15.0 g/L) y 128 mM azul de bromotimol pH 6.9). Para ello, se inoculó el medio de cultivo con la ayuda de un asa recta en el medio citrato de Simmons, el cual se incubó a 30 °C durante 24 h. Como indicador de pH, se utilizó azul de bromotimol, que en presencia de alcalinidad cambió a color azul, indicando resultados positivos. Ante la ausencia de cambio de color ni crecimiento, se consideró una prueba negativa (MacFaddin, 2003).

6.4 Rojo de metilo

La prueba de rojo de metilo es cualitativa para la producción de ácidos estables a partir de la fermentación de la glucosa. Para ello, se inoculó un cultivo de *Exiguobacterium sp. nov.*, UJAT-01 de 24 h en caldo rojo de metilo a 30 °C durante un mínimo de 48 h. Posteriormente, se añadieron 5 gotas de indicador de pH rojo de metilo. Si el resultado es positivo, el medio se mantiene rojo brillante (pH 4.4 – 4.2); si es amarillo, indica un resultado negativo (pH 6.0), y si el color es naranja, indica una reacción tardía, por lo que es necesario repetir la prueba (MacFaddin, 2003). Esta prueba es importante para evaluar la capacidad de la cepa UJAT-01 de *Exiguobacterium sp. nov.*, para fermentar glucosa y producir ácidos en cantidad suficiente para reducir el pH del medio. Un resultado positivo sugiere que la bacteria es capaz de fermentar glucosa, lo que puede contribuir a un ambiente ácido en el tracto intestinal de los peces. Sin embargo, la producción de ácidos no siempre implica una ventaja en la microbiota intestinal o que la bacteria sea capaz de tolerar las condiciones ácidas del intestino, y no todas las bacterias fermentativas son probióticas.

6.5 Curva de crecimiento

El crecimiento bacteriano se llevó a cabo a partir de la toma de muestra de una asada correspondiente a *Exiguobacterium sp. nov.*, UJAT-01, en TSB incubando durante 24 h a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se realizó el lavado celular para eliminar residuos del medio de cultivo, estandarizar el inóculo y evitar que metabolitos acumulados afectaran la fase

experimental sometiendo el inoculo a centrifugación de $2,224 \times g$ durante 15 min a 4°C en una centrifuga (EppendorfTM modelo 5430R), para sedimentar las células bacterianas y poder llevar la decantación necesaria para finalmente obtener el pellet celular para resuspenderlo en PBS (solución salina fosfatada) estéril, esta misma se ajustó a una densidad óptica de 1 (medida a 600 nm) igual a 1.09×10^9 UFC/mL. Se distribuyeron 100 μL de la suspensión bacteriana en tubos de cristal de 30 mL, utilizando un volumen total de 15 mL de medio TSB en cada uno, asegurando que todos los tubos contenían la misma cantidad y densidad bacteriana, posteriormente se incubaron todos los tubos en agitación a 150 rpm a 30°C . La toma de muestra se llevó a cabo en las horas 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 26 h post-incubación. Para cada intervalo se tomó una alícuota de 100 μL del cultivo y se realizaron diluciones seriadas previamente calculadas ($h_0=10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$; $h_2=10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$; $h_4=10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$; $h_6=10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$; $h_8=10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$; $h_{12}=10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$; $h_{24}=10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$; $h_{26}=10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$). Cada muestra se sembró por triplicado en placas de TSA mediante el método de extensión de superficie utilizando un rastrillo o aza de cristal en condiciones estériles evitando contaminación. Las placas se incubaron durante 24 h y tras este tiempo se realizó el conteo colonial formado en cada una de las placas para poder determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en cada tiempo establecido.

6.6 Temperatura

Para determinar el rango de crecimiento óptimo de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se ajustó la densidad óptica (DO) a 0.1 a 600 nm ($DO_{600\text{nm}} = 0.1$) antes de iniciar el ensayo. Para ello, se añadieron 10 mL de caldo soya tripticaseína (TSB) y 1 mL de una suspensión bacteriana previamente ajustada a la misma DO. Se utilizaron tubos con capacidad de 30 mL, pero se emplearon solamente 10 mL por tubo. Estos tubos se mantuvieron con agitación continua a 100 rpm durante 24 h a distintas temperaturas (4, 15, 25, 30, 35, 40 y 45°C), tomando lecturas cada hora durante el ensayo. Las mediciones de densidad óptica se realizaron al instante, es decir, cada hora de lectura, los tubos estuvieron fuera de las incubadoras solo 30 s, para evitar alterar las temperaturas entre mediciones. Previo a cada lectura, se limpió cuidadosamente cada tubo, asegurándose de que no tuviera marcas o interferencias que pudieran alterar la medición, tomando lecturas cada hora durante el ensayo con la ayuda de un biofotómetro (Eppendorf, Merck Darmstadt, Alemania). Para cada temperatura, se utilizaron tres réplicas independientes (tres tubos por temperatura) y un tubo con solo medio como control negativo, sumando un total de 28 tubos. Cada lectura se tomó sin abrir los tubos, para asegurar la

integridad de las mediciones, sin interrumpir las condiciones de la prueba. Para evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se realizó un ANOVA de una vía, considerando la temperatura como el único factor independiente y la densidad bacteriana (Abs 600 nm) como variable de respuesta. Posteriormente, se aplicó una prueba post hoc de Tukey HSD para identificar diferencias significativas entre los grupos analizados.

6.7 Salinidad

La evaluación del efecto de diferentes salinidades (0.5, 1, 2.5, 3, 6, 8, 10 y 13%) sobre el crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se realizó en tubos de ensayo con 10 mL de caldo soya tripticaseína (TSB), manteniendo agitación continua a 100 rpm durante 24 h a 30 °C. Se tomaron lecturas de absorbancia a 600 nm cada hora durante el ensayo, utilizando un biofotómetro (Eppendorf, Merck Darmstadt, Alemania). Cada medición de densidad óptica se realizó al instante, con los tubos fuera de las incubadoras solo 30 s para evitar alteraciones en la temperatura. Previo a cada lectura, los tubos se limpiaron cuidadosamente para asegurarse de que no tuvieran marcas o interferencias que pudieran alterar la medición. Se utilizaron réplicas independientes para cada concentración de NaCl, con controles negativos (solo medio) para cada condición. En total, se utilizaron 32 tubos (8 concentraciones de NaCl, cada una con 3 réplicas y 1 control negativo). Durante el ensayo, los tubos se mantuvieron cerrados herméticamente para evitar cualquier tipo de contaminación o variación en las condiciones internas. En cuanto a la manipulación, se evitó al máximo abrir los tubos, lo que garantizó que no se alteraran las condiciones de temperatura y salinidad. Posteriormente, se realizó un ANOVA de una vía, considerando la salinidad como el único factor independiente y la densidad bacteriana (Abs 600 nm) como variable de respuesta. Por último, se aplicó una prueba post hoc de Tukey HSD para identificar diferencias significativas entre los grupos analizados.

6.8 Hemólisis

La prueba de hemólisis se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo comercial de agar sangre, suplementado con sangre desfibrinada de bovino (Procedentes de Laboratorio de Análisis Especiales y Diagnostico Microbiológico, La Paz, BCS). El uso de sangre bovina en el agar sangre es esencial para cultivar bacterias de difícil proliferación, ya que proporciona nutrientes y factores de crecimiento que favorecen el desarrollo bacteriano, permitiendo la diferenciación

según sus propiedades hemolíticas (Barboza *et al.*, 2002; Egwuatu *et al.*, 2014). El tipo de hemólisis se interpretó de acuerdo con el procedimiento estándar que se basa en la coloración que se produce alrededor de la estría después del periodo de incubación de 24 horas a 30 °C. La coloración verde-grisácea se interpretó como hemólisis alfa y la coloración amarilla como hemólisis beta, con base en la degradación parcial o total de los eritrocitos, respectivamente.

6.9 Sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos se realizaron mediante el método de microdilución en TSB según las directrices del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se ensayaron cuatro tipos de antibióticos: enrofloxacina (ENR), furazolidona (FZD), florfenicol (FLF) y oxitetraciclina (OXI). Para esto, se preparó un stock inicial de 500 µL de cada antibiótico, en medio de cultivo (TSB), asegurando su esterilidad mediante filtración con filtros de 0.22 µm. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas al 50%, comenzando con una alta concentración del antibiótico para obtener una serie de concentraciones decrecientes (1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg/mL). Finalmente, en una placa de 96 pozos se añadieron 10 µL del inóculo bacteriano, 70 µL de medio de cultivo y 70 µL de las diluciones del antibiótico a cada pocillo, con sus respectivos controles de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 (TSB+bacteria) y de esterilidad (TSB). La placa se incubó a 30 °C durante 24 h en agitación a 200 rpm. Posteriormente, se midió la absorbancia (nm) de cada pocillo para determinar el crecimiento bacteriano mediante un lector de placa Multiskan™ GO. Vale la pena mencionar que, tras la dilución en los pocillos al añadir el medio TSB y la suspensión bacteriana, las concentraciones finales de las soluciones con los antibióticos fueron de 478, 239, 119, 60, 30, 15, 7, 4, 2, 1 y 0.5 µg/mL (Anexo A).

6.10 Pruebas de motilidad: Swimming, Swarming y Twitching

Para determinar el tipo de motilidad que presenta la cepa UJAT-01 de *Exiguobacterium* sp. nov., se utilizaron placas con caldo soya tripticaseína (TSB) con diferentes porcentajes de agar: 0.3% para swimming, 0.6% para swarming y 1% para twitching. En el caso de swimming y swarming cada placa se inoculó superficialmente (sin llegar al fondo de la placa) y de manera profunda (llegando al fondo de la placa) en el caso de twitching con ayuda de un palillo estéril. En el caso de swarming, se siguió la metodología propuesta por Rashid y Kornberg (2000). Las placas se incubaron a 30 °C (swimming y swarming) y 36 °C (twitching) durante 24 h.

Finalmente, se determinó de manera positiva o negativa la presencia de alguno o todos los movimientos bacterianos. Por lo que, las pruebas de motilidad son fundamentales para evaluar la capacidad de movimiento de esta bacteria, lo cual podría influir en su efectividad como bacteria benéfica y mejorar la interacción con su entorno.

6.11 Aislamiento de ADN genómico y secuenciación

El ADN genómico de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 se extrajo utilizando el kit QIAamp DNA microbiome en el Laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Subsede Mazatlán (CIAD) en Acuicultura y Manejo Ambiental, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (1%, p/v), mientras que su concentración se midió utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EE. UU.). El genoma de esta cepa se secuenció en la plataforma Illumina Miniseq en el Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC., subsede Mazatlán. La secuenciación fue pareada, por lo que las secuencias de esta plataforma tenían secuencias pares de unos 150 pares de bases (bp) tanto para las lecturas de Forward (Fw) y Reverse (Rv).

6.12 Ensamble y análisis genómico

El análisis del genoma incluyó un pretratamiento de las secuencias mediante un filtrado de calidad con el software Cutadapt v3.4, utilizando los parámetros predeterminados del programa (Martin, 2011). Posteriormente se realizó el ensamblaje del genoma utilizando tres programas de software: SPAdes v3.12.0 (Prijbelski *et al.*, 2020), donde se utilizaron tres valores de *k-mer* para el ensamblaje: 21, 33 y 55; se estableció un umbral de cobertura de 10 (--cov-cutoff) y se empleó un esquema de puntuación Phred con un desplazamiento de 33. Para A5-miseq (pipeline), se fijó un umbral de cobertura de 10 (--cov-cutoff) y un tamaño mínimo de contig de al menos 500 nucleótidos; además, se seleccionaron tres valores de *k-mer* para el ensamblaje: 21, 31 y 55, utilizando el mismo esquema de puntuación Phred con un desplazamiento de 33. Por último, para el software Skesa v2.14, se utilizó un valor del 1% para las secuencias consideradas contaminantes (--vector_percent), se estableció un tamaño mínimo de contig de 200 pb (--min_contig_lgth) y una cobertura mínima requerida de x3 (--min_contig_cov). La corrección de errores se llevó a cabo en los tres programas mencionados como parte integral del proceso de ensamblaje.

Las pruebas de calidad detalladas se realizaron utilizando el software QUAST v5.1.0 con parámetros estándar, incluyendo un tamaño de genoma estimado de 4,000,000 pb (--est-ref-size), un porcentaje mínimo de identidad del 95.0 (--min-identity) y una longitud mínima de contig de 500 pb. Se dividieron los andamios (--split-scaffolds) y se especificó el uso de un genoma grande (--large). Una vez obtenidos los archivos de salida, se compararon las métricas de cada ensamblaje, incluyendo el número de contigs, contigs fragmentados, N50, L50 y sus longitudes, determinando que el pipeline A5-miseq proporcionó los mejores resultados en el análisis, con un menor número de contigs, contigs más largos y un valor de N50 más alto.

Posteriormente se realizó la anotación del genoma mediante el software Prokka (Seemann, 2014) y la visualización del genoma ensamblado y anotado se realizó con la plataforma Proksee (Grant *et al.*, 2023). Se calculó el porcentaje de contenido GC y se realizó la anotación para identificar genes de resistencia y proteínas presentes en todos los genomas utilizando el *pipeline* del NCBI (Tatusova *et al.*, 2016).

La detección de profagos se realizó mediante tres herramientas distintas: VirSorter, Phigaro y PHASTER (Arndt *et al.*, 2016). La búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos se llevó a cabo con RGI (Resistance Gene Identifier) utilizando la base de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), con parámetros de alta calidad.

El cálculo del porcentaje de identidad promedio (ANI, *Average Nucleotide Identity*) entre las secuencias se realizó con el software PyANI (v. 0.2.13.1) (Larralde *et al.*, 2025). Los datos obtenidos se utilizaron para construir un *heatmap* mediante un script en Python (v. 3.13.2). El análisis de factores de virulencia se realizó empleando la base de datos Virulence Factor Database (VFDB, versión 6.0), utilizando los siguientes parámetros: *e-value* $\leq 1e-5$, % de identidad ≥ 80 y % de cobertura ≥ 60 . Finalmente, la búsqueda de metabolitos secundarios se efectuó con el software antiSMASH (v.8.0 beta) (Medema *et al.*, 2011).

6.13 Desafío de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 en tilapia

6.13.1 Aclimatación

Juveniles de tilapia con un peso promedio de 0.74 g se mantuvieron en aclimatación en tanques circulares de 600 L, con 450 L de agua durante tres semanas, esto con la finalidad de evitar algún evento de mortandad y realizar observaciones de los signos clínicos para

identificar algún tipo de enfermedad. Durante el tiempo de aclimatación los juveniles se mantuvieron a una temperatura de 24 °C y a una salinidad de entre 0.5 y 1 ppm. Los organismos fueron alimentados a saciedad dos veces al día con dieta comercial Winfish® Zeigler (55% de proteína, 15% de grasa y 30% carbohidratos), manteniendo limpieza del fondo de los tanques por sifoneo diario para evitar una sobrecrecimiento bacteriano y recambios de agua de un 50% del volumen total.

Previo al bioensayo, se evaluaron individualmente los organismos a utilizar, siguiendo criterios de inclusión y exclusión específicos. Los criterios de inclusión consideraron organismos con un peso promedio requerido (0.5 - 1 g), buen consumo de alimento, búsqueda y consumo activo del mismo, nado activo y normal sin comportamientos anormales (nado errático, flotar en la superficie, nadar de lado), libres de lesiones y parásitos visibles. En cuanto a los criterios de exclusión, se descartaron organismos con lesiones visibles, coloraciones anormales, mal funcionamiento de aletas y órganos sensoriales, interacciones sociales inadecuadas, falta de alerta y sensibilidad a estímulos externos, así como síntomas de anorexia, letargia, ojos saltados o cualquier comportamiento anormal.

6.13.2 Preparación de inóculo

La cepa UJAT-01 de *Exiguobacterium* sp. nov., se cultivó en caldo soya tripticaseína (TSB) a 30 °C durante 24 h con una velocidad de rotación de 150 rpm. Posteriormente, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación a 2224 g durante 15 min a 5 °C. Las células se lavaron tres veces en PBS (buffer de fosfato salino) y se resuspendieron hasta alcanzar una densidad óptica de DO=1,0 (DO₆₀₀ nm). Una vez determinada la densidad bacteriana, se realizaron los respectivos ajustes para obtener suspensiones de 10⁴, 10⁵ y 10⁶ UFC/g de peso (Tabla 1). Para calcular la concentración bacteriana necesaria en la suspensión de inóculo, se utilizó la relación entre la carga bacteriana deseada en los organismos, su peso promedio y el volumen de inyección. La densidad celular de la suspensión se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

(1)

$$UFC/mL = \frac{UFC/gr \times \text{peso del pez (gr)}}{\text{Volumen inyectado (mL)}}$$

Donde UFC/mL representa la concentración requerida en la suspensión, UFC/g deseadas es la carga bacteriana final esperada en el organismo, peso del pez (g) es el peso promedio de los individuos experimentales, y Volumen inyectado (mL) corresponde al volumen administrado

a cada pez. La concentración final de UFC fue verificada antes de la inoculación para asegurar la dosis establecida. Posteriormente, las suspensiones fueron inoculadas a los organismos por vía intraperitoneal y por el método de inmersión. En ambos casos se empleó como referencia la cepa *E. coli* ATCC 25922 a una densidad de 10^6 (*Escherichia coli* Seattle 1946 es una cepa de control de calidad secuenciadas con el genoma completo que no produce verotoxina) misma que fue verificada previo a inoculación para asegurar a dosis establecida, misma que fue proporcionada desde el cepario bacteriológico del CIAD (Unidad Mazatlán), utilizada únicamente dentro de las instalaciones de la misma institución (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos utilizados en desafío por inoculación intraperitoneal

No.	Tratamiento	Réplicas	Organismos por réplica
1	Control negativo (sin bacteria)	3	10
2	Testigo (<i>E. coli</i>) 10^6 UFC/gr	3	10
3	<i>Exigubacterium</i> sp. nov., UJAT-01 10^6 UFC/gr	3	10
4	<i>Exigubacterium</i> sp. nov., UJAT-01 10^5 UFC/gr	3	10
5	<i>Exigubacterium</i> sp. nov., UJAT-01 10^4 UFC/gr	3	10
Total de organismos			150

6.13.3 Desafío

Se realizaron dos desafíos utilizando dos métodos de inoculación: intraperitoneal e inmersión. Previamente a los desafíos intraperitoneal y por inmersión se llevó a cabo el protocolo de sedación, en donde los organismos en grupos de 10 fueron anestesiados con Eugenol (Sigma-Aldrich, aceite de clavo pureza >98.5%) a una concentración de 1.04 gr/mL durante 90-120 s, con la finalidad de evitar el estrés, reducir el manejo y poder realizar las inoculaciones con el mayor cuidado posible sin dañar a los peces.

6.13.3.1 Inoculación Intraperitoneal

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Soto-Rodríguez *et al.*, (2018). Se desinfectaron 15 acuarios de plástico de 25 L con alcohol al 70% y cloro al 10%, correspondientes a las réplicas experimentales. Además, se desinfectaron 150 especímenes juveniles de *O. niloticus* (peso promedio: $2.91 \text{ g} \pm 0.5$) aplicando alcohol al 70% en la región ventral, con la finalidad de evitar contaminación cruzada y no infectar a los peces por algún agente patógeno que pudiera adherirse durante el proceso de manipulación y preparación. Se utilizaron cinco tratamientos experimentales, cada uno con tres réplicas de 10 peces (Tabla 1): control negativo: los peces fueron inoculados con 50 μL de solución tampón salino fosfato (PBS) estéril a pH 7; Testigo (*E. coli*): peces inoculados con 50 μL de células lavadas de la cepa *Escherichia coli* American Type Culture Collection (ATCC 25922) en PBS a una densidad de 10^6 UFC/g, y controles positivos: *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01: peces inoculados con 50 μL de células lavadas con PBS con dosis de 10^6 , 10^5 , 10^4 UFC/g respectivamente de la cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01. Todos los organismos se inspeccionaron visualmente para detectar signos clínicos que sugirieran algún tipo de afectación, como nado errático, flotar en la superficie, no alimentarse, etc., cada hora en los primeros 2 días, posteriormente cada 3-4 h hasta que se finalizó el bioensayo (8 días).

Una vez finalizado el bioensayo, se evaluó la capacidad de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 para colonizar diferentes órganos de los peces (hígado, bazo, riñón, cerebro e intestino), con la finalidad de determinar la inocuidad, ya que la presencia de esta cepa en órganos internos podría indicar algún impacto adverso en la salud del organismo. Para esto se seleccionaron aleatoriamente dos organismos de cada tratamiento para realizar el análisis bacteriológico de dichos órganos. Cada muestra de órgano fue macerada y diluida en 1 mL de solución PBS. La inoculación en agar soya tripticaseína (TSA) se llevó a cabo debido a que este medio nutritivo es ideal para el crecimiento de diversas bacterias, incluyendo *Exiguobacterium* sp., lo que facilita el aislamiento, crecimiento y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en los órganos. La identificación y cuantificación precisa de bacterias anaranjadas (posible *Exiguobacterium* sp. nov.) se realiza observando colonias con tonalidad naranja y forma característica, incubando las placas durante 24 h a 30 °C para el conteo de UFC/g.

6.13.3.2 Inmersión

El desafío por inmersión se llevó a cabo siguiendo los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el apartado 6.14.1, en donde se seleccionaron 48 juveniles de *O. niloticus* de 5.60 g divididos en dos grupos experimentales por triplicado, el primer grupo fue el control negativo (únicamente PBS), con 8 organismos cada uno, el segundo grupo fue el tratamiento con *Exiguobacterium* con 8 organismos, inoculados a una densidad final de 10^7 UFC/mL, manteniendo en ambos tratamientos una temperatura de 28 °C con aireación continua, sin alimentación y sin recambio de agua durante 165 h. Durante el bioensayo los peces fueron revisados por cualquier signo clínico anormal que indicara algún tipo de afectación, como nado errático, flotar en la superficie, no alimentarse cada hora en los primeros 2 días, posteriormente cada 3-4 h hasta que se finalizó el bioensayo (7 días).

Una vez finalizados los bioensayos, se siguió el protocolo de sacrificio descrito por McFarland y Klonts (1969), utilizando una sobredosis de aceite de clavo al menos tres veces mayor a la establecida para una sedación normal (100 μ L/L) con un tiempo de exposición prolongado (20-25 min), asegurando que los peces perdieran la conciencia completamente, sin movimiento opercular. Y se evaluó de igual forma que en el apartado 6.14.3 inciso (1).

6.13.3.3 UFCs en fondo de columna de agua y fondo de acuarios

Para realizar los conteos de UFC en el agua de los acuarios, se tomaron muestras a las 0, 7, 20, 28, 43, 49, 67, 91 y 118 horas post-inoculación (h.p.i.). En el caso de la columna de agua, se extrajeron muestras con cuidado para evitar perturbar excesivamente el agua, asegurándose de tomar únicamente el agua suspendida, lejos de las paredes y el fondo del acuario. Para el fondo, se raspó ligeramente el lecho del acuario al mismo tiempo que se tomaba la muestra de agua, con el objetivo de recolectar posibles crecimientos bacterianos presentes en el fondo. Posteriormente, cada muestra se sembró por triplicado en placas de TSA utilizando el método de extensión superficial con un rastrillo o aza de cristal en condiciones estériles para evitar cualquier contaminación. Las placas se incubaron durante 24 h y, transcurrido ese tiempo, se realizó el conteo de las colonias formadas en cada placa, lo que permitió determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC). La identificación y cuantificación precisa de las bacterias de tonalidad naranja (posible *Exiguobacterium sp. nov.*) se realizó observando las colonias con su color y forma característica, así como el conteo de bacterias heterótrofas totales tanto en la columna de agua como en el fondo de los acuarios.

7. RESULTADOS

7.1 Pruebas bioquímicas y hemólisis

Durante estas pruebas se observó que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, presentó resultado positivo en la motilidad y negativo para las pruebas de indol, ornitina, crecimiento en el medio de citrato de Simmons y una nula reacción en la prueba de rojo de metilo (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de pruebas bioquímicas de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01

Prueba	<i>Exiguobacterium</i> sp. nov., UJAT-01.
Motilidad	Positivo
Indol	Negativo
Ornitina	Negativo
Citrato de Simmons	Negativo
Rojo de metilo	Negativo
Hemólisis	Negativo

7.1.1 Hemólisis

En el caso de la prueba de hemólisis se observó que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 presentó una hemólisis gamma (γ). Este resultado en específico señala la ausencia de actividad hemolítica, indicando que la bacteria no secreta enzimas o factores que propicien la ruptura o lisis de los eritrocitos, ni la liberación de hemoglobina. Esta falta de hemólisis se refleja visualmente como un área sin zonas de claridad o cambios en la tonalidad alrededor de la colonia bacteriana. (Fig. 1).



Figura 1. Prueba de Hemolisis a *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01

7.2 Concentración mínima inhibitoria

La Tabla 3 muestra la susceptibilidad antibiótica de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), expresada en $\mu\text{g/mL}$, frente a los antibióticos oxitetraciclina, enrofloxacina, florfenicol y furazolidona. Los valores de MIC obtenidos fueron $64 \mu\text{g/mL}$ para oxitetraciclina y furazolidona, $128 \mu\text{g/mL}$ para florfenicol y $256 \mu\text{g/mL}$ para enrofloxacina. De acuerdo con los puntos de corte clínicos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), estos valores indican el grado de resistencia o susceptibilidad de la cepa a los antibióticos evaluados. Se observó que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 mostró una mayor MIC para enrofloxacina, lo que sugiere una menor susceptibilidad a este antibiótico. En comparación, los demás antibióticos evaluados presentaron MIC más bajas. Además, la respuesta bacteriana a los antibióticos mostró una tendencia de inhibición más gradual y consistente (Anexo B).

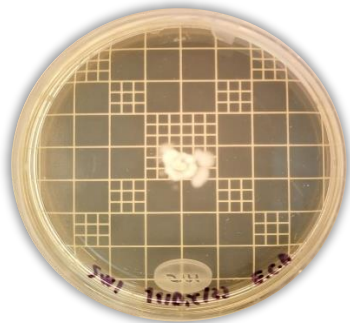
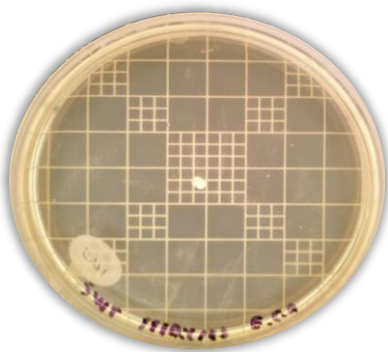
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/mL}$ de enrofloxacina; furazolidona; florfenicol; oxitetraciclina en *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01

Antibiótico	Concentración de antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración final en microplaca ($\mu\text{g/mL}$)
Oxitetraciclina	64	30
Enrofloxacina	256	120
Florfenicol	128	60
Furazolidona	64	30

7.3 Motilidad Swimming, Swarming y Twitching

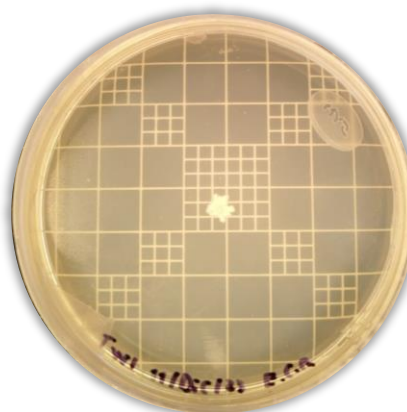
Durante este análisis, se evaluó la capacidad de movilidad de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 en diferentes medios de cultivo, observándose variaciones en el patrón de crecimiento dependiendo del tipo de motilidad analizada. En la prueba de swimming, se evidenció un crecimiento radial alrededor de la punción, indicando una motilidad positiva en medios semisólidos. En la prueba de swarming, el crecimiento se limitó a la zona de inoculación sin expansión detectable, lo que sugiere un resultado negativo para este tipo de motilidad. Por otro lado, en la prueba de twitching, se observaron pequeñas extensiones de crecimiento alrededor del área de punción, lo que confirma la capacidad de desplazamiento en medios semisólidos a sólidos. Cabe destacar que la interpretación de la motilidad se basó exclusivamente en la extensión del crecimiento bacteriano, ya que otros factores, como variaciones en la coloración, podrían estar relacionados con la producción de metabolitos o diferencias en la densidad celular, sin representar necesariamente un indicador de movilidad.

Tabla 4. Resultados de movilidad mediante Swimming, Swarming y Twitching de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01

Prueba	Resultado	Imagen
Swimming	Positivo	
Swarming	Negativo	

Twiching

Positivo



7.4 Cinética de crecimiento bacteriano

Durante esta prueba, *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 presentó una fase de adaptación en las primeras horas de incubación. Posteriormente, se observó la fase exponencial entre las 2 y 8 h, alcanzando su pico máximo de crecimiento a las 8 h con una densidad de 8.8 Log UFC/mL. Después de este punto, la bacteria entró en la fase estacionaria, seguida de una fase de declive que se extendió hasta el final del análisis (26 h), donde se registró una disminución en la densidad celular (Anexo C).

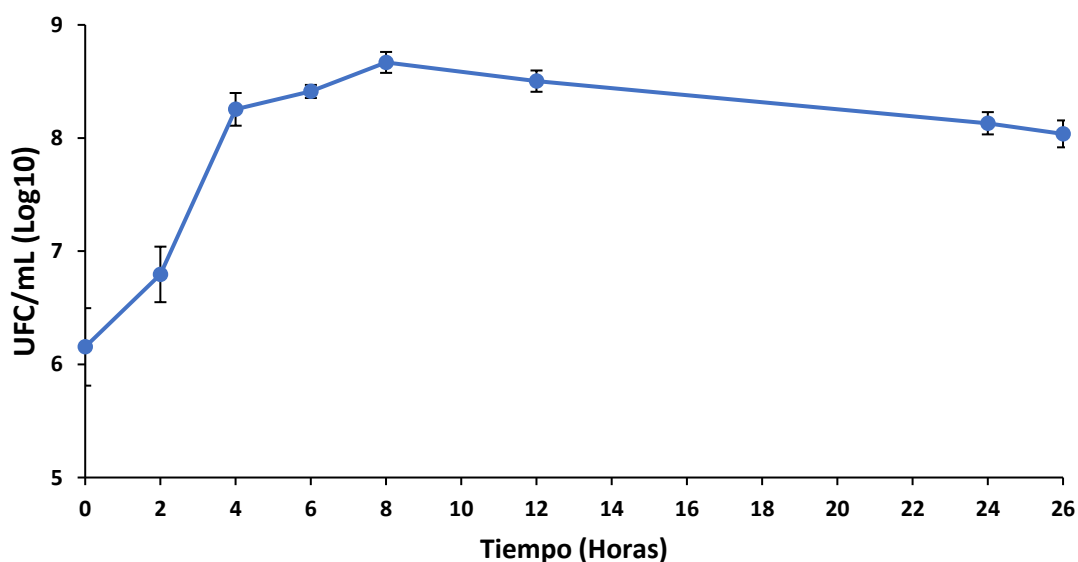


Figura 2. Curva de crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 evaluada durante 26 h a 30 °C en medio de cultivo TSB. Las barras indican la desviación estándar. N=3

7.5 Temperatura óptima de crecimiento

En cuanto a la temperatura óptima de crecimiento, *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 presento un crecimiento dependiente de la temperatura, pues mientras más alta sea la temperatura entre 25 – 44 °C (grupo B) se puede observar (Fig. 3) que mayor será la densidad bacteriana, presentando una diferencia significativa ($P < 0.001$) en comparación con temperaturas bajas 4 y 8 °C (grupo A), en donde el crecimiento fue limitado (Abs 0.249 – 0.264). Dentro del grupo B, no existieron diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas (25, 30, 35 y 44 °C), si bien se observa que a 30 – 35 °C se registró el máximo crecimiento inicial (Abs 0.879) entre 5-6 h, a 44 °C se registró un aumento entre 18-19 h (Abs 0.857), sugiriendo mecanismos de adaptación a altas temperaturas. Adicionalmente, se evaluó el impacto del tiempo y su interacción entre las temperaturas, por lo que se determinaron diferencias significativas $P < 0.05$ (representadas con asteriscos en la fig. 3) en diversos puntos del ensayo, específicamente a 6 h (entre 4 y 30 °C), 18 h (entre 8 y 44 °C) y 21 h (entre 44 y 30 °C). Por otro lado, aunque esta especie a 4 y 8 °C (Grupo A) mostró un crecimiento inicial bajo, se registró un aumento progresivo, indicando un lento pero constante crecimiento ante ambientes fríos. Estos resultados, demuestran la versatilidad térmica de la cepa, con respuestas diferenciadas entre los grupos A y B, particularmente recuperar el crecimiento a temperaturas extremas (Fig. 3).

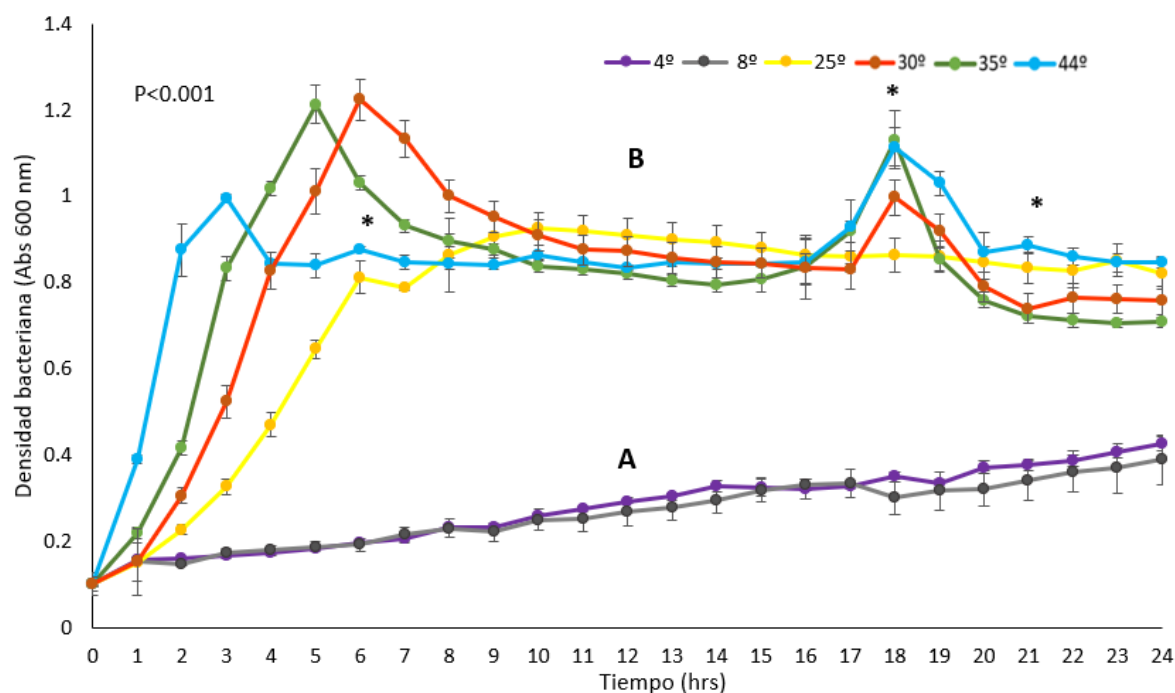


Figura 3. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 evaluada a distintas temperaturas de prueba en medio de cultivo TSB durante 24 horas. Las barras indican la desviación estándar y los asteriscos (*) las diferencias significativas entre tiempos. N=3.

Tabla 5. Diferencias significativas entre grupos correspondiente a las temperaturas analizadas

Temperatura (° C)	Media de densidad bacteriana (Abs)	Diferencias significativas entre grupos
4	0.264	A
8	0.249	A
25	0.819	B
30	0.879	B
35	0.819	B
44	0.857	B

7.6 Salinidad óptima de crecimiento

El crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 muestra una dependencia de la concentración de NaCl, pues se observa (Fig. 4) que a bajas salinidades (0.5-1 % NaCl) se registraron las máximas densidades bacterianas (Abs 0.519-0.730) durante las primeras 6 horas de incubación, indicando un crecimiento óptimo en estas condiciones. Concentraciones moderadas (2.5 – 8 %NaCl Grupo B) presentaron un crecimiento reducido (Abs 0.193- 0.257),

pero similar entre sí a partir de la hora 14, sugiriendo un umbral de tolerancia en donde el crecimiento se estabiliza. A diferencia de salinidades elevadas (10-13 %NaCl grupo C) que inhibieron casi por completo el crecimiento, manteniendo una densidad bacteriana cercana al valor inicial (Abs 0.102-0.110), lo que refleja un estrés osmótico severo. Adicionalmente, se evaluó el efecto del tiempo sobre los tratamientos, registrándose en las horas 6 y 17. A las 6 h se observaron diferencias entre salinidades de grupo A (0.5 y 1 %) frente a la de los grupos subsecuentes, aunque estadísticamente los grupos B y C no mostraron diferencias entre sí. En la hora 17, las diferencias fueron notorias entre los grupos B y C, reflejando una mayor separación entre los rangos de salinidad analizados.

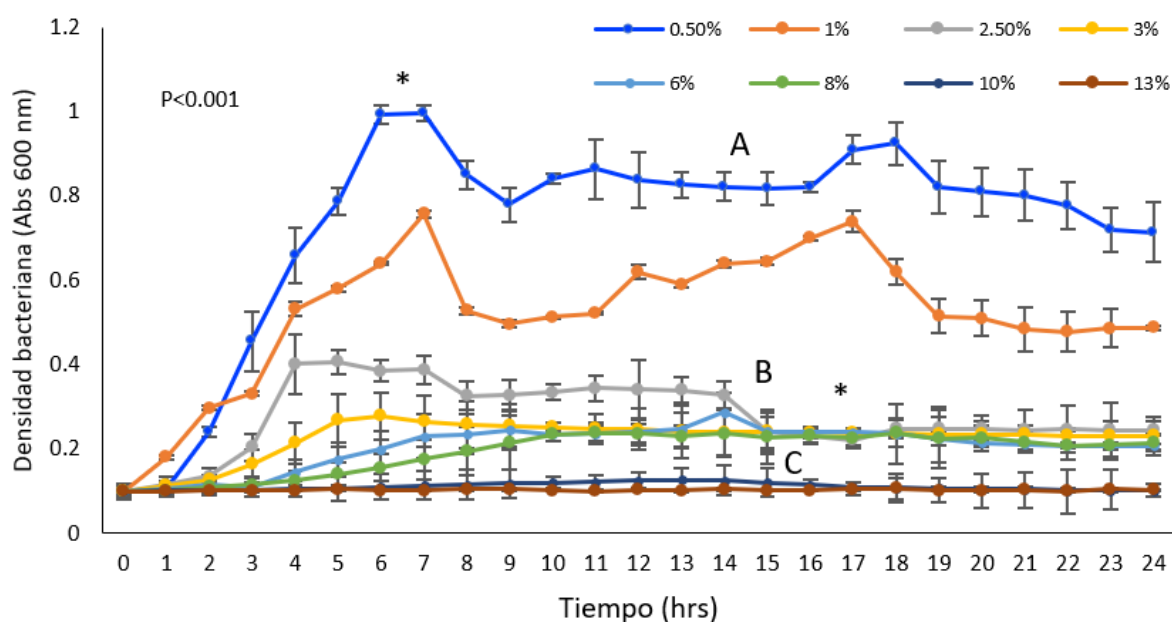


Figura 4. Crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 a diferentes porcentajes de NaCl, N=3 y los asteriscos (*) las diferencias significativas entre tiempos.

Tabla 6. Diferencias significativas entre grupos correspondiente a las salinidades analizadas.

Salinidad (%)	Media de densidad bacteriana (Abs)	Diferencias significativas entre grupos
0.5	0.730	A
1	0.519	A
2.5	0.275	B
3	0.224	B
6	0.205	B
8	0.193	B
10	0.110	C
13	0.102	C

7.7 Infección intraperitoneal de *O. niloticus* con *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01

Se observó que los organismos de *O. niloticus* inoculados con PBS (control negativo) tuvieron una supervivencia del 100% durante el ensayo (Fig. 5), mientras que para el grupo testigo (inoculados con *E. coli*) la supervivencia fue de 96.6%. Para el tratamiento con una densidad de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, de 10^6 , la supervivencia fue ligeramente menor (93.3%) registrándose solo dos muertes en total (se realizó un análisis bacteriológico a uno de los organismos que murieron) (Tabla 8). Para el tratamiento con una densidad de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 a 10^5 se observó una supervivencia del 100%, mientras que para el tratamiento con una densidad de 10^4 la supervivencia fue de 96.6%. Los resultados de diferencias entre las tasas de supervivencia de los distintos tratamientos se presentan en la Tabla 7, con una $P = 0.47$, lo que indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Durante este ensayo, ningún organismo que murió presentó signos clínicos de enfermedad, como lesiones cutáneas visibles, úlceras, manchas o descamación, de acuerdo con lo registrado visualmente, los organismos sufrieron eventos de estrés durante la manipulación durante la inoculación por lo que la agresividad y canibalismo entre ellos fue algo que se presentó, debido a lo anterior esta puede ser una de las razones por la cual ciertos organismos murieron.

En el caso de los análisis de bacteriología se observaron aislados bacterianos con tonalidades naranja a lo largo de los bioensayos, coloración típica de las colonias de *Exiguobacterium* sp., en medio TSA además de ser bacilos cortos, Gram positivos (Tabla 8).

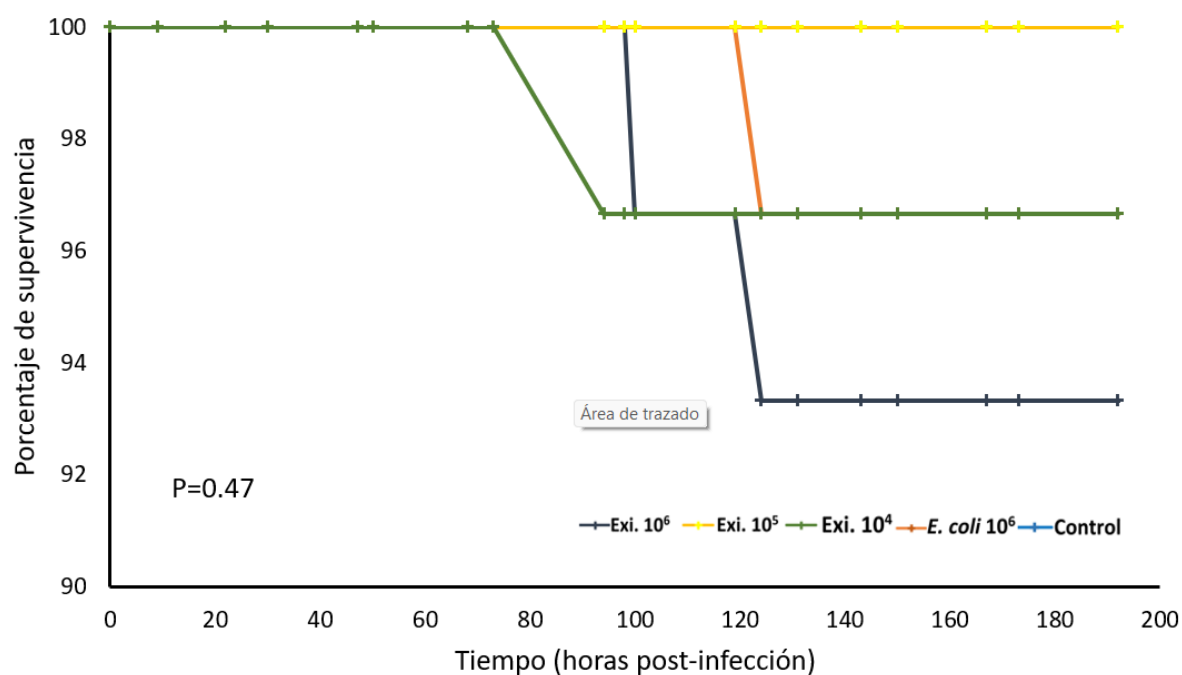


Figura 5. Porcentaje de supervivencia de *O. niloticus* durante la infección por inoculación intraperitoneal con una P=0.47. N=3

Tabla 7. Tasas de supervivencia de *Oreochromis niloticus*: Grupos homogéneos según la prueba de Tukey.

Tratamiento	Media de supervivencia	Diferencias significativas
Exi.10 ⁶	93.3%	A
Exi.10 ⁵	100.0%	A
Exi.10 ⁴	96.6%	A
<i>E. coli</i> 10 ⁶	96.6%	A
C. negativo	100.0%	A

7.8 Densidad de bacterias durante el bioensayo por inmersión

Durante el bioensayo por inmersión, se observó que en los controles negativos (inoculación con PBS estéril) presentaron un crecimiento nulo de colonias con coloración naranja que pudiera representar a las colonias de *Exiguobacterium* (Fig. 6). Mientras que en los

tratamientos donde se inoculó *Exiguobacterium* se observó que a las 20 h.p.i., se registró una densidad de 4.21 Log UFC/mL el cual disminuyó a una densidad de 0.66 UFC a las 50 h.p.i y con un conteo prácticamente de 0 UFC/mL a las 90 h.p.i (Fig. 7).

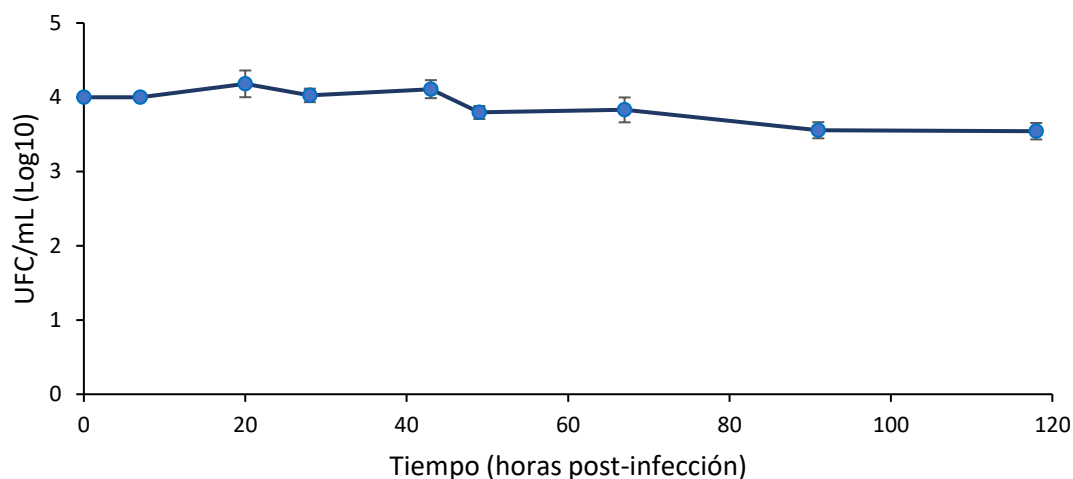


Figura 6. Promedio de la densidad de bacterias heterótrofas totales (UFC/mL) del control negativo registradas en muestras de la columna de agua durante el bioensayo de inmersión, las barras indican la desviación estándar. N=3

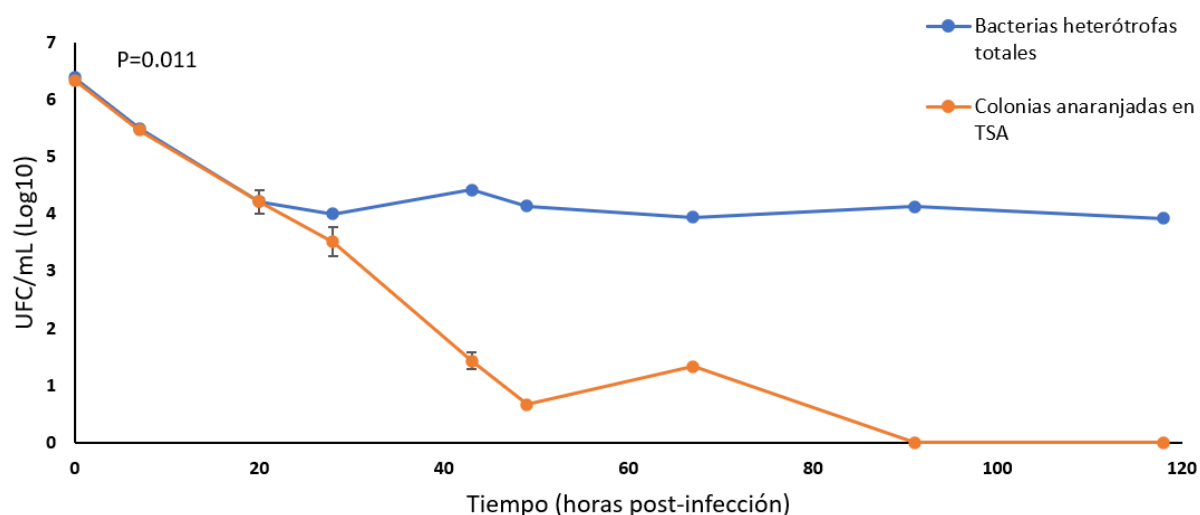


Figura 7. Promedio de la densidad de bacterias heterótrofas totales y colonias con fenotipo anaranjado (UFC/mL) en TSA, registradas en muestras de la columna de agua durante el bioensayo de inmersión, las barras indican la desviación estándar en cada uno de los conteos realizados, con una $P=0.011$ y $N=3$

En el caso de muestras del fondo del acuario (Fig. 8), se observa que tanto bacterias heterótrofas totales y naranjas, presuntamente *Exiguobacterium*, presentaron una disminución de 4.54-5.25 UFC/mL (Log 10) a 3.24-4.15 UFC/mL (Log 10), respetivamente,

entre las 20 h manteniéndose así hasta el término del ensayo (118 h.p.i); sin embargo, las colonias de color naranja se mantuvieron por debajo de las heterótrofas totales UFC respectivamente. En la Fig. 9 se observa la comparación entre colonias anaranjadas (presuntivamente *Exiguobacterium* sp. nov.) tanto de columna como de fondo de los acuarios.

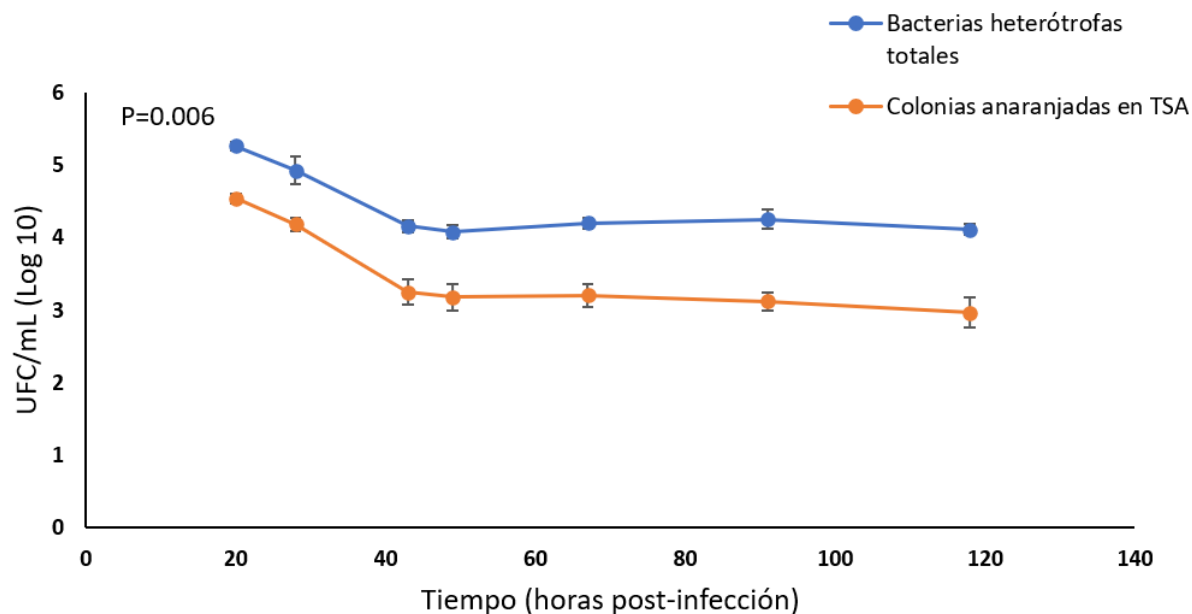


Figura 8. Densidad de colonias heterótrofas totales registradas en muestras de agua en el fondo del estanque de control positivo durante el bioensayo de inmersión. Con una $P=0.006$ y $N=3$.

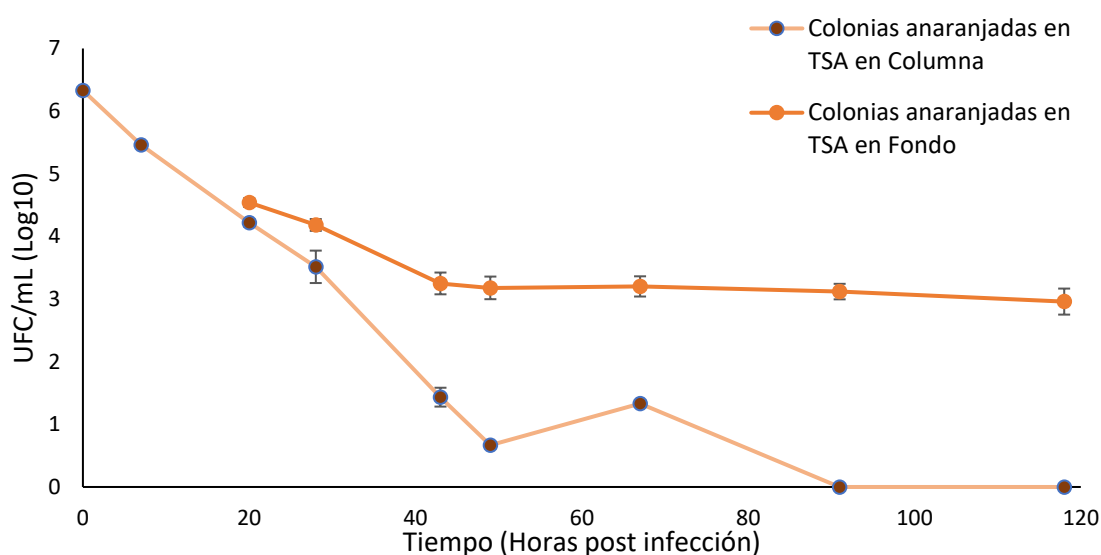


Figura 9. Densidad de colonias color naranja registradas en muestras de agua tanto de la columna de agua como del fondo del estanque durante el bioensayo de inmersión (control positivo). $N=3$

Tabla 8. Aislados bacterianos obtenidos tras la fase experimental de inoculación intraperitoneal e inmersión.

Número y ensayo	Tratamiento	Muestra	h.p.i	Gram	Morfología
1 - IP	Control (-)	Bazo	124	Negativa.	Bacilo largo
2 - IP	Control (-)	Bazo	124	Positivo.	Cocos
3 - IP	Control (-)	Riñón	124	Negativo.	Bacilo largo
4 - IP	Control (-)	Intestino	124	Negativo.	Bacilo largo
5 - IP	Control (-)	Intestino	124	Negativo.	Bacilo largo
6 - IP	<i>Escherichia coli</i>	Intestino	124	Negativo.	Bacilo largo
				Positivo (Afín a	
7 - IP	T1 (10^6)	Riñón	124	<i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
				Positivo (Afín a	
8 - IP	T1 (10^6)	Cerebro	124	<i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
9 - IP	T2 (10^5)	Riñón	124	Negativo.	Bacilos largos
				Positivo (Afín a	
10 - IP	T3 (10^4).	Cerebro	124	<i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
11 - IP	T3 (10^4).	Cerebro	124	Negativo.	Bacilo largo
12 - IP	Inmersión	CA	124	Negativo.	Bacilo corto
				Positivo (Afín a	
13 - IN	<i>Exigubacterium</i> sp.	AFD	0	<i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
				Positivo (Afín a	
14 - IN	<i>Exigubacterium</i> sp.	AFD	6	<i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
				Positivo (Afín a	
15 - IN	<i>Exigubacterium</i> sp.	CA	38	<i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto

16 - IN	<i>Exigubacterium</i> sp.	AFD	38	Positivo (Afín a <i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
17 - IN	<i>Exigubacterium</i> sp.	AFD.	91	Positivo (Afín a <i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
18 - IN	<i>Exigubacterium</i> sp.	AFD	91	Positivo (Afín a <i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto
19 - IN	T. con <i>Exigubacterium</i> sp.	AFD	118	Positivo (Afín a <i>Exiguobacterium</i> sp).	Bacilo corto

Notas: h.p.i= Horas Post Infección; IP: inoculación intraperitoneal; IN: inoculación por inmersión; AFD: Agua de Fondo de acuario; CA: Columna de agua.

7.9 Identificación genómica y relación filogenética de *Exiguobacterium* sp. nov. (UJAT-01)

Debido a la baja similitud del genoma completo de la cepa UJAT-01, comparado con otros genomas del género *Exiguobacterium* (96.6% de similitud según BLAST), el análisis realizado en este estudio resalta que los organismos comparados pertenecen a una misma especie (Tabla 9). Los análisis de hibridación genómica y ANI mostraron una alta relación con *Exiguobacterium profundum*, con valores del 96.67 y 95.41% en EZBioCloud, y 80.28% y 59.62% en GGDC 4.0, marcando la cercanía con posibles diferencias taxonómicas. Los valores de ANI en BLAST y MiGA (96.77 y 95.41%) confirmaron esta relación. Para los análisis comparativos, se utilizó la secuencia de *E. profundum* TSS3 debido a su relación con UJAT-01, ya que el análisis filogenético las ubicó en el mismo clado. Además, en estudios genómicos se recomienda emplear secuencias de RefSeq de NCBI, y *E. profundum* TSS3 está reportado como genoma completo, a diferencia de *E. profundum* C10, que solo cuenta con un ensamble en contigs y no está en RefSeq. Su genoma fue obtenido mediante secuenciación híbrida con tecnologías de lecturas cortas y largas, lo que permite una reconstrucción más precisa. Además, la identidad nucleotídica superior al 96% sugiere que ambas cepas pertenecen a la misma especie. Durante el ensamblaje del genoma de *Exiguobacterium* sp. nov. (UJAT-01), se usaron SPAdes, Skesa y A5-miseq para evaluar su eficiencia en la reconstrucción genómica. Como se muestra en la Tabla 10, Skesa resultó el más eficiente al reducir el número total de

contigs y ensamblar el contig más grande, logrando una representación más completa y menos fragmentada del genoma de *Exiguobacterium* sp. nov. (UJAT-01).

Tabla 9. Identificación de especies.

Plataforma	Especie	% de hibridación
EZBioCloud	<i>Exiguobacterium profundum</i> (TSS-3)	96.67
	<i>Exiguobacterium profundum</i> (10C)	95.41
	<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	87.44
	<i>Exiguobacterium flavidum</i> (HF60)	70.08
	<i>Exiguobacterium indicum</i>	69.86
	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	77.90
GGDC 4.0	<i>Exiguobacterium profundum</i> (TSS-3)	80.28% (DDH>70%)
	<i>Exiguobacterium profundum</i> (10C)	59.62% (DDH>70%)
Identidad Promedio de nucleótidos		
BLAST	<i>Exiguobacterium profundum</i>	96.77
	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	95.86
	<i>Exiguobacterium flavidum</i>	86.47
	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	77.56
MiGA	<i>Exiguobacterium profundum</i> (10C)	95.41
	<i>Exiguobacterium marinum</i>	88.44
	<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	87.73

Tabla 10. Análisis de calidad del ensamblaje genómico utilizando SPAdes, SKESA y A5-miseq.

Software	No. Contigs	Contigs más largo (pb)
SPAdes	27	597 684
Skesa	19	902 840
A5-miseq	19	597 872

7.10 Mapa genómico de *Exiguobacterium*

El análisis del genoma de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 reveló la presencia de dos clusters importantes asociados con la resistencia antimicrobiana: el gen vanY en el Cluster vanA y el

gen *vanW* en el Cluster *vanB*. Además, la identificación reveló la presencia de genes de relevancia para las aplicaciones probióticas, codificantes para las enzimas amilasa alfa (α) y amilasa beta (β), clave en la descomposición del almidón. Estas enzimas son de interés por su potencial en la mejora de la digestibilidad de alimentos en organismos acuáticos. El análisis de profagos y factores de virulencia a lo largo del genoma no reveló resultados positivos con los softwares utilizados (Fig. 10).

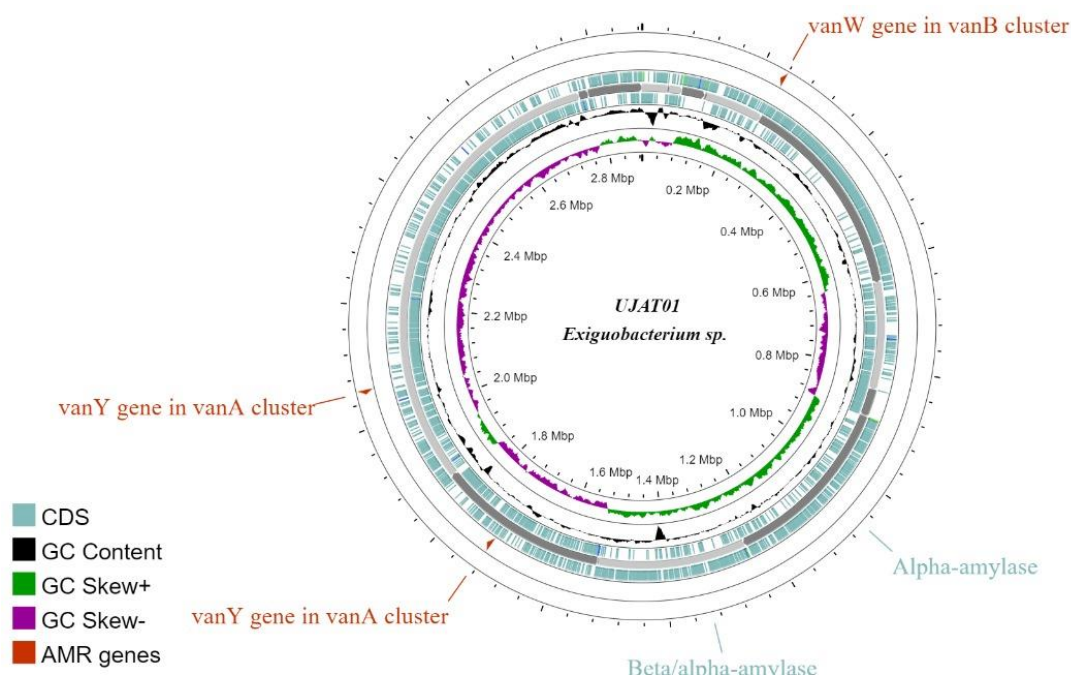


Figura 10. Mapa genómico de *Exiguobacterium sp. nov.*, UJAT-01. De adentro hacia afuera se representa la posición genómica, el GC Skew, el contenido de GC, las secuencias codificantes en cada hebra de ADN y finalmente la posición de los genes de resistencia.

7.11 Análisis de similitud entre especies

Para determinar la especie a la que pertenece la bacteria aislada primero se realizó el cálculo del ANI comparando el genoma de la bacteria aislada, con los genomas de la totalidad de las cepas reportadas en NCBI (Tabla 11). En el mapa de calor (Fig. 11) se observa, mediante un gradiente de colores, la similitud que presentan las distintas especies del género *Exiguobacterium* en comparación con la cepa de estudio *Exiguobacterium sp. nov.*, (UJAT-01). Las especies que presentan los porcentajes de ANI más altos en comparación con la cepa UJAT01 son: *Exiguobacterium flavidum* la cual refleja un 70.8% de similitud de ANI, y *Exiguobacterium profundum* con un 96.7% de similitud de ANI.

Tabla 11. Especies del género *Exiguobacterium* utilizadas para el análisis comparativo reportadas en NCBI.

Especie bacteriana	CEPA	ID de NCBI
<i>Exiguobacterium antarcticum</i>	AL19	PRJNA956816
<i>Exiguobacterium soli</i>	DVS_3Y	PRJNA862670
<i>Exiguobacterium undae</i>	KCTC 3810	PRJNA316179
<i>Exiguobacterium artemiae</i>	9AN	PRJNA862670
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	255-15	PRJNA10649
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	JCM12280	PRJNA218048
<i>Exiguobacterium indicum</i>	RSA42	PRJNA278187
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	ZBG2	PRJNA287868
<i>Exiguobacterium enclense</i>	NIO-1109	PRJEB15474
<i>Exiguobacterium enclense</i>	ASM145689v1	PRJNA302095
<i>Exiguobacterium flavidum</i>	HF60	PRJNA459509
<i>Exiguobacterium profundum</i>	TSS-33	PRJNA887767
<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	AmN35-10	PRJNA682484
<i>Exiguobacterium marinum</i>	a-1	PRJNA933108
<i>Exiguobacterium qingdaonense</i>	S82	PRJNA644789
<i>Exiguobacterium</i> sp.	S126	PRJNA644789
<i>Exiguobacterium acuatico</i>	IMTB_3094	PRJNA862670

<i>Exiguobacterium chiriquicha</i>	RW-2	PRJNA208114
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	A-EM	PRJNA542428
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	PN47	PRJNA345439
<i>Exiguobacterium himgiriensis</i>	K22_26	PRJNA862670
<i>Exiguobacterium alkaliphilum</i>	1/12	PRJNA243884

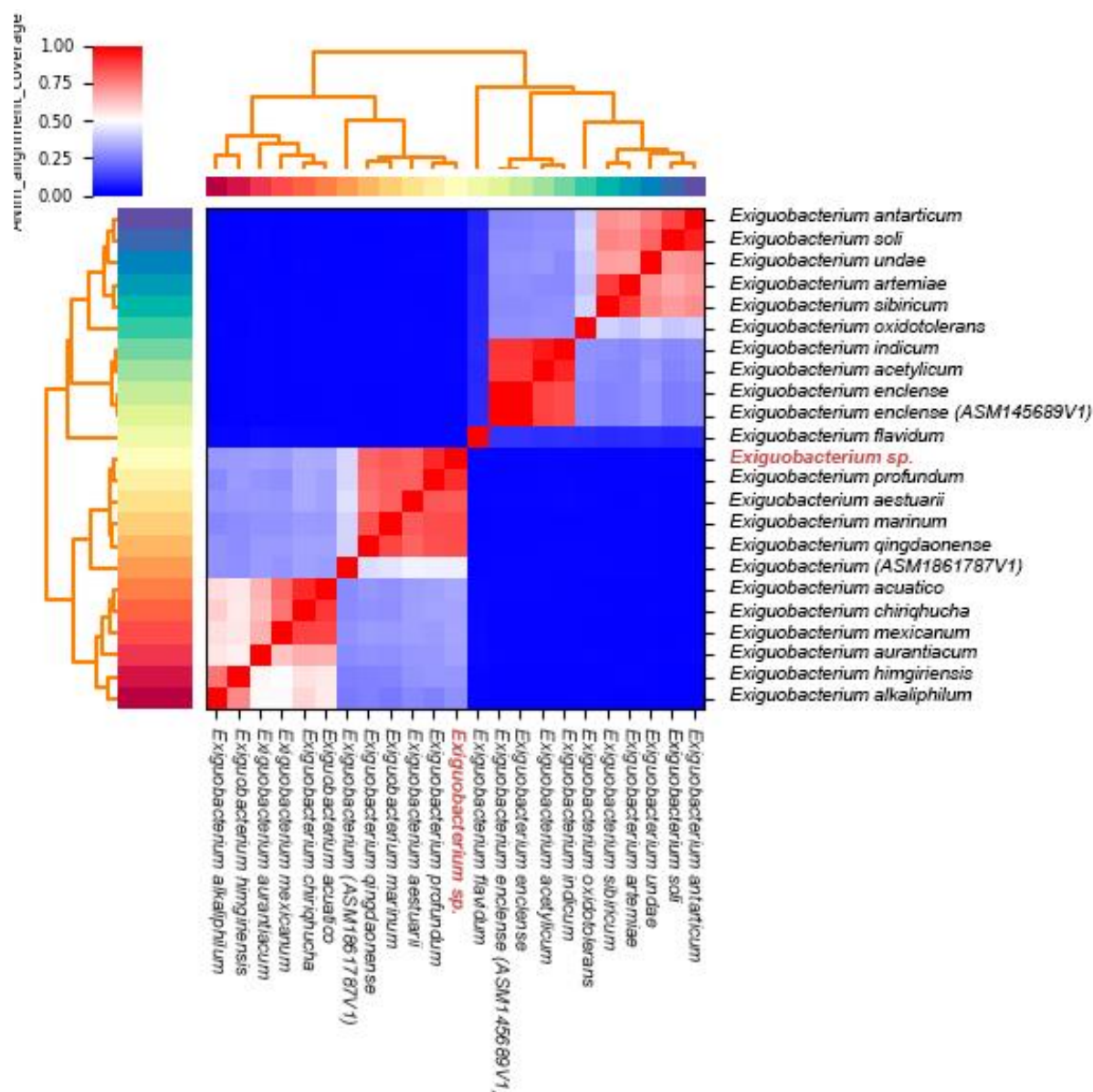
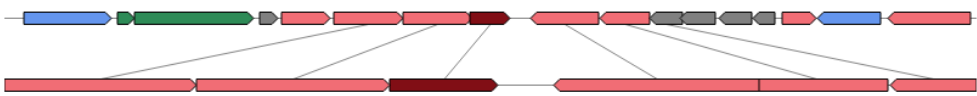


Figura. 11. Mapa de calor de acuerdo del porcentaje de ANI del genoma correspondiente a *Exiguobacterium* sp. nov. en comparación con distintas especies del género *Exiguobacterium*. Las especies más similares presentarán tonalidades rojizas más intensas, a diferencia de la gama de azules, que refleja una menor similitud entre sí.

7.12 Análisis genómico de clústeres de genes potencialmente asociados con la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en *Exiguobacterium* sp. nov

Durante el análisis genómico, se identificó un clúster de genes relacionado con la biosíntesis de terpenos y carotenoides, compuestos conocidos principalmente por sus propiedades antioxidantes. Este clúster muestra homología con el encontrado en *Halobacillus halophilus* (similarity score 0.49) (Fig. 12), lo que sugiere una relación, aunque la similitud relativamente baja podría implicar diferencias en los genes involucrados. Además, la presencia de este mismo clúster en otras cepas de *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT-01 (Fig. 13) indica que estos

genes podrían estar asociados con procesos biosintéticos similares en diferentes cepas de esta especie.



Reference: BGC0000645: 0-7475

Reference	terpene	Similarity score	Type	Compound(s)	Organism
BGC0000645		0.49	Terpene	carotenoid	Halobacillus halophilus DSM 2266
BGC0000647		0.36	Terpene	carotenoid	Rhodobacter sphaeroides
BGC0000650		0.31	Terpene	carotenoid	Algoriphagus sp. KK10202C
BGC0000644		0.25	Terpene	carotenoid	Dietzia sp. CQ4
BGC0000637		0.23	Terpene	carotenoid	Corynebacterium glutamicum
BGC0000640		0.20	Terpene	carotenoid	Enterobacteriaceae bacterium DC404
BGC0000484		0.20	RiPP	glycocin F	Lactobacillus plantarum
BGC0000636		0.20	Terpene	carotenoid	Brevibacterium linens
BGC0000630		0.19	Terpene	(2R,3S,3'S)-2-hydroxyastaxanthin	Paracoccus haeundaensis
BGC0000646		0.18	Terpene	β-carotein	uncultured bacterium

Figura 12. Posición genómica de los genes de *Exiguobacterium* sp. nov. Del cluster de síntesis de terpenos. del cluster determinado en *Exiguobacterium* sp. (parte superior) directamente con cluster de bacterias registradas en NCBI, mostrando una mayor similitud con *Halobacillus halophilus*.

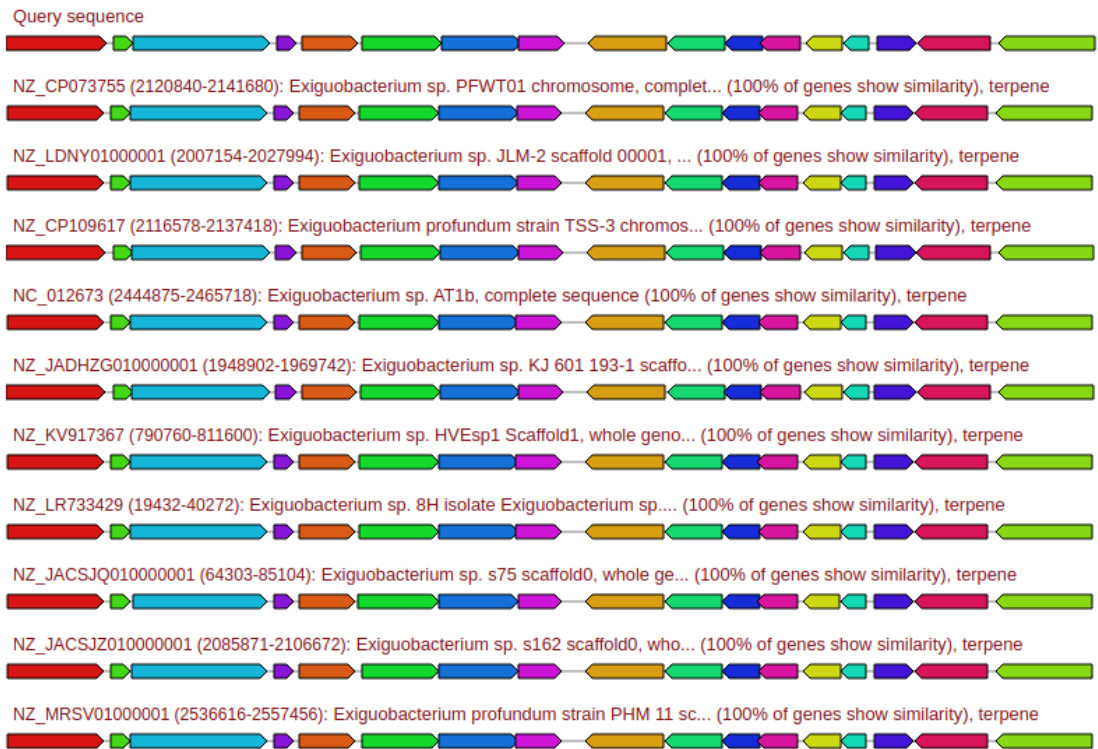


Figura 13. Comparación entre el *cluster* de genes asociados a los terpenos en *Exiguobacterium* sp. nov. (primera línea) con el presente en otras especies de bacterias del género *Exiguobacterium*.

8. DISCUSIÓN

En la actualidad, la utilización de bacterias benéficas o probióticos en los sistemas de cultivos de organismos de importancia acuícola es una alternativa prometedora, ya que el uso de estas promueve una mejora en la calidad de agua y altas supervivencias de los organismos de cultivo. En el presente estudio se caracterizó e identificó la cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 aislada de cultivos de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), originaria de la ciudad de Villahermosa, Tabasco, México.

De acuerdo con las observaciones de morfología colonial y celular realizadas a la cepa UJAT-01 presenta características comunes descritas para el género *Exiguobacterium* sp. nov., la cual es Grampositiva de células más alargadas que altas y de forma cilíndrica, con una distintiva curvatura o forma de bastón, así como un color violeta sobre todo el área celular. Dichas características de forma y tamaño coinciden con lo reportado por Rodrigues *et al.*, (2006), Garrity (2005) y Murray *et al.*, (2020) quienes observaron que esta tonalidad morada o violeta de este género se presenta debido a que las paredes celulares son gruesas y permite que la tinción quede atrapada dentro de la misma.

Otros aspectos importantes observados en la cepa UJAT-01 fueron su motilidad, ausencia de indol y reacción de ornitina, crecimiento en el medio de citrato de Simmons, y la falta de reacción en la prueba de rojo de metilo (la cual podría estar relacionada con las características metabólicas de *Exiguobacterium* sp. nov., ya que este género no presenta una fermentación predominantemente láctica como *Lactobacillus*). Sin embargo, algunas especies de *Exiguobacterium* han mostrado capacidades fermentativas, como *Exiguobacterium profundum*, que puede producir ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos, generando principalmente L-lactato (Crapart *et al.*, 2007). Además, *Exiguobacterium aurantiacum* AN2 es capaz de realizar fermentación celulolítica, produciendo carboximetilcelulosa extracelular (Hagaggi, 2018). Estas fermentaciones, aunque diversas, no se caracterizan por una acumulación significativa de ácidos que se detecten en la prueba de rojo de metilo, esto podría explicar la falta de respuesta positiva en dicha prueba para *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 en las condiciones evaluadas. En cuanto al citrato de Simmons, el resultado negativo es coherente con la variabilidad fenotípica entre distintos microorganismos. Aunque muchas bacterias compartan el mismo filo, esto no implica que

posean las mismas características fenotípicas, lo que resalta la gran diversidad existente entre ellas (Sonenshein, 2007).

En cuanto a la prueba de hemólisis, se ha sugerido que esta puede contribuir a determinar la patogenicidad de una bacteria (Sampathkumar *et al.*, 1998). Sin embargo, no todas las bacterias presentan esta propiedad, como se observó en el presente estudio, donde UJAT-01 no mostró hemólisis. Este resultado concuerda con estudios previos, como el reportado por Setiani *et al.*, (2019), ya que el género *Exiguobacterium* es generalmente reconocido por su baja patogenicidad (Setiani *et al.*, 2019). De hecho, este género se clasifica principalmente como hemolítico gamma, lo que significa que no induce hemólisis, aunque en algunas situaciones, como cambios de pH y baja disponibilidad de nutrientes, puede presentar hemólisis alfa, es decir, una actividad hemolítica mínima, bajo lo que sugiere que las bacterias pueden presentar diferentes patrones hemolíticos de acuerdo a las nutrientes que se presenten en el agar, en casos muy específicos los genes reguladores de la expresión de que pueden provocar diferencias en la actividad hemolítica, en menor proporción pero probable pueden ser las interacciones de metabolitos secundarios, los cuales pueden incrementar o inhibir la hemólisis (Misawa *et al.*, 1995; Skalka y Votava, 1997; Kenny *et al.*, 2006). En el caso de una cepa con potencial probiótico, la ausencia de hemólisis adquiere una importancia particular, ya que sugiere que la bacteria no presenta efectos patógenos directos sobre el hospedero, esta característica es fundamental para garantizar la seguridad y eficacia de la cepa en aplicaciones terapéuticas o preventivas, dado que las cepas probióticas deben ser no patógenas para evitar efectos adversos en el organismo hospedero (Lee *et al.*, 2022).

En relación con las pruebas de motilidad, UJAT-01 mostró un comportamiento positivo en medios líquidos, lo que sugiere la posible presencia de flagelos, los cuales le permitirían a la bacteria desplazarse en entornos acuosos, una característica clave para su dispersión y búsqueda de nutrientes. Este mecanismo es común entre las bacterias que buscan colonizar nuevos ambientes o que responden a cambios en su entorno líquido (Kearns, 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio también sugieren la presencia de mecanismos alternativos de motilidad, como el *twitching*, dado que UJAT-01 mostró capacidad para desplazarse en medios semi-sólidos. En particular, la motilidad por *twitching* es relevante para la colonización de superficies y la formación de biopelículas, lo cual podría ser crucial para la adaptación y supervivencia de la bacteria en diferentes entornos (O'Toole y Wong, 2016). Esto

sugiere que la capacidad de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, para moverse en diversos medios resalta no solo su versatilidad, sino también su potencial para prosperar en condiciones ambientales cambiantes.

Por otro lado, el crecimiento de la cepa UJAT-01 de *Exiguobacterium* sp. nov., durante las primeras dos horas, en las que el aumento en la densidad celular es mínimo, puede explicarse como un proceso normal de adaptación metabólica. Este período corresponde a la fase de latencia, durante la cual la bacteria ajusta sus sistemas metabólicos y activa los mecanismos necesarios para aprovechar los nutrientes disponibles en el medio (Mandel *et al.*, 2024). Aunque el crecimiento inicial es lento, este fenómeno es característico de la fase de adaptación al nuevo entorno. Una vez transcurrido este tiempo, se inicia la fase exponencial, en la que la bacteria, habiendo asimilado los componentes del medio, emplea sus reservas energéticas para replicarse de manera acelerada y aumentar su densidad celular. El crecimiento máximo de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se registró a las 8 h, lo que sugiere que las condiciones del medio favorecieron un ambiente adecuado para su desarrollo, posiblemente en términos de nutrientes disponibles y espacio para su crecimiento, este aumento en la densidad celular también podría indicar que la bacteria ya se ha adaptado por completo al medio, activando sus mecanismos metabólicos necesarios para un crecimiento más eficiente (Caycedo *et al.*, 2021). Finalmente, a partir de la hora 8, se observa una fase de declive, atribuida a la escasez de nutrientes esenciales, como carbono, nitrógeno y minerales, que limitan el crecimiento bacteriano, junto con la acumulación de desechos tóxicos generados por la actividad metabólica y los cambios ambientales que afectan la replicación celular de manera eficiente (Caycedo *et al.*, 2021).

Se observó un mejor desarrollo de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, entre 30 y 35 °C, especialmente durante las primeras 17 h, cuando la actividad enzimática es máxima y se generan condiciones óptimas para la división celular (Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018; White *et al.*, 2019). Sin embargo, el análisis estadístico reveló diferencias significativas en el crecimiento bacteriano entre las temperaturas evaluadas ($P < 0.001$), agrupándolas en dos categorías distintas (Tabla 5). Cuando esta bacteria se sometió a temperaturas entre 4 y 8 °C presentó un desarrollo significativamente menor (Grupo A), mientras que a 25, 30, 35 y 44 °C mostró un crecimiento superior (Grupo B). En particular, a 44 °C se observó un mayor crecimiento bacteriano, aunque con una fase inicial más lenta debido a que esta temperatura supera el

límite óptimo de las bacterias mesófilas (~40 °C). Este fenómeno podría estar relacionado con la capacidad de adaptación térmica de *Exiguobacterium*, lo que le permite desarrollarse en temperaturas elevadas, una característica distintiva del género (Vishnivetskaya *et al.*, 2009 White *et al.*, 2013; White *et al.*, 2019). Finalmente, durante la evaluación a distintas salinidades, se ha reportado que la concentración de sal influye en el crecimiento bacteriano al afectar la osmolaridad y el equilibrio osmótico de las células (Remonsellez *et al.*, 2018). Los resultados muestran que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, exhibe un crecimiento significativamente mayor a una salinidad entre 0.5 y 1% (Grupo A), diferenciándose estadísticamente de las demás condiciones evaluadas ($P < 0.001$) (Tabla 6). En particular, el crecimiento a 0.5% fue significativamente superior al observado en 2.5, 3, 6 y 8% (Grupo B), lo que indica que, si bien estas concentraciones permiten el crecimiento bacteriano, podrían no ser las más adecuadas para maximizar la homeostasis osmótica. Por otro lado, cuando la bacteria se sometió a salinidades de 10 y 13% (Grupo C) presentó un crecimiento significativamente menor en comparación con el Grupo B, siendo estas las condiciones más limitantes. Aunque las salinidades elevadas suelen representar un desafío para muchas bacterias, se observó que a concentraciones de 8 y 10%, el crecimiento bacteriano se mantuvo hasta la hora 14, disminuyendo posteriormente. Esto sugiere una notable tolerancia a condiciones de alta salinidad (Zhang *et al.*, 2021), ya que, a pesar de la reducción, el crecimiento se sostuvo hasta el término de la prueba. Este fenómeno podría explicarse por la capacidad de algunas bacterias para ajustarse gradualmente a condiciones hipersalinas, favoreciendo su proliferación y aumento de densidad, como se ha reportado en *Exiguobacterium chiriqhucha*, *Exiguobacterium* sp., (Cepa SH31) y *Exiguobacterium acetylicum*, especies capaces de habitar tanto en medios marinos como no marinos (Rosales *et al.*, 2005; Remonsellez *et al.*, 2018; White *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2024). En cuanto a la resistencia antimicrobiana, en el presente estudio se observó que *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT-01, presentó distintos niveles de susceptibilidad a los antibióticos evaluados, determinada mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Los resultados mostraron que la MIC más baja se registró para oxitetraciclina y furazolidona (64 y 30 µg/mL en placa, respectivamente), mientras que cuando la bacteria se enfrentó a florfenicol y enrofloxacin se observaron valores de MIC más altos (128 y 256 µg/mL, o 60 y 120 µg/mL concentración en placa, respectivamente). Estos hallazgos indican que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 es más sensible a oxitetraciclina y furazolidona, pero muestra mayor tolerancia a florfenicol y enrofloxacin. Lo anterior concuerda con lo descrito

por Yang *et al.*, (2014) quienes observaron la capacidad de resistencia en especies del género *Exiguobacterium*, como *Exiguobacterium* sp. S3-2, que mostró resistencia a varios antibióticos en condiciones similares. Además, *Exiguobacterium acetylicum* ha mostrado propiedades antimicrobianas prometedoras contra diversas bacterias patógenas, lo que sugiere que, además de su capacidad para resistir antibióticos, podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de infecciones (Aliabadi *et al.*, 2014; Keerthana y Illanjiam, 2024). En particular, los resultados del presente estudio resaltan la susceptibilidad variable de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, frente a antibióticos específicos. Esta variabilidad podría estar asociada con la presencia de genes relacionados con mecanismos de resistencia previamente identificados en su caracterización genómica, como los genes *VanB*, *VanA*, *VanY* y *VanW*, implicados en resistencia a glicopéptidos. Por otro lado, se ha reportado que *E. acetylicum* inhibe el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* mediante la producción de compuestos bioactivos (Aliabadi *et al.*, 2014). Esto sugiere que, a pesar de los mecanismos de resistencia observados, las especies de *Exiguobacterium* también podrían tener la capacidad de producir metabolitos con potencial antimicrobiano. Los resultados de susceptibilidad obtenidos ofrecen información relevante sobre las propiedades de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, tanto en su resistencia como en su posible rol en terapias alternativas.

En la actualidad, la secuenciación masiva de ADN es una herramienta fundamental para la correcta identificación y clasificación de microorganismos (Paul *et al.*, 2020). En este estudio, se utilizó el análisis del porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos (ANI) para confirmar que la cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 pertenece al género *Exiguobacterium*. Los resultados obtenidos revelaron un 96.7% de homología entre *Exiguobacterium* sp. nov. UJAT01 y *Exiguobacterium profundum*, un valor ligeramente superior al umbral del 95% sugerido para la delimitación de especies (Goris *et al.*, 2007; Lindsey *et al.*, 2023). Este nivel de similitud, aunque cercano al límite, junto con la caracterización fenotípica y genómica detallada, plantea la propuesta de que la cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT01, corresponde a una posible nueva especie dentro del género *Exiguobacterium*. Para confirmar esta relación, se compararon los resultados de hibridación obtenidos mediante diversas plataformas de análisis genómico, como EZBioCloud y GGDC (Tabla 9). La homología con *Exiguobacterium profundum* fue de 96.67% y 80.28%, respectivamente, lo que respalda la cercanía genética de la cepa aislada con esta especie. En particular, los resultados de EZBioCloud revelaron un alto

porcentaje de hibridación con varias especies del género *Exiguobacterium*, lo que refuerza la hipótesis de que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT01 pertenece a un clado cercano a *E. profundum*. Al comparar con otra cepa, *Exiguobacterium profundum* 10C, se observa un cambio en el porcentaje de hibridación, lo que indica que, aunque ambas cepas (TSS-3 y 10C) corresponden a *E. profundum*, presentan diferencias genéticas. Estos resultados, contrastados con los obtenidos por EZBioCloud, muestran que las cepas TSS-3 y 10C tienen un 96.67% y 95.61% de hibridación, respectivamente. Además, los análisis de ANI realizados con las herramientas BLAST y MiGA también confirmaron estos hallazgos, mostrando una identidad genética de 96.77% y 95.41%, respectivamente, con *E. profundum* (Tabla 9). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el análisis de hibridación, lo que sugiere una alta similitud genética con *E. profundum*, aunque la cepa *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 presenta diferencias genómicas significativas que apoyan su propuesta como una nueva especie.

Es probable que esta relación se deba a un origen jerárquico común, donde especies como *E. profundum* y *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, comparten un ancestro reciente, pero han seguido caminos evolutivos diferenciados que les han permitido desarrollar características genómicas únicas. Por otro lado, el análisis del contenido genético de la cepa aislada mostró ausencia de profagos y plásmidos, lo que sugiere una menor probabilidad de transferencia horizontal de genes debido a la falta de estos elementos genéticos móviles (Horne *et al.*, 2023).

El análisis del genoma de *Exiguobacterium* sp., (UJAT-01), reveló la presencia de genes relacionados con la resistencia a la vancomicina. En particular, el gen VanW, perteneciente al clúster vanB, desempeña un rol fundamental en conferir resistencia a este antibiótico (Sanakal y Kaliwal, 2011). Aunque su función precisa aún no está completamente definida, se sabe que estos genes actúan modificando los precursores del peptidoglicano, transformando la D-alanil-D-alanina en D-alanil-D-lactato, lo que impide que la vancomicina se una adecuadamente al sitio activo (Hill *et al.*, 2010). La regulación del clúster VanB está mediada por el sistema de dos componentes VanSR, en el cual VanS actúa como una quinasa sensora que detecta la presencia de vancomicina y activa la transcripción de los genes de resistencia (Rotsides *et al.*, 2022). Las cepas que contienen clústeres como vanB pueden mostrar resistencia inducible o constitutiva, dependiendo de mutaciones en los genes reguladores que

modulan su expresión (Riccardi *et al.*, 2021). Desde una perspectiva clínica, la vancomicina es un antibiótico crucial para tratar infecciones graves causadas por bacterias Grampositivas. En este contexto, la detección del gen VanB en *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT01, resalta la necesidad de realizar estudios experimentales para confirmar su resistencia fenotípica a este compuesto, especialmente considerando que los antibióticos evaluados en el contexto de la acuicultura no incluyeron la vancomicina. Aunque estudios previos realizados para el género *Exiguobacterium* no han identificado genes de resistencia a antibióticos comúnmente utilizados en acuicultura, la presencia del gen VanB no parece tener implicaciones inmediatas en este entorno, ni interferir con la susceptibilidad frente a la aplicación de otros fármacos.

El análisis genómico también identificó dos genes de relevancia en las bacterias usadas como probióticas, los cuales codifican para las amilasas alfa (α) y beta (β), las cuales, son enzimas clave en la descomposición del almidón, cada una con funciones y aplicaciones diferenciadas. La α -amilasa facilita la ruptura del almidón en maltosa y glucosa al hidrolizar los enlaces glucosídicos $\alpha,1-4$, desempeñando un papel destacado en varias industrias, como la alimentaria, farmacéutica y textil (Singh *et al.*, 2022). Además, tiene un papel relevante en el sistema nervioso, donde colabora en la degradación del glucógeno, influyendo en los procesos de formación de la memoria (Byman *et al.*, 2021). Por su parte, la β -amilasa actúa principalmente sobre el almidón, generando maltosa e isomaltosa, siendo esencial tanto para el metabolismo de las plantas como para diversas aplicaciones industriales, especialmente en la elaboración de alimentos. Su capacidad para inhibir la retrogradación del almidón contribuye a mejorar la calidad de los productos alimentarios (Das y Kayastha, 2018). Bajo este enfoque, en la acuicultura, los genes que codifican para las amilasas α y β tienen implicaciones clave, ya que podrían mejorar la digestión de los piensos, optimizando la absorción de nutrientes y favoreciendo un crecimiento más eficiente en los peces. La α -amilasa y la β -amilasa podrían tener un impacto en la reducción de residuos en el agua, lo que ayudaría a mejorar la calidad del entorno acuícola. Además, estas enzimas podrían influir en la salud intestinal y en la resistencia a enfermedades, lo que subraya su potencial como probióticos en acuicultura, contribuyendo a un ambiente más saludable y sostenible. Finalmente, el análisis genómico de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01 reveló un clúster de genes potencialmente involucrado en la síntesis de terpenos. Se ha reportado que estos compuestos poseen propiedades antimicrobianas y pueden influir en la viabilidad de cepas probióticas, como se ha observado en otros microorganismos (Shipraadeep *et al.*, 2012).

Además, algunos aceites esenciales que contienen terpenos han sido asociados con un aumento en la supervivencia de bacterias probióticas en productos fermentados, como el yogur, aunque estos hallazgos en la literatura sugieren posibles aplicaciones, el papel específico de los terpenos en *Exiguobacterium sp. nov.* requiere estudios adicionales para comprender su función en este género (Asli *et al.*, 2017).

Durante el reto de inmersión de juveniles de tilapia con UJAT-01, se observó un mayor crecimiento bacteriano en las muestras obtenidas del fondo del tanque, donde el crecimiento se mantuvo hasta el final del ensayo, con 2.95 Log UFC/mL (118 h). En contraste, las muestras de la columna de agua mostraron una disminución considerable de la presencia bacteriana después de las primeras 50 h. Esta diferencia podría estar relacionada con las características y afinidades que presentan ciertos grupos bacterianos por los fondos bentónicos, los cuales proporcionan un sustrato para la adhesión, favoreciendo así la estabilidad del entorno y el acceso a recursos nutricionales (Wang *et al.*, 2022; y Molina *et al.*, 2020). Se ha reportado que algunas especies de *Exiguobacterium* pueden formar biopelículas en ambientes extremos, como el Salar de Huasco (SH) (Pavez *et al.*, 2023). Esta capacidad no solo contribuye a su tolerancia a condiciones adversas, sino que también favorece su adhesión a fondos bentónicos, facilitando su adaptación a entornos con alta salinidad, radiación UV y metales pesados. Esto resalta el papel fundamental de la formación de biopelículas y la presencia de mecanismos de resistencia específicos en la supervivencia y persistencia de estos microorganismos en ambientes hostiles (Pavez *et al.*, 2023).

En el análisis del porcentaje de supervivencia de *O. niloticus*, se observó que, aunque se registraron muertes en algunos tratamientos (T1, T3 y *E. coli*), estas no estuvieron directamente relacionadas con los tratamientos en sí, sino con factores externos como el estrés, el canibalismo o el manejo de los organismos. Dado que la mortalidad fue baja (1 o 2 organismos), se sugiere que *Exiguobacterium sp. nov.*, UJAT-01, no causa efectos adversos en las tilapias. El canibalismo es una conducta común en peces bajo condiciones de estrés y representa una de las principales causas de mortalidad en piscicultura. Este comportamiento suele estar asociado con factores como la falta de alimento, la competencia y las diferencias de tamaño entre individuos (Atencio-García y Zaniboni-Filho, 2006; Sepúlveda-Quiroz *et al.*, 2022). En este contexto, la influencia del canibalismo debe evitarse al evaluar la supervivencia, ya que puede afectar significativamente los resultados obtenidos.

9. CONCLUSIONES

- *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se caracterizó como un bacilo Gram positivo, con motilidad activa en medios líquidos y sólidos, sin capacidad hemolítica, y con crecimiento óptimo entre 30-35 °C y a una salinidad de 1%, destacándose por su preferencia por hábitats bentónicos.
- El análisis genómico de *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, reveló la presencia de genes asociados con la resistencia a glicopéptidos (VanY, VanA, VanW y VanB). Además, se identificaron genes que codifican para amilasas a y b, lo que sugiere un potencial probiótico vinculado a procesos metabólicos digestivos.
- La evidencia genómica obtenida en este estudio confirma que *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, pertenece a la especie *Exiguobacterium profundum*, descartándose su reconocimiento como una nueva especie. No obstante, se sugiere realizar estudios genómicos complementarios que permitan consolidar con mayor precisión su posición taxonómica.
- Debido a su perfil genómico, la ausencia de hemólisis y la falta de efectos patológicos en peces, *Exiguobacterium* sp. nov., UJAT-01, se podría considerar para futuras aplicaciones como un candidato potencial para su desarrollo como probiótico en acuicultura, particularmente para tilapia (*Oreochromis niloticus*), recomendándose la realización de pruebas adicionales de funcionalidad probiótica *in vivo*.

10. LITERATURA CITADA

- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M. y Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2): 733-741. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.038.
- Aliabadi, M., Ghasemi, M. y Isaazadeh, K. (2014). Antimicrobial activity bioactive compounds produced by *Exiguobacterium acetylicum* PTCC1756 against pathogenic bacteria. *Scientific Journal of Microbiology*, 3(1): 55-61. doi: 10.14196/SJMI.V3I4.1320.
- Amoah, K., Huang, Q.C., Tan, B.P., Zhang, S., Chi, S.Y., Yang, H., Liu, H.Y. y Dong, X.H. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 87(1): 796–808. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.029.
- Arndt, D., Grant, J., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y. y Wishart, D. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(1): 16-21. doi: 10.1093/nar/gkw387.
- Ashouri, G., Hoseinifar, S., El-Haroun, E., Imperatore, R., y Paolucci, M. (2023). Tilapia fish for future sustainable aquaculture. In: Hoseinifar, S., Imperatore, R. y Paolucci, M. (eds.). *Novel approaches toward sustainable tilapia aquaculture*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1-47.
- Asli, M., Khorshidian, N., Mortazavian, A. y Hosseini, H. (2017). A review on the impact of herbal extracts and essential oils on viability of probiotics in fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, 13(1): 6-15. doi: 10.2174/1573401312666161017143415.
- Atencio-García, V. y Zaniboni-Filho, E. (2006). El canibalismo en la larvicultura de peces. *Revista MVZ Córdoba*, 11(1): 9-19. DOI:10.21897/rmvz.1040
- Austin, B. (2020). *The bacterial microflora of fish*. 6th ed. Springer International Publishing, Cham. P. 677.
- Azad, M., Islam, S.S., Sithi, I.N., Ghosh, A.K., Banu, G.R., Bir, J. y Huq, A. (2019). Effect of probiotics on immune competence of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 50(2): 644–657. doi: 10.1111/are.13942
- Balcázar, L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D. y Múzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(4): 173-186. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.
- Barboza, Y., Salas, E., Benítez, B. e Izquierdo, P. (2002). Nuevos estudios sobre un medio de cultivo de plasma de bovino que puede ser esterilizado por calor para lactobacilos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia*, 12(6): 707-712.
- Butt, U., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S. y Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and symbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 114: 263-281. doi: org/10.1016/j.fsi.2021.05.003.
- Byman, E., Martinsson, I., Haukedal, H., Netherlands Brain Bank, Gouras, G., Freude, K.K. y Wennström, M. (2021). Neuronal α -amylase is important for neuronal activity and glycogenolysis and reduces in presence of amyloid beta pathology. *Aging Cell*, 20(8): 1-14. doi: 10.1111/ACEL.13433.
- Cavanaugh, N. T., Parthasarathy, A., Wong, N. H., Steiner, K. K., Chu, J., Adjei, J. y Hudson, A. (2021). *Exiguobacterium* sp. is endowed with antibiotic properties against Gram positive and negative bacteria. *BMC Research Notes*, 14(1): 230. doi: 10.1186/s13104-021-05644-2.
- Caycedo Lozano, L., Ramírez, L. C., y Suárez, D. (2021). Bacteria, nutrition and growth: a look from chemistry. *Nova*, 19(36): 49-94. doi: 10.22490/24629448.5293

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement (M100-S17). Wayne, PA: The Institute. United States.
- Collins M., Lund B., Farrow J. y Schleifer, K. (1983). Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov. sp. nov. *Microbiology*, 129(7): 2037-2042. doi: 10.1099/00221287-129-7-2037.
- Crapart, S., Fardeau, M., Cayol, J., Thomas, P., Sery, C., Ollivier, B., y Combet-Blanc, Y. (2007). *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(2): 287-292. doi: 10.1099/ijs.0.64639-0.
- Das, R., y Kayastha, A.M. (2019). β -Amylase: general properties, mechanism and panorama of applications by immobilization on nano-structures. *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications*, 1(2):17-38. doi: 10.1007/978-3-030-25023-2_2.
- Delgado, D., Caceres, L., Gómez, S. y Odio, A. (2023). Effect of dietary garlic (*Allium sativum*) on the zootechnical performance and health indicators of aquatic animals: A mini-review. *Veterinary World*, 16(5):965-976. doi: 10.14202/vetworld.2023.965-976.
- Ederer, G.M. y Clark, M. (1970). Motility-indole-ornithine medium. *Applied Microbiology*, 20(5): 849-850. doi: 10.1128/am.20.5.849-850.1970.
- Egwuatu, T., Ogunsola, F., Okodugba, I., Jide, B., Arewa, D. y Osinupebi, O. (2014). Effect of blood agar from different animal blood on growth rates and morphology of common pathogenic bacteria. *Advances in Microbiology*, 4(16): 1237-1241. doi: 10.4236/aim.2014.416133.
- El-Saadony, M., Alagawany, M., Patra, A., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M., Dhama, K. y Abdel-Latif, H. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117(1): 36-52. doi: 10.1016/j.fsi.2021.07.007.
- Etyemez B., M., Balcázar, J., Demirkale, I. y Dikel, S. (2018). Effects of garlic supplemented diet on growth performance and intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, 486(6): 170-174. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.12.022.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations- World Health Organization). (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization and World Health Organization Joint report.
- FAO/WHO, (2006). *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Galván, F.S., Alonso-Reyes, D. y Albarracín, V. (2025) From genes to nanotubes: exploring the UV-resistome in the Andean extremophile *Exiguobacterium* sp. S17. *Extremophiles*, 29(1): 17. doi: 10.1007/s00792-025-01383-5.
- Garrity, G. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Boone, D.R., Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A. y Schleifer, K.-H. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Springer International Publishing, New York.
- Gatesoupe, F. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1): 147–165. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00187-8
- Gatesoupe, F.J. (2007). Live yeasts in the gut: natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*, 267(1–4): 20-30. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.005
- Golnari, M., Bahrami, N., Milanian, Z., Rabbani Khorasgani, M., Asadollahi, M. A., Shafiei, R. y Fatemi, S. (2024). Isolation and characterization of novel *Bacillus* strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. *Scientific Reports*, 14(1): 1-11. doi: 10.1038/s41598-024-51823-z.

- Gómez, G.D., y Balcázar, J.L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2): 145-154. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x.
- Gómez-Gil, B., Roque, A. y Turnbull, J.F., (2000). The use and selection of probiotics bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 19(1): 259-270. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00431-2
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. y Tiedje, J.M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1): 81-91. doi: 10.1099/ij.s.0.64483-0.
- Grant, J., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E., Chen, C. y Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(1): 484-492. doi: 10.1093/nar/gkad326.
- Hagaggi, N. (2018). Biodegradation of cellulosic raw materials by extracellular carboxymethyl cellulase produced by *Exiguobacterium aurantiacum*. *Egyptian Journal of Experimental Biology*, 14(1): 11-18. doi: 10.5455/egyjebb.20170807070652.
- Hill, C., Krause, K., Lewis, S., Blais, J., Benton, B., Mammen, M., Humphrey, P., Kinana, A. y Janc J.W. (2010). Specificity of induction of the vanA and vanB operons in vancomycin-resistant enterococci by telavancin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7): 808-814. doi: 10.1128/AAC.01737-09.
- Hissen, K. L., He, W., Wu, G., y Criscitiello, M. F. (2023). Immunonutrition: facilitating mucosal immune response in teleost intestine with amino acids through oxidant-antioxidant balance. *Frontiers in Immunology*, 14(2): 1-18. doi:10.3389/fimmu.2023.1241615
- Horne, T., Orr, T., y Hall, J. (2023). How do interactions between mobile genetic elements affect horizontal gene transfer? *Current Opinion in Microbiology*, 73(10): doi: 10.1016/j.mib.2023.102282.
- Idrees, M., Imran, M., Atiq, N., Zahra, R., Abid, R., Alreshidi, M., Robert, T., Abdelgadir, A., Khalid, M., Farid, A., Olawale, O. y Ghazanfar, S. (2022). Probiotics, their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. *Frontiers in Nutrition*, 9(1): 1-12. doi: 10.3389/fnut.2022.959941
- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R. y García-Hernández, J. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2): 256-275. doi: 10.18781/r.mex.fit.1711-3.
- Kapsea, N., Engineera, A., Gowdamana, V., Wagheb, S. y Dhakephalkara, P.K. (2018). Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics*, 111(4): 921-929. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.05.022.
- Kasana, R.C. y Pandey, C.B. (2018). *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1): 141-156. doi: 10.1080/07388551.2017.1312273.
- Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9): 634-644. doi: 10.1038/nrmicro2405.
- Keerthana, P. y Illanjiam, S. (2024). Study on *Exiguobacterium acetylicum* ki3 strain pigment optimization and antibacterial activity. *Paripex Indian Journal of Research*, 13(5): 6-7. doi:10.36106/paripex/4003895.
- Kenny, F., Xu, J., Millar, B., McClurg, R. y Moore, J. (2006). Potential misidentification of a new *Exiguobacterium* sp. as *Oerskovia xanthineolytica* isolated from blood culture. *British Journal of Biomedical Science*, 63(2): 86-89. doi: 10.1080/09674845.2006.11732726.

- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(1): 1-14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.
- Kim, S., Jeon, H., Bai, S.C., Hur, J. W., y Han, H.S. (2022). Evaluation of *Salipiger thiooxidans* and *Exiguobacterium aestuarii* from the Saemangeum Reservoir as potential probiotics for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Microorganisms*, 10(6): 1-12. doi: 10.3390/microorganisms10061113.
- Larralde, M., Zeller, G. y Carroll, L.M. (2025). PyOrthoANI, PyFastANI, and Pyskani: a suite of Python libraries for computation of average nucleotide identity. *bioRxiv*, 1(1): 1-9. doi: 10.1101/2025.02.13.638148.
- Lathief, A. y Alphonsa, M.W. (2024). Bioactive potential of probiotic bacteria. A comprehensive review. *Food Science and Engineering*, 5(2): 391-403. doi: 10.37256/fse.5220244592.
- Lazado, C. y Caipang, C. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(1): 78-89. doi: 10.1016/j.fsi.2014.04.015.
- Lee, Y.R., Bang, W.Y., Baek, K.R., Kim, G.H., Kang, M.J., Yang, J. y Seo, S.O. (2022). Safety evaluation by phenotypic and genomic characterization of four *Lactobacilli* strains with probiotic properties. *Microorganisms*, 10(11): 1-12. doi: 10.3390/microorganisms10112218.
- Liu, F., Li, Y., He, W., Wang, W., Zheng, J. y Zhang, D. (2021). *Exiguobacterium algae* sp. nov. and *Exiguobacterium qingdaonense* sp. nov., two novel moderately halotolerant bacteria isolated from the coastal algae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 114(9): 1399-1406. doi: 10.1007/s10482-021-01594-8.
- Lindsey, R., Gladney, L., Huang, A., Griswold, T., Katz, L., Dinsmore, B., Im, M., Kucerova, Z., Smith, P., Lane, C. y Carleton, H.A. (2023). Rapid identification of enteric bacteria from whole genome sequences using average nucleotide identity metrics. *Frontiers in Microbiology*, 14(1): 1-9. doi: 10.3389/fmicb.2023.1225207.
- López-Marín, A. y Solís-Muñoz, J. (2024). Eficiencia de costos del sector acuícola: medición y evaluación mediante indicadores clave de rendimiento. *Cienciamatria*, 10(1): 935-955. doi: 10.35381/cm.v10i1.1303.
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana, Argentina. 850 p.
- Mandel, C., Sanchez, S., Monahan, C., Phuklia, W. y Omsland, A. (2024). Metabolism and physiology of pathogenic bacterial obligate intracellular parasites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14(2): 1-20. doi: 10.3389/fcimb.2024.1284701.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1): 10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- Martínez-Cruz, P., Ibáñez, A., Monroy, O. y Ramírez, H. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Notices*, 2(1)1-13: doi: 10.5402/2012/916845.
- McFarland, W. y Klontz, G. (1969). Anesthesia in fishes. *In Federation Proceedings*, 28(4): 1535-1540.
- Medema, M., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. y Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(2): 339-346. doi: 10.1093/nar/gkr466.
- Meng, X., Chang, Y.Q., Zhou, L.Y. y Du, Z.J. (2020). *Exiguobacterium flavidum* sp. nov., isolated from the red maple lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4): 2359-2365. doi: 10.1099/ijsem.0.004048.
- Misawa, N., Hirayama, K., Itoh, K., y Takahashi, E. (1995). Detection of alpha-and beta-hemolytic-like activity from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3): 729-731. doi: 10.1128/jcm.33.3.729-731.1995.

- Mishra, S., Dash, D., y Das, A.P. (2024). Microbial degradation of polyester microfibers using indigenously isolated bacterial strain *Exiguobacterium* Sp. *CLEAN–Soil Air Water*, 52(7): 1-13. doi: 10.1002/clen.202300343.
- Molina, M., Pérez, L. y Leiva, C. (2020). Characterization of filamentous flocs to predict sedimentation parameters using image analysis. *Journal of Sensors*, 12(1): 1-8. doi: 10.1155/2020/5248509.
- Murphy, S., Cole, S., Kaminski, A. M., Charo-Karisa, H., Basiita, R. K., McDougall, C., Kakwasha, K., Mulilo, T., Rajaratnam, S. y Mekki, W. (2024). A gendered conjoint analysis of tilapia trait preference rankings among urban consumers in Zambia: Evidence to inform genetic improvement programs. *Aquaculture*, 591(1): 1-12. doi:10.1016/j.aquaculture.2024.741110
- Murray, P., Rosenthal, K.S. y Pfaller, M.A. (2020). Medical Microbiology (8th ed.). Elsevier. 943 p.
- Ntiantiasi, N. y Lianou, A. (2023). Isolation and in vitro screening of the probiotic potential of microorganisms from fermented food products. *Frontiers in Industrial Microbiology*, 1(2): 125-137. doi: 10.3389/finmi.2023.1257483.
- O'Toole, G. y Wong, G.C. (2016). Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 30(1): 139-146. doi: 10.1016/j.mib.2016.02.004.
- Paul, B., Kavia Raj, K., Murali, T., y Satyamoorthy, K. (2020). Species-specific genomic sequences for classification of bacteria. *Computers in Biology and Medicine*, 123(1): 1-14. doi: 10.1016/j.compbiomed.2020.103874.
- Pavez, V., Pacheco, N., Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Álvarez, J., Zepeda, P. y Saavedra, C. (2023). Characterization of biofilm formation by *Exiguobacterium* strains in response to arsenic exposure. *Microbiology Spectrum*, 11(6): 1-19. doi: 10.1128/spectrum.02657-23.
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., y Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1): 1-7. doi: 10.1002/cpbi.102.
- Rashid, M.H. y Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9): 4885-4890. doi: 10.1073/pnas.060030097.
- Remonsellez, F., Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Aguilar, P., Fortt, J., Salinas, C. y Saavedra, C. (2018). Characterization and salt response in recurrent halotolerant *Exiguobacterium* sp. SH31 isolated from sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. *Frontiers in Microbiology*, 9(1): 1-17. doi: 10.3389/fmicb.2018.02228.
- Riccardi, N., Monticelli, J., Antonello, R.M., Di Lallo, G., Frezza, D., Luzzati, R., Di Bella, S. (2021). Therapeutic options for infections due to vanb genotype vancomycin-resistant enterococci. *Microbial Drug Resistance*, 27(4): 536-545. doi: 10.1089/MDR.2020.0171.
- Rincón-Rosales, R., Rogel, M., Rincón-Molina, C., Guerrero, G., Manzano-Gómez, L., López-López, A. y Martínez-Romero, E. (2023). Complete genome sequence of *Exiguobacterium profundum* TSS-3 isolated from an extremely saline-alkaline spring located in Ixtapa, Chiapas-México. *Microbiology Resource Announcements*, 12(9): 1-4. doi: 10.1128/MRA.00171-23.
- Rodrigues, D., Goris, J., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M. y Tiedje, J.M. (2006). Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles*, 10(4): 285-294. doi: 10.1007/s00792-005-0497-5.
- Rotsides, P., Maciunas, L., Paul, Lee., Nakoa, K., Webber., Joris, B. y Patrick, J. (2022). Elucidation of the antibiotic-sensing mechanism of vancomycin-resistant enterococci VanB. *The FASEB Journal*, 36(1): doi: 10.1096/fasebj.2022.36.S1.R5594.
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. y Morales, E. (2005). Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas*, 31(2): 349-355. doi: 10.7773/cm.v31i2.59.

- Sampathkumar, B., Tsougriani, E., Yu, L. y Khachatourians, G. (1998). A quantitative microtiter plate hemolysis assay for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety*, 18(3): 197-203. doi: 10.1111/j.1745-4565.1998.tb00214.x.
- Sanakal, R., y Kaliwal, B.B. (2011). Vancomycin resistance genes in various organisms-an Insilico study. *International Journal of Biometrics and Bioinformatics*, 5(2): 111-129.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14): 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Sepúlveda-Quiroz, C., Pérez-Jiménez, G., Maytorena-Verdugo, C., Álvarez-Villagómez, C., Mendoza-Porras, O., Peña-Marín, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., De la Rosa-García, S., Guerrero-Zárate, R., Pérez-Morales, A. y Álvarez-González, C. (2022). Canibalismo en organismos acuáticos: Un reto para la acuicultura comercial. En: Pérez-Morales, A., Galicia-Pérez, M.A. y Olivos-Ortiz, A. (eds), *Estudios marinos y pesqueros en el Pacífico Mexicano*. Universidad de Colima, Colima. pp. 61–81.
- Setiani, N.A., Octaviyani, W., Hamdani, S. y Mardiah, I. (2019). Studies on biosurfactant produced using *Exiguobacterium profundum*. *Acta Biochimica Indonesiana*, 2(2): 39-44. doi: 10.32889/actabioina.v2i2.37.
- Shen, L., Liu, Y., Chen, L., Lei, T., Ren, P., Ji, M., Song, W., Lin, W., Su, W., Wang, S., Rooman, M. y Pucci, F. (2024). Genomic basis of environmental adaptation in the widespread poly-extremophilic *Exiguobacterium* group. *The ISME Journal*, 18(1): 1-19. doi: 10.1093/ismejo/wrad020.
- Shipraadeep, S., Sahay, R., Ojha, S., Kundu, K. y Kundu, S. (2012). Development of probiotic candidate in combination with essential oils from medicinal plant and their effect on enteric pathogens: a review. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012(1): 1-6. doi: 10.1155/2012/457150.
- Singh, R., Kim, S., Kumari, A. y Kumar, P. (2022). An overview of microbial α -amylase and recent biotechnological developments. *Current Biotechnology*, 11(1): 11-26. doi: 10.2174/2211550111666220328141044.
- Skalka, B. y Votava, M. (1997). Hemolysis and hemolytic interactions of bacteria. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie*. 46(3): 87-98. PMID: 9471300
- Sonenshein, A.L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12): 917-927. doi: 10.1038/nrmicro1772.
- Soto-Rodríguez, S.A., Lozano-Olvera, R., Garcia-Gasca, M., Abad-Rosales, S., Gomez-Gil, B. y Ayala-Arellano, J. (2018). Virulence of the fish pathogen *Aeromonas dhakensis*: genes involved, characterization and histopathology of experimentally infected hybrid tilapia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129(2): 107-116. doi: 10.3354/dao03247.
- Sotomayor M. y Balcázar J.L. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *AquaTIC*, 19(2): 9-15.
- Srivastava, A., Srivastava, R., Sharma, A., Bharati, A.P., Tiwari, P., Singh, A.K. y Saxena, A. (2020). Pan-genome analysis of *Exiguobacterium* reveals species delineation and genomic similarity with *Exiguobacterium profundum* PHM 11. *Environmental Microbiology Reports*, 12(6): 639-650. doi: 10.1111/1758-2229.12890.
- Sun, Y., Ying Z., Xiaohan H., Xiaohan., Yongzheng, M. y Zhiguang N. (2023). A novel marine bacterium *Exiguobacterium marinum* a-1 isolated from in situ plastisphere for degradation of additive-free polypropylene. *Environmental Pollution*, 336(1): No. 122390. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122390.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L. y Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14): 6614-6624. doi: 10.1093/nar/gkw569.

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-671. doi: 10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000.
- Villamil, L. y Esguerra, D. (2017). *Enterococcus*, *Myroides* y *Exiguobacterium*: Géneros bacterianos con potencial probiótico para el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Biológica Colombiana*, 22(3): 331-339. doi:10.15446/abc.v22n3.59974.
- Vishnivetskaya, T.A., Kathariou, S., McGrath, J., Gilichinsky, D.A. y Tiedje, J.M. (2000). Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles*, 4(3): 165-173. doi: 10.1007/s007920070031.
- Vishnivetskaya, T.A. y Kathariou, S. (2005). Putative transposases conserved in *Exiguobacterium* isolates from ancient Siberian permafrost and from contemporary surface habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 6954-6962. doi: 10.1128/AEM.71.11.6954-6962.2005.
- Vishnivetskaya, T.A., Kathariou, S. y Tiedje, J.M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3): 541-555. DOI:10.1007/s00792-009-0243-5.
- Wang, L, Wang. G., Yi, Liu., Zhang, W., Zhang, H., Niu, L. y Habibul. N. (2022). Benthic biofilm bacterial communities and their linkage with water-soluble organic matter in effluent receivers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4): 10-19. doi: 10.3390/ijerph19041994.
- White, R.A., Grassa, C. J. y Suttle, C.A. (2013). Draft genome sequence of *Exiguobacterium pavilionensis* strain RW-2, with wide thermal, salinity, and pH tolerance, isolated from modern freshwater microbialites. *Genome Announcements*, 1(4): 10-12. doi: 10.1128/genomea.00597-13.
- White, R. A., Soles, S., Gavelis, G., Gosselin, E., Slater, G. F., Lim, D. S. y Suttle, C. (2019). The complete genome and physiological analysis of the eurythermal firmicute *Exiguobacterium chiriquhucha* strain RW2 isolated from a freshwater microbialite, widely adaptable to broad thermal, pH, and salinity ranges. *Frontiers in Microbiology*, 9(1): 30671032. doi: 10.3389/fmicb.2018.03189.
- Yang, J., Wang, C., Wu, J., Liu, L., Zhang, G. y Feng, J. (2014). Characterization of a multiresistant mosaic plasmid from a fish farm sediment *Exiguobacterium* sp. isolate reveals aggregation of functional clinic-associated antibiotic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4): 1482-1488. doi: 10.1128/AEM.03257-13.
- Zhang, Y. Shi, P. y Ma, J. (2013). *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 19(5): 898-904. doi: 10.3724/SP.J.1145.2013.00898.
- Zhang, P., Cao, S., Zou, T., Han, D., Liu, H., Jin, J., Yang, Y., Zhu, X., Xie, S. y Zhou, W. (2018). Effects of dietary yeast culture on growth performance, immune response and disease resistance of gibel carp. *Fish & Shellfish Immunology*, 82(1):400-407. doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.044.
- Zhang, D., Zhu, Z., Li, Y., Li, X., Guan, Z. y Zheng, J. (2021). Comparative genomics of *Exiguobacterium* reveals what makes a cosmopolitan bacterium. *Msystems*, 6(4): 10-18. doi: 10.1128/mSystems.00383-21.
- Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R. y Karthik, K. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: An update on their multiple modes of action: A review. *Veterinary Quarterly*, 36(4): 228-241. doi: 10.1080/01652176.2016.1172132.

ANEXO C. Cinética de crecimiento de *Exiguobacterium* sp. nov., en medio de cultivo TSB a 30°C. La columna "hora" indica el tiempo transcurrido en horas desde el inicio del experimento, mientras que la columna "UFC/mL" representa la concentración de unidades formadoras de colonias por mililitro en log10.

Hora	UFC/mL (Log10)
0	6.15439919
2	6.79491908
4	8.25369596
6	8.4117849
8	8.66845643
12	8.50306751
24	8.13068549
26	8.03680532