

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biologiako Gradua / Grado en Biología

Variación de la patogenicidad y de la resistencia a antibióticos en *Vibrio harveyi* a lo largo de su permanencia en agua de mar

Egilea/Autor/a:
Iván Irizar Pinto
Zuzendaria/Director/a:
Inés Arana Basabe
Zuzendarikide/Codirector/a:
Maite Orruño Beltrán



Índice

1	<u>Resumen</u>	3
2	<u>Abstract</u>	3
3	<u>Introducción</u>	4
3.1	<i>Vibrio harveyi</i>	4
3.2	Respuesta al estrés ambiental	4
3.3	Resistencia a antibióticos	5
3.4	<i>Galleria mellonella</i>	6
4	<u>Objetivos</u>	7
5	<u>Materiales y Métodos</u>	7
5.1	Cepa bacteriana y experiencias de supervivencia	7
5.1.1	Cuantificación de número de células totales	8
5.1.2	Cuantificación del número de células cultivables	8
5.1.3	Determinación de la longitud celular	8
5.1.4	Determinación de la patogenicidad	9
5.1.5	Resistencia a antibióticos	10
5.2	Tratamiento de datos	11
5.3	Comité de ética	11
6	<u>Resultados</u>	11
6.1	Idoneidad de las larvas según origen. Casas comerciales	11
6.2	Supervivencia de poblaciones de <i>V. harveyi</i> CECT 525 mantenidas a 12°C en condiciones de escasez de nutrientes	13
6.2.1	Variaciones en la patogenicidad determinada usando <i>G. mellonella</i> .	14
6.2.2	Resistencia a antibióticos	15
7	<u>Discusión</u>	17
8	<u>Conclusiones</u>	20
9	<u>Agradecimientos</u>	21
10	<u>Bibliografía</u>	21



1. Resumen

Vibrio harveyi es un patógeno de peces e invertebrados marinos con amplia distribución en sistemas marinos. En este trabajo se han analizado los cambios que experimenta *V. harveyi* CECT 525 durante 35 días de permanencia a 12°C en agua de mar (escasez de nutrientes). La cultivabilidad no varió, pero se detectó una reducción de tamaño y la adopción de una morfología cocoide. Mediante la utilización de larvas de *Galleria mellonella* como modelo animal, se registró una pérdida de patogenicidad progresiva durante el ensayo, pero no completa. También se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de 6 antibióticos para *V. harveyi* CECT 525. Además, se analizaron los cambios en los valores CMI y CMB durante la permanencia a 12°C en agua de mar, no mostrando cambios en los valores CMI y una tendencia a incrementar de los valores CMB.

2. Abstract

Vibrio harveyi is a pathogen of fish and marine invertebrates with a wide distribution in marine systems. In this work, changes experienced by *V. harveyi* CECT 525 during 35 days of permanence at 12°C in seawater (scarcity of nutrient) were analysed. Culturability did not change, but a reduction in size and the adoption of a coccoid morphology was detected. Using *Galleria mellonella* larvae as an animal model, a progressive but not complete loss of pathogenicity was recorded during the survival. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and bactericidal concentrations (MBC) for 6 antibiotics were also determined for *V. harveyi* CECT 525. In addition, changes in MIC and MBC values were analysed during the permanence at 12°C in seawater and no changes in MIC values and an increasing trend in MBC values were observed.

3. Introducción

3.3. *Vibrio harveyi*

V. harveyi es una bacteria Gram negativa que forma parte del género *Vibrio* (clase Gammaproteobacteria). Son organismos mesófilos, quimioorganotrofos con capacidad de fermentar. Requieren NaCl, por lo que se distribuyen especialmente en sistemas marinos con temperaturas entre 15°C y 30°C (Thompson *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2020). En estos ambientes, las bacterias del género *Vibrio* ayudan a completar el ciclo de carbono degradando compuestos como la quitina. (Zhang *et al.*, 2018). Se encuentran a lo largo de toda la columna de agua de forma libre o asociada a algún organismo eucariota como microalgas, macroalgas, vertebrados e invertebrados (Sampaio *et al.*, 2022).

Especies del género *Vibrio*, como *V. harveyi*, pueden ser patógenos o simbioses de diversos vertebrados e invertebrados. En simbiosis, forman parte de la microbiota del hospedador (Grimes, 2020). Pero también pueden ser patógenos (Austin y Zhang, 2006). Sus mecanismos de patogenicidad se basan principalmente en la producción de endotoxinas, hemolisinas, quitinasas, fosfolipasas y proteasas capaces de degradar proteínas como fibronectina, gelatina o colágeno (Teo *et al.*, 2003; Grimes, 2020). *V. harveyi* afecta a diversas especies animales como, por ejemplo, *Hippocampus kuda* (Xie *et al.*, 2020), *Litopenaeus vannamei* (Muthukrishnan *et al.*, 2019), o *Haliothis discus* (Wang *et al.*, 2018). Así, puede producir lesiones oculares y gástricas, necrosis muscular y aparición de úlceras en la piel en peces (Zhang *et al.*, 2020). *V. harveyi* tiene un efecto negativo a nivel económico en empresas de acuicultura que se benefician de la explotación de estas especies (Mohamad *et al.*, 2019; Tang y Reantaso, 2019). A pesar de que *V. harveyi* no se considera patógeno humano, se han notificado casos de infección a humanos en ambientes acuáticos (Brehm, 2020; Grimes, 2020).

3.2. Respuesta al estrés ambiental

Las bacterias son microorganismos con una extraordinaria capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales (Betancor *et al.*, 2008; Bodor *et al.*, 2020). Entre otras,

una de las respuestas al estrés ambiental más estudiada es la adopción del estado Viable No Cultivable (VNC) (Xu *et al.*, 1982). Se trata de un mecanismo de supervivencia que produce cambios fisiológicos en las bacterias manteniéndolas viables, pero sin capacidad de llevar a cabo la división celular (Roszak y Colwell, 1987). Por tanto, pierden la capacidad de crecer en medios de cultivo convencionales (Barcina y Arana, 2009; Ramamurthy *et al.*, 2014; Oliver, 2016). En este estado VNC, las células conservan actividad metabólica detectable (Oliver, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

Los principales factores ambientales, cuyas variaciones pueden inducir esta respuesta, son: la temperatura, la salinidad, el pH y la ausencia o escasez de nutrientes (Barcina y Arana, 2009; Oliver, 2016; Dong *et al.*, 2020).

El estado VNC lo adoptan tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluyendo 50 géneros diferentes, entre los que se encuentra el género *Vibrio* (Zhang *et al.*, 2021). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que *V. harveyi* expuesto a baja temperatura (4°C) en condiciones de escasez de nutrientes o expuesta a luz visible entra en el estado VNC (Parada *et al.*, 2016; Orruño *et al.*, 2017, 2019, 2021).

La escasez de nutrientes, además, promueve cambios morfológicos sin necesidad de la adopción del estado VNC. Estos cambios implican reducción del tamaño y adopción de morfología cocoide, que podría favorecer la captación de nutrientes debido a una mayor relación superficie-volumen (Chaiyanan *et al.*, 2001; Parada *et al.*, 2016; Orruño *et al.*, 2021) estando potenciados por otros factores ambientales (Orruño *et al.*, 2019, 2021). Además, se han descrito cambios a nivel transcriptómico y proteómico orientados a garantizar la supervivencia celular (Kaberdin *et al.*, 2015; Parada *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Orruño *et al.*, 2021).

3.3. Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es un problema creciente de interés global (Alós, 2015). Debido al uso masivo e indiscriminado de antibióticos, las bacterias se encuentran bajo una constante presión selectiva que favorece la aparición y la transferencia de genes de resistencia. En el

caso del *V. harveyi*, se han descrito resistencias a diferentes antibióticos, tanto en cepas ambientales como de colección (Nakayama *et al.*, 2006). Se ha descrito la aparición de vibrios multirresistentes en empresas de acuicultura debido a un uso desmedido de antibióticos (Stalin y Srinivasan, 2016; Matamp y Bhat, 2019).

3.4. *Galleria mellonella*

Se ha propuesto a *G. mellonella* (en estado larvario) como modelo animal alternativo para estudios de patogenicidad *in vivo*, tanto para bacterias Gram positivas y Gram negativas, como para virus y hongos (Funch *et al.*, 2010; Jeon y Yong, 2019; Tao *et al.*, 2021; Asai *et al.*, 2023; Serrano *et al.*, 2023). Además, ha sido ampliamente utilizada para determinar la virulencia de diferentes vibrios, como *V. cholerae* (McMillan *et al.*, 2015) o *V. anguillarum* (Nuidate *et al.*, 2016).

G. mellonella posee un sistema inmune notablemente similar al de los vertebrados (Mowlds, 2008). La respuesta celular está protagonizada por hemocitos con función fagocítica, coagulativa y de encapsulación (Pereira *et al.*, 2018); la respuesta humoral, en cambio, está caracterizada por la acción de moléculas efectoras inductoras de proteínas del complemento, melanina y péptidos antimicrobianos (Wojda, 2017).

Por otra parte, se pueden obtener, fácilmente y de forma barata, grandes cantidades de larvas de *G. mellonella*. Trabajar con ellas es simple y no requiere un material especializado (Pereira *et al.*, 2020). Además, su corto ciclo de vida hace que sea un modelo animal ideal para estudios a gran escala (Tsai *et al.*, 2016). Otra de sus ventajas es que se puede mantener a 37°C, lo cual permite realizar estudios de patogenicidad en condiciones similares al cuerpo de los mamíferos, pero sin entrar en cuestiones éticas (Dinh *et al.*, 2021). Como invertebrado, *G. mellonella* no está incluido en la legislación sobre bienestar animal ni en las directrices éticas (Graham y Prescott 2015; Hubrecht y Carter 2019).

En un trabajo previo realizado con *V. harveyi*, Ezcurra (2022) estandarizó el uso de *G. mellonella*, estableciendo el tamaño y la dieta óptimos para los ensayos de patogenicidad y también determinó la densidad óptima de bacterias a inocular en las larvas.

4. Objetivos

El objetivo de este trabajo es determinar los cambios que experimenta *Vibrio harveyi* CECT 525 durante su permanencia a 12°C en agua de mar (condiciones de escasez de nutrientes). Se analizaron los cambios en la integridad y la cultivabilidad, en la morfología celular, en la patogenicidad y en la resistencia a antibióticos durante 35 días.

5. Materiales y métodos

5.1. Cepa bacteriana y experiencias de supervivencia

El microorganismo utilizado en este estudio fue *Vibrio harveyi* CECT 525 de la Colección Española de Cultivos Tipo. La cepa se conservó en criobolas Pro-lab Diagnostics® Microbank™ mantenidas a -80°C. Para la obtención de los inóculos se introdujo una criobola en un tubo con 10 mL de Caldo Marino (CM, Sigma Aldrich) que se incubó en oscuridad y con agitación (90 rpm) a 26°C durante 24 h. Posteriormente, 100 µL de este cultivo se transfirieron a un matraz con 50 mL de CM que se volvió a incubar en las mismas condiciones (oscuridad, 90 rpm y 26°C) durante 24 h. Tras alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación (15 minutos, 4.000 rpm). La pastilla obtenida se resuspendió en Solución Salina Estéril (SSE) (NaCl 1,94% [p/v]) y se centrifugó de nuevo en las condiciones indicadas. Finalmente, la nueva pastilla obtenida se resuspendió en 10 mL de SSE.

Matraces de 500 mL se llenaron con 250 mL de agua de mar estéril (AME). El agua de mar se recogió en Plentzia (Bizkaia, 43°24'40"N 2°56'46"O) y se sometió a filtración seriada con filtros de membrana de mezcla de ésteres (Merck Millipore) con diámetros de poro de diferentes tamaños (8; 8,0; 0,45; 0,22 µm). A continuación, los matraces se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 minutos. Los matraces se inocularon hasta una densidad final de 5×10^7 *V. harveyi*/mL y se incubaron durante 35 días a 12°C en oscuridad y con agitación (90 rpm). La temperatura se seleccionó al ser la temperatura media de las aguas superficiales en época fría en el Golfo de Bizkaia (Baña, 2021).

Periódicamente se recogieron alícuotas para la determinación de los números de células totales y cultivables y de la longitud celular media. También se realizaron ensayos de patogenicidad inoculando un modelo animal y se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Bactericidas (CMB).

5.1.1. Cuantificación del número de células totales

Las células totales se cuantificaron de acuerdo con Hobbie *et al.* (1977). Las alícuotas recogidas y fijadas con formaldehído (concentración final 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) se tiñeron con naranja de acridina (0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Molecular Probes) durante 2 minutos. Las muestras teñidas se filtraron y se recogieron en membranas de policarbonato negras de 0,22 μm de diámetro de poro (GE OsmonicsTM). Los filtros se observaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400, equipado con un bloque de filtros B-2A (filtro de excitación EX450-490, espejo dicróico DM505 y filtro barrera BA520). Para cada alícuota se cuantificaron las células de 20 campos y se estimaron las células totales por mL.

5.1.2. Cuantificación del número de células cultivables

La cuantificación de células cultivables (Unidades Formadoras de Colonias, UFC/mL) se realizó mediante siembra en microgota de diluciones seriadas en Agar Marino (AM, Sigma Aldrich). Las placas se incubaron en oscuridad a 26°C durante 24 h.

5.1.3. Determinación de la longitud celular

La longitud celular se determinó de acuerdo con Massana *et al.* (1997), utilizando filtros preparados para la enumeración de bacterias totales. En estas preparaciones se capturaron imágenes utilizando una cámara de alta resolución Hamamatsau 2400 (Hamamatsu Photonics). Las imágenes se digitalizaron y se analizaron con el software Scion Image 1.62^a. Para cada alícuota se determinó la longitud de 200 células bacterianas y se estableció el valor medio de longitud y la correspondiente desviación estándar (DE)

5.1.4. Determinación de la patogenicidad

Para la determinación de patogenicidad se utilizó *Galleria mellonella* como modelo animal. Las larvas fueron suministradas por diferentes casas comerciales (Artroposfera, Bichosa, Reptimercado y TiendaGrillos), utilizándose finalmente las suministradas por Artroposfera.

Las larvas, una vez recepcionadas, se mantuvieron en los embalajes de envío con el alimento suministrado por el proveedor, en condiciones de oscuridad a 20°C, hasta su utilización.

Previamente a su utilización, las larvas se separaron en grupos de 16 larvas y se determinó el peso de cada grupo y, a partir del mismo, el peso por larva, y se mantuvieron en ayuno durante las 24 h previas a los ensayos (Ezcurra, 2022).

Para determinar la idoneidad de las larvas se tuvo en cuenta el estado de las mismas (melanización y actividad) y se realizaron dos controles. El primero de ellos, para determinar la muerte larvaria natural, se realizó manteniendo 16 larvas no manipuladas en las mismas condiciones que las del resto de los ensayos. El segundo, para descartar muerte larvaria por la manipulación y el proceso de inyección, se realizó inyectando 16 larvas con 10 µL de PBS ([Phosphate Buffered Saline, PBS], Glico™) (Ezcurra, 2022). La inyección se realizó vía intrahemocélica a través de la propata izquierda trasera (Asai *et al.*, 2019). Para ello, se utilizaron jeringas Hamilton 80366 701N (Sigma-Aldrich Ltd.) previamente sumergidas de forma seriada 5 veces en lejía (10%), otras 5 en etanol (100%) y, así sucesivamente, en agua destilada y en PBS. El agua destilada y el PBS fueron previamente filtrados a través de filtros de membranas de mezcla de ésteres de 0,22 µm de diámetro de poro (Merck Millipore) y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Además, se inocularon 16 larvas de cada casa comercial con una suspensión de 5×10^7 V. *harveyi*/mL. Se registró la muerte larvaria a 24 h y 48 h de incubación a 20°C en oscuridad. Las larvas se consideraron muertas si no mostraban respuesta motora tras estímulo táctil.

En las experiencias de supervivencia, se inyectaron 10 µL de alícuotas recogidas los días 0, 8, 15, 23 y 35 a grupos de 16 larvas. Se utilizaron dos controles negativos; para determinar la

muerte larvaria natural y descartar muerte larvaria por la manipulación y el proceso de inyección.

Tras la inyección, todos los grupos (control e infectados) se mantuvieron a 20°C, oscuridad y ayuno durante el periodo del ensayo. En los tiempos 24 h, 48 h, 72 h y 96 h se registró la muerte larvaria.

5.1.5. Resistencia a antibióticos

Los días 0, 8, 15, 23, 29 y 35 de supervivencia se recogieron alícuotas para la determinación de los valores de CMI y CMB (CLSI, 2006) para 6 antibióticos escogidos considerando sus estructuras y espectros de acción (ciprofloxacino [fluoroquinolona], cloranfenicol [anfencol], eritromicina [macrólido], gentamicina [aminoglucósido], rifampicina [rifamicina] y tetraciclina [tetraciclina]). Las CMI y CMB se determinaron en placas de cultivo celular (8x12 de 200 µL, Greiner bio-one). Se añadieron 100 µL de CM 2X en los pocillos iniciales y 100 µL de CM en el resto. En los pocillos iniciales se añadieron 100 µL de soluciones de antibióticos (concentración máxima 2X) (Tabla 1) y se realizaron diluciones seriadas de los mismos en los pocillos siguientes. A continuación, se añadieron 100 µL de la suspensión bacteriana (densidad final 10⁵ vibrios/mL) a cada pocillo con antibiótico.

Tabla 1. Concentraciones mínimas y máximas de antibióticos utilizados en los ensayos de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).

Antibiótico	Concentración mínima (µg/mL)	Concentración máxima (µg/mL)
Ciprofloxacino	0,156	20
Cloranfenicol	0,0625	8
Eritromicina	0,9375	120
Gentamicina	2,5	320
Rifampicina	0,78125	100
Tetraciclina	11,25	1440

Tras incubar 24 h a 26°C, se determinaron los pocillos con crecimiento bacteriano (turbidez). Los valores de CMI para cada antibiótico corresponden a la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Para la determinación de los valores de CMB, 10 µL de cada pocillo en los que no se observó crecimiento se sembraron en AM. Las placas se incubaron durante 24 h a 26°C y se determinó el crecimiento en ausencia de antibiótico.

5.2. Tratamiento de datos

Las experiencias de supervivencia se realizaron por triplicado. Las densidades celulares se transformaron en logaritmos decimales y se calculó la media aritmética y desviación estándar entre las diferentes réplicas. El análisis de los datos se realizó mediante el software Microsoft Excel 2016. Para determinar cambios en la patogenicidad entre las diferentes réplicas, se realizaron curvas Kaplan-Meier utilizando el software GraphPad 2022 y test estadístico Log-rank (Mantel-Cox).

5.3. Comité de Ética

Este estudio se ha realizado en el marco del proyecto M30_2021_164_ARANA BASABE, que cuenta con el informe favorable del Comité de Ética en la Investigación con Agentes Biológicos y Organismos Modificados Genéticamente (CEIAB) de la UPV/EHU.

6. Resultados

6.1. Idoneidad de las larvas según origen. Casas comerciales

Las larvas suministradas por las 4 casas comerciales analizadas en la comparativa (Artroposfera, Bichosa, Reptimercado y TiendaGrillos), mostraron una reducida melanización, signo de salud en las larvas. Sin embargo, presentaron características diferentes en cuanto a tamaño, actividad y resistencia al estrés de la manipulación. Ezcurra (2022)

propuso clasificar las larvas en 3 rangos: *grandes* ($261 \pm 25,31$ mg), *medianas* ($172 \pm 16,20$ mg) y *pequeñas* ($103 \pm 15,51$ mg). Atendiendo a esta clasificación, Bichosa y TiendaGrillos suministraron larvas *medianas* y *grandes*. En el caso de Artroposfera las larvas se consideraron en el grupo de *grandes*. Reptimercado suministró larvas de los 3 rangos (Tabla 2).

Tabla 2. Pesos medios de los grupos de larvas de *Galleria mellonella* (16 larvas/grupo) suministradas por Artroposfera, Bichosa, Reptimercado y TiendaGrillos, separadas en *grandes* ($>261 \pm 25,31$ mg), *medianas* ($172 \pm 16,20$ mg) y *pequeñas* ($<103 \pm 15,51$ mg) (Ezciurra, 2022).

Rangos	Peso medio por larva (mg)			
	Artroposfera	Bichosa	Reptimercado	TiendaGrillos
<i>Grandes</i>	307,2	349,8	261,0	341,4
<i>Medianas</i>	-	-	172,0	198,2
<i>Pequeñas</i>	-	-	103,0	-

En cuanto a la actividad, las larvas de Bichosa y TiendaGrillos presentaron movilidad muy reducida. En cambio, Artroposfera y Reptimercado proporcionaron larvas con gran actividad.

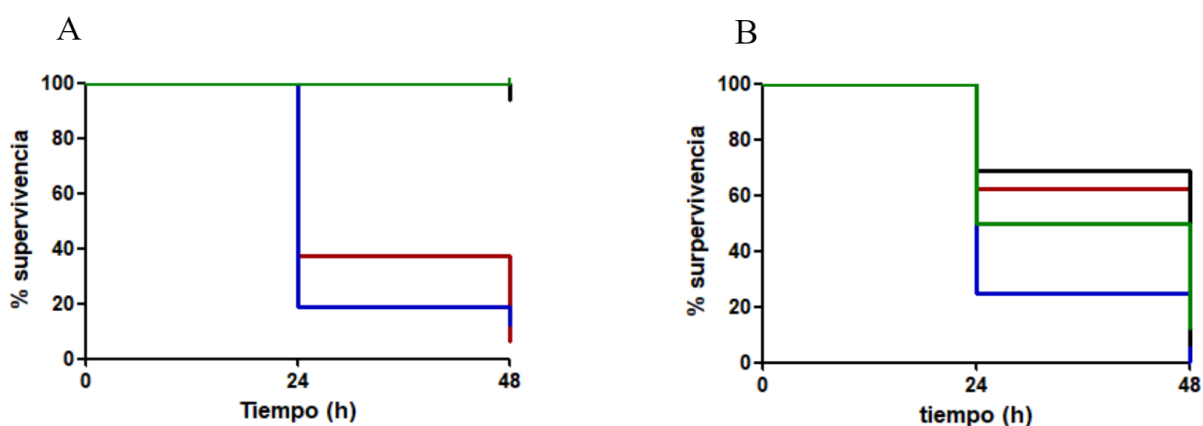


Figura 1. Porcentajes de supervivencia en larvas de *Galleria mellonella* suministradas por Artroposfera (—), Bichosa (—), Reptimercado (—) y TiendaGrillos (—) inoculadas con PBS (A) y suspensión de *V. harveyi* (B).

Tras inocular con PBS (Figura 1A) y alícuotas de *V. harveyi* CECT 525 (Figura 1B), se detectaron diferencias en la resistencia al estrés por manipulación entre las larvas

suministradas por las diferentes empresas. En el ensayo con PBS, la supervivencia larvaria a las 48 h fue del 6,25%, 12,50%, 93.75% y 100% para las larvas suministradas por Bichosa, TiendaGrillos, Artroposfera y Reptimercado, respectivamente (Figura 1A).

6.2. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525 mantenidas a 12°C en condiciones de escasez de nutrientes

A lo largo de las experiencias de supervivencia, las poblaciones de *V. harveyi* CECT 525 mantuvieron prácticamente constantes los números de células totales y cultivables (Figura 2).

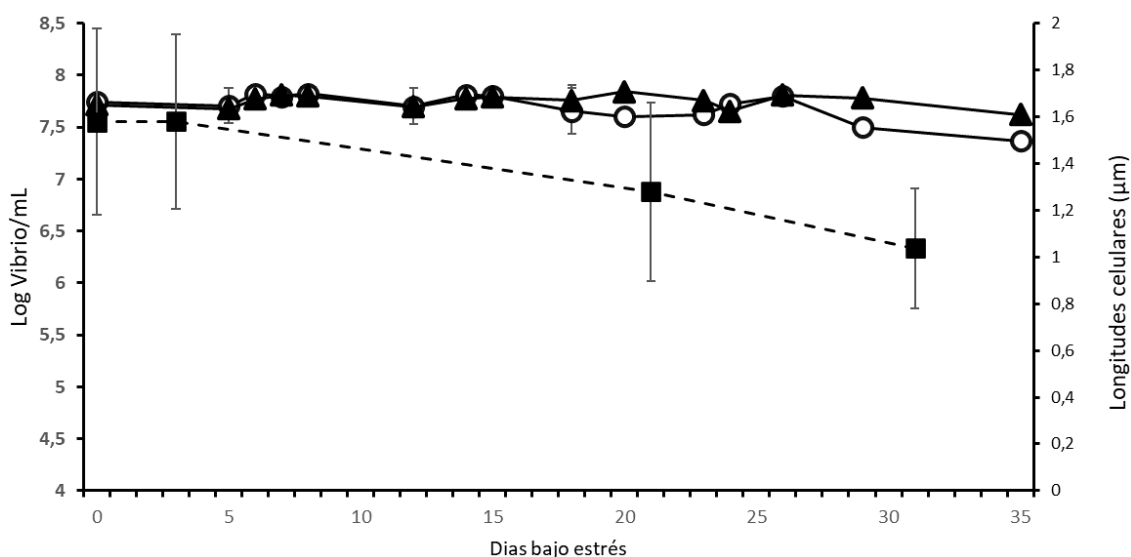


Figura 2. Variación de las densidades (\pm DE) de células totales (▲) y cultivables (○), y de longitudes celulares medias (\pm DE) (■) a lo largo de 35 días de permanencia de *V. harveyi* CECT 525 a 12°C en agua de mar estéril.

Si bien se mantuvo la integridad celular a lo largo de los ensayos, se observaron cambios morfológicos durante los primeros 6 días de permanencia en agua de mar estéril. Las células de *V. harveyi* adoptaron una morfología cocoide (Figuras 2 y 3) reduciendo su longitud celular de 1,58 (\pm 0,40) μ m a 1,04 (\pm 0,24) μ m al cabo de 31 días (Figura 2).

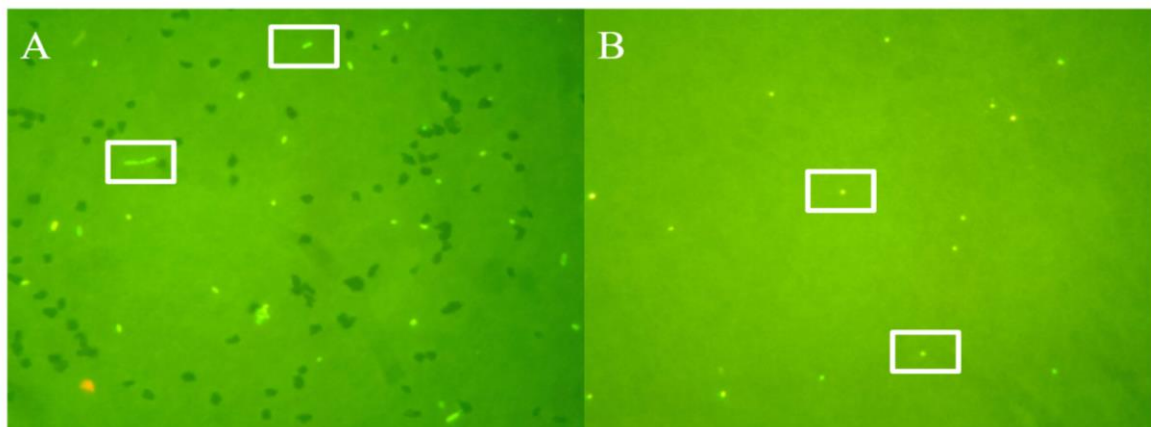


Figura 3. Imágenes de preparaciones correspondientes a día 0 (A) y día 6 (B) obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia.

6.2.1. Variaciones en la patogenicidad determinada usando *G. mellonella*.

En la Figura 4 se muestran los porcentajes de supervivencia de larvas suministradas por Artroposfera e inoculadas con poblaciones de *V. harveyi* mantenidas a 12°C AME. La muerte larvaria disminuyó a medida que aumentó el tiempo de permanencia de *V. harveyi* bajo condiciones de estrés (Figura 4). En todos los casos se registró el pico de muerte larvaria 48 h después de la infección. La supervivencia larvaria varió con el tiempo de recogida de la alícuota y con el tiempo de incubación de las larvas infectadas (48 h vs 96 h) (Tabla 3).

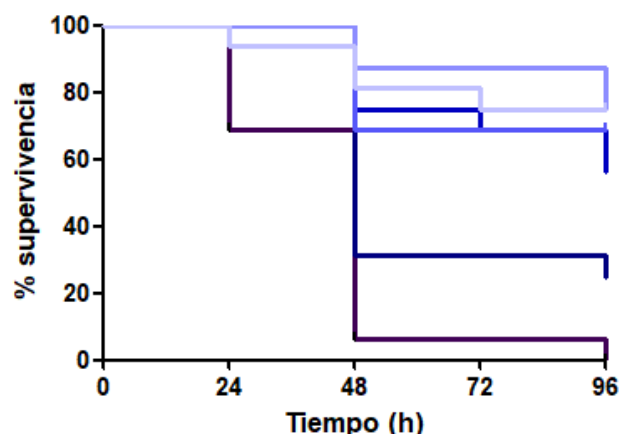


Figura 4. Porcentajes de supervivencia de *Galleria mellonella* inoculada con alícuotas de *V. harveyi* CECT 525 recogidas los días 0 (—), 8(—), 15(—), 23(—), 29 (—) y 35(—) de las experiencias de supervivencia.

Tabla 3. Porcentajes de supervivencia de *Galleria mellonella* a 48 h y 96 h tras ser inoculadas con alícuotas de *V. harveyi* CECT 525 recogidas los días 0, 8, 15, 23, 29 y 35 de las experiencias de supervivencia.

Días de recogida alícuotas de <i>V. harveyi</i>	% larvas supervivientes tras la infección	
	48 h	96 h
0	6,25	0
8	31,25	20,00
15	75,00	56,25
23	68,75	68,75
29	87,50	75,00
35	81,25	75,00

6.2.2. Resistencia a antibióticos

Los valores CMI para cada antibiótico obtenidos a lo largo de la permanencia de *V. harveyi* en AME no variaron a lo largo de la supervivencia (Tabla 4).

Tabla 4. Valores CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525 obtenidas a lo largo de su permanencia en agua de mar estéril a 12°C.

Antibiótico	CMI (µg/mL)					
	Origen de las alícuotas (día de supervivencia)					
	0	8	15	23	29	35
Ciprofloxacino	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
Cloranfenicol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eritromicina	>120	120	120	>120	>120	>120
Gentamicina	40	20	20	20	20	20
Rifampicina	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Tetraciclina	360	180	180	180	180	180

Los valores CMB obtenidos se muestran en la Tabla 5. Los valores de CMB fueron superiores a los valores CMI (Tabla 4). Los antibióticos probados, con excepción de la eritromicina para la cual las concentraciones testadas fueron insuficientes para determinar CMI y CMB, indican un efecto bactericida. Además, el incremento de los valores CMB (Tabla 5) indican un incremento de la resistencia al efecto bactericida del cloranfenicol y gentamicina tras la permanencia de *V. harveyi* CECT 525 en AME a 12°C. Sin embargo, los valores de CMB para ciprofloxacino, rifampicina y tetraciclina no variaron.

Tabla 5. Valores CMB (Concentración Mínima Bactericida) de poblaciones *V. harveyi* CECT 525 a lo largo de su permanencia en agua de mar estéril a 12°C.

CMB (µg/mL)						
Antibiótico	Origen de las alícuotas (día de supervivencia)					
	0	8	15	23	29	35
Ciprofloxacino	20	20	20	>20	20	>20
Cloranfenicol	2	4	8	4	8	4
Eritromicina	>120	120	120	>120	>120	>120
Gentamicina	160	160	320	>320	>320	>320
Rifampicina	25	50	50	50	50	50
Tetraciclina	1440	>1440	1440	>1440	>1440	>1440

7. Discusión

La fiabilidad de los resultados obtenidos utilizando la larva de *G. mellonella* como modelo animal dependerá de la calidad del modelo en cuanto a actividad, melanización y tolerancia a manipulación. En estos ensayos, los datos se basan en el número de muertes larvarias, por lo que la utilización de larvas no saludables puede llevar a una sobreestimación de la capacidad patogénica del microorganismo a estudio (Champion *et al.*, 2018). Por lo que interesa trabajar con larvas de calidad.

Las larvas obtenidas de Bichosa y TiendaGrillos no se consideraron válidas para determinar la capacidad patogénica de nuestro microorganismo. Aunque presentaron una melanización reducida, mostraron una actividad insuficiente y mala tolerancia a la manipulación y al ayuno. Además, la inoculación con PBS como control del impacto por manipulación, provocó, ya a las 48 h, una elevada mortalidad (6,25% y 12,5% de supervivientes en las larvas suministradas por Bichosa y TiendaGrillos, respectivamente) (Figura 1A). Estos porcentajes eran similares a los obtenidos tras la inoculación de *V. harveyi* CECT 525 (Figura 1B). Sin embargo, las larvas obtenidas de Artroposfera y Reptimercado mostraron ser adecuadas para su uso. Presentaron una elevada actividad y correcta resistencia al estrés por manipulación. Además de tolerar las 24 h de ayuno, la supervivencia tras la inoculación con PBS fue elevada (Figura 1A). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ezcurra (2022) que empleó larvas de Reptimercado para estudios similares.

Ezcurra (2022) no observó mortalidad empleando larvas *grandes* inoculadas con *V. harveyi* CECT 525 hasta las primeras 48 h tras la infección, aunque registró diferencias en la supervivencia de larvas *medianas* y *grandes*. Estos resultados coinciden con Andrea *et al.* (2019) quienes indicaron que la dosis letal mínima dependía del volumen de hemolinfa que contenía la larva, por lo que una larva con mayor tamaño mostraría una mayor resistencia a la infección. Así, Ezcurra (2022) concluyó que larvas en estados medios del ciclo larval (*medianas*) reflejan mejor la capacidad patogénica del microorganismo a estudio. En este estudio, inoculando densidades similares de *V. harveyi* CECT 525 en larvas *grandes*, suministradas por Artroposfera, se registró mortalidad en las primeras 24 h tras la inoculación (Figura 1B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Peleg *et al.* (2009) que emplearon larvas *grandes* (250 μ g - 350 μ g) en sus estudios con bacterias Gram negativas. Estas diferencias pueden atribuirse a las diferentes cepas de *G. mellonella* que se encuentran en el mercado.

Durante la permanencia de *V. harveyi* CECT 525 a 12°C en agua de mar estéril no se indujo pérdida de cultivabilidad (Figura 2). Este resultado difiere de los obtenidos por Orruño *et al.*, (2019) que en condiciones similares observaron un descenso de 1 log en la cultivabilidad de la cepa de colección *V. harveyi* CECT 525 tras 21 días de supervivencia. Ambos estudios

difieren en el origen de las muestras de agua de mar; agua recogida en Armintza (salinidad media, 37‰ [Orruño *et al.*, 2019]) o recogida en Plentzia (salinidad media, 33‰ [Eguiraun *et al.*, 2018]). Orruño *et al.* (2019) indicaron que la salinidad afecta a la supervivencia de *V. harveyi* CECT 525, siendo 30‰ la salinidad más adecuada para la permanencia en agua de mar artificial. Por otro lado, también difieren en el carbono orgánico disuelto; 0,11-0,12 mM en aguas de Armintza (Baña *et al.*, 2014) y 0,2 - 0,4 mM en aguas de Plentzia (Sáez *et al.*, 2009). Tanto la menor salinidad como la mayor concentración de nutrientes del agua utilizada en este estudio parecen favorecer la supervivencia de *V. harveyi*.

Diversos autores (Chaiyanan *et al.*, 2001; Falcioni *et al.*, 2008; Sun *et al.* 2008) asociaron la reducción de la longitud celular y adopción de morfología cocoide en *Vibrio* spp. con la entrada en estado viable no cultivable (VNC). No obstante, los resultados de este trabajo, junto con resultados previos obtenidos para el mismo microorganismo (Parada *et al.*, 2016; Orruño *et al.*, 2019, 2021; Ogayar, 2021), indican la independencia entre el fenotipo VNC y la adquisición de una morfología cocoide para *V. harveyi*. Estos cambios en la morfología de la célula se han considerado como una estrategia de supervivencia a fin de minimizar el gasto energético y mejorar la captación de nutrientes (Parada *et al.*, 2016; Orruño *et al.*, 2019, 2021; Ogayar, 2021). Estos resultados, indican que el cambio morfológico detectado en este trabajo estaría relacionado con la escasez de nutrientes y no con la permanencia a 12°C.

Durante la permanencia en agua de mar a 12°C, *V. harveyi* CECT 525 experimentó variaciones en su capacidad patogénica (Figura 4). A medida que aumentó el tiempo de permanencia en condiciones de estrés, la capacidad patogénica disminuyó progresivamente, sin detectarse pérdida completa tras 35 días de experimentación. Ezcurra (2022), tras 21 días de permanencia de *V. harveyi* CECT 525 a 4°C en agua de mar, observó una pérdida completa de patogenicidad. Almaraz (comunicación personal) no detectó variación en la patogenicidad durante la permanencia de *V. harveyi* CECT 525 en agua de mar a 20°C. Estos resultados indican una mayor pérdida de capacidad patogénica a medida que disminuye la temperatura de realización de las experiencias de supervivencia. Estos resultados se relacionarían con las diferencias observadas en los cambios proteómicos y transcriptómicos que experimenta *V. harveyi* CECT 525 a diferentes temperaturas de exposición y que se relacionan con un

mantenimiento de la cultivabilidad por efecto del incremento de la temperatura (Montánchez *et al.*, 2014, 2019; Kaberdin *et al.*, 2015; Parada *et al.*, 2016; Orruño *et al.*, 2019, 2021)

Se determinaron valores de CMI y CMB para 6 familias de antibióticos que difieren en sus espectros de acción. Ciprofloxacino, una fluoroquinolona, inhibe la división celular por el bloqueo de la transcripción de la enzima DNA-girasa (Patricelli *et al.*, 2016). Los valores CMI obtenidos en este trabajo para *V. harveyi* (0,625 µg/mL) fueron similares a los obtenidos por Zanetti (2001) para *V. alginolyticus* (0,5 µg/mL), y superiores para los obtenidos para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (0,25 µg/mL) expuestos a ciprofloxacino. El cloranfenicol (familia de anfenicoles) y la eritromicina (macrólidos) actúan inhibiendo la síntesis proteica por unión a las subunidades ribosomales 50S (Arévalo, 1986; Matínez, 2006). La gentamicina y la tetraciclina (familias de aminoglucósidos y tetraciclinas, respectivamente) inhiben la síntesis proteica por unión a las subunidades ribosomales 30S (Barquero, 1979; Pérez-Trallero, 2003). De acuerdo con Olcina (2008), la rifampicina (familia rifamicinas) inhibe la transcripción de la subunidad β de la proteína DNA-polimerasa RNA dependiente.

Para los antibióticos analizados, exceptuando eritromicina cuyos valores de CMI y CMB deben ser revisados, el valor CMB fue superior al valor CMI, sugiriendo una acción bacteriostática en *V. harveyi* por parte de ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, y rifampicina.

Diversos autores (Xu *et al.*, 2001; Drenkard, 2003; Poole, 2012) indican que, en periodos de escasez de nutrientes, las bacterias experimentan variaciones en su patrón de resistencia a antibióticos. Diversos estudios indican que el estrés por escasez de nutrientes provoca un incremento de la resistencia a antibióticos en bacterias como *Escherichia coli* (Wang *et al.*, 2020, 2021), *Pseudomonas aeruginosa* (Nguyen *et al.*, 2011) o *Staphylococcus aureus* (Xu *et al.*, 2020). Sin embargo, también se ha indicado el efecto contrario sobre la resistencia tras largos periodos de escasez de nutrientes para *E. coli* (Griffiths *et al.*, 1990). En este estudio, *V. harveyi* CECT 525, tras 35 días de permanencia a 12°C en condiciones escasez de nutrientes, no varió su patrón de resistencias ni las dosis bacteriostáticas para ciprofloxacino, rifampicina y tetraciclina. En el caso de cloranfenicol y gentamicina incremento el rango de concentraciones bacteriostáticas.

8. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se concluye que:

1. Es preciso seleccionar las casas comerciales suministradoras de *G. mellonella* con el fin de obtener unos resultados fiables. En este trabajo, las larvas suministradas por Artroposfera fueron idóneas.
2. Durante la permanencia a 12°C en agua de mar estéril, *V. harveyi* CECT 525 no perdió cultivabilidad y experimentó una reducción de su longitud celular acompañada de la adopción de morfología cocoide.
3. *V. harveyi* CECT 525 disminuyó su capacidad patogénica durante la permanencia a 12°C en agua de mar estéril.
4. El patrón de resistencias a los antibióticos testados no se alteró en condiciones de escasez de nutrientes.

9. Agradecimientos

Agradecer a Arkaitz Almaraz su ayuda a lo largo de todo el trabajo experimental.

También, me gustaría dar las gracias a Laura y mis padres por su constante apoyo, además de un especial agradecimiento a mis abuelos Paco y Odu por su constante interés en el desarrollo de este trabajo.

10. Bibliografía

- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10), 692-699.
- Andrea, A., Krogfelt, K. A., & Jenssen, H. (2019). Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery. *Microorganisms*, 7(3), 85.



- Arévalo, M. A. A. (1986). Modo de acción de eritromicina bases moleculares de su interacción con el ribosoma bacteriano (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid).
- Asai, M., Li, Y., Newton, S. M., Robertson, B. D., & Langford, P. R. (2023). *Galleria mellonella*–intracellular bacteria pathogen infection models: the ins and outs. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(2), fuad011.
- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 119-124.
- Barcina, I., & Arana, I. (2009). The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 8, 245-255.
- Barquero, M., Fernández, J., Valía Hernández, G., & Marice Rodríguez, E. (1979). Aminoglicósidos. *Acta Médica. Costarricense*, 22 (4), 1979-2339.
- Baña, Z., Ayo, B., Marrasé, C., Gasol, J. M., & Iriberry, J. (2014). Changes in bacterial metabolism as a response to dissolved organic matter modification during protozoan grazing in coastal Cantabrian and Mediterranean waters. *Environmental Microbiology*, 16(2), 498-511.
- Baña, Z. (2021). Variabilidad de la eficiencia de crecimiento bacteriana en sistemas marinos costeros. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Betancor, L., Gadea, M. and Flores, K. (2008). Genética bacteriana. *Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELMAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3ra Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR*, 65-90.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Kis, Á. E., Laczi, K., Bende, G., ... Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 1-22.
- Brehm, T. T., Berneking, L., Rohde, H., Chistner, M., Schlickewei, C., Martins, M. S., & Schmiedel, S. (2020). Wound infection with *Vibrio harveyi* following a traumatic leg amputation after a motorboat propeller injury in Mallorca, Spain: a case report and review of literature. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1-7.
- Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Huq, A., Maugel, T., & Colwell, R. R. (2001). Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), 331-341.
- Champion, O. L., Titball, R. W., & Bates, S. (2018). Standardization of *G. mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. *Journal of Fungi*, 4(3), 108.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI document M100-S216. Wayne, 2006. Revisado Marzo 2023
- Dinh, H., Semenec, L., Kumar, S. S., Short, F. L., & Cain, A. K. (2021). Microbiology's next top model: *Galleria* in the molecular age. *Pathogens and Disease*, 79(2), ftab006.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 149-183.



- Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and infection*, 5(13), 1213-1219.
- Eguiraun, H., Casquero, O., Sørensen, A. J., & Martinez, I. (2018). Reducing the number of individuals to monitor shoaling fish systems – Application of the Shannon entropy to construct a biological warning system model. *Frontiers in Physiology*, 9, 493.
- Ezcurra, E. (2022). Estudio en *Galleria mellonella* de la patogenicidad de *Vibrio harveyi* sometido a escasez de nutrientes y baja temperatura. Trabajo de Fin de Grado. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Falcioni, T., Papa, S., Campana, R., Manti, A., Battistelli, M., & Baffone, W. (2008). State transitions of *Vibrio parahaemolyticus* VBNC cells evaluated by flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 74(5), 272-281.
- Fuchs, B. B., O'Brien, E., El Khoury, J. B., & Mylonakis, E. (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1(6), 475-482.
- Graham, M.L. and Prescott, M.J. (2015). The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. *European Journal of Pharmacology*, 759, 19-29.
- Griffiths, R. P., Moyer, C. L., Caldwell, B. A., Ye, C., & Morita, R. Y. (1990). Long-term starvation-induced loss of antibiotic resistance in bacteria. *Microbial Ecology*, 251-257.
- Grimes, D. (2020). The Vibrios: scavengers, symbionts, and pathogens from the sea. *Microbial Ecology*, 80(3), 501-506.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J., & Jasper, S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1225-1228.
- Hubrecht, R.C. and Carter, E. (2019). The 3Rs and humane experimental technique: implementing change. *Animals*, 9(10), 754.
- Jeon, J., & Yong, D. (2019). Two novel bacteriophages improve survival in *Galleria mellonella* infection and mouse acute pneumonia models infected with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(9), 02900-18.
- Kaberdin, V. R., Montánchez, I., Parada, C., Orruño, M., Arana, I., & Barcina, I. (2015). Unveiling the metabolic pathways associated with the adaptive reduction of cell size during *Vibrio harveyi* persistence in seawater microcosms. *Microbial Ecology*, 70, 689-700.
- Liu, X., Gao, X., Chen, N., Zhang, Y., Li, X., Zhang, Y., & Zhang, X. (2019). Transcriptional response to starvation of pathogenic *Vibrio harveyi* strain DY1. *Journal of Oceanology and Limnology*, 38, 579-587.
- Martínez, L. O. V. (2006). Cloranfenicol: un aliado olvidado, revisión bibliográfica. *Medicina*, 11(3), 237-243.
- Massana, R., Gasol, J. M., Bjørnsen, P. K., Blackburn, N., Hagström, Å., Hietanen, S., ... & Pedrós-Alió, C. (1997). Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Scientia Marina*, 61 (3): 397-407.



- Matamp, N., & Bhat, S. G. (2019). Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: current status of research and challenges ahead. *Microorganisms*, 7(3), 84.
- McMillan, S., Verner-Jeffreys, D., Weeks, J., Austin, B., & Desbois, A. P. (2015). Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*. *BMC Microbiology*, 15(1), 1-10.
- Meylaers, K., Freitak, D., & Schoofs, L. (2007). Immunocompetence of *Galleria mellonella*: sex-and stage-specific differences and the physiological cost of mounting an immune response during metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*, 53(2), 146-156.
- Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Saad, M. Z., Nasruddin, N. S., Alsaari, N., ... Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512, 734289.
- Montánchez, I., Arana, I., Parada, C., Garaizabal, I., Orruno, M., Barcina, I., & Kaberdin, V. R. (2014). Reprogramming of *Vibrio harveyi* gene expression during adaptation in cold seawater. *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 193-203.
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., Codina, A. E., Garrido, J. G., Orruño, M., & Kaberdin, V. R. (2019). Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Mowlds, P., Barron, A. & Kavanagh, K. (2008). Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes and Infection*, 10(6), 628-634.
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Salwany, M. Y. I., Yusoff, F. M., Shariff, M., Ismail, S. I., & Natrah, I. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture*, 511, 734227.
- Nakayama, T., Ito, E., Nomura, N., Nomura, N., & Matsumura, M. (2006). Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 258(2), 194-199.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., ... & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334(6058), 982-986.d
- Nuidate, T., Tansila, N., Saengkerdsub, S., Kongreung, J., Bakkiyaraj, D., & Uddhakul, V. (2016). Role of indole production on virulence of *Vibrio cholerae* using *Galleria mellonella* larvae model. *Indian Journal of Microbiology*, 56, 368-374.
- Ogayar, E. (2021). Efecto del cambio climático en la costa vasca: presencia de bacterias del género *Vibrio* e influencia de los factores ambientales en su perdurabilidad. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Olcina, M. J. E. (2008). Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. *Antibióticos. Guía ABE*.
- Oliver, J. D. (2016). The viable but nonculturable state for bacteria: status update. *Microbe*, 11(4), 159-164.
- Orruño, M., Kaberdin, V. R., & Arana, I. (2017). Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio spp.*: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-



- resistance and persistence in adverse environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 45.
- Orruño, M., Parada, C., Ogayar, E., Kaberdin, V. R., & Arana, I. (2019). Effects of abiotic and biotic factors on *Vibrio harveyi* ATCC 14126T survival dynamics in seawater microcosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 83(2), 109-118.
 - Orruño, M., Parada, C., Kaberdin, V. R., & Arana, I. (2021). The effect of visible light on cell envelope subproteome during *Vibrio harveyi* survival at 20° C in seawater. *Microorganisms*, 9(3), 594.
 - Parada, C., Orruño, M., Kaberdin, V., Bravo, Z., Barcina, I., & Arana, I. (2016). Changes in the *Vibrio harveyi* cell envelope subproteome during permanence in cold seawater. *Microbial Ecology*, 72(3), 549-558.
 - Patricelli, P., Dell'Elce, A., Weidmann, C., Ramírez, E., Presa Rossa, C., Aguirre, M. S., ... & Formentini, E. (2016). Actividad antibacteriana in vitro de Ciprofloxacina sobre una cepa autóctona de *Escherichia coli*: Efecto del pH sobre su potencia y efecto de la persistencia bacteriana sobre su modo de acción. *Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias*, 15(1-2), 38-47.
 - Pereira, T. C., De Barros, P. P., Fugisaki, L. R. D. O., Rossoni, R. D., Ribeiro, F. D. C., De Menezes, R. T., ... & Scorzoni, L. (2018). Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *Journal of Fungi*, 4(4), 128.
 - Pereira, M.F., Rossi, C.C., da Silva, G.C., Rosa, J.N. and Bazzolli, D.M.S. (2020). *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathogens and Disease*, 78(8), ftaa056.
 - Poole, K. (2012). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069-2089.
 - Pérez-Trallero, E., & Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidás y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9), 520-529.
 - Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2, 103.
 - Roszak, D. B., & Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Reviews*, 51(3), 365-379.
 - Sampaio, A., Silva, V., Poeta, P., & Aunofriesie, F. (2022). *Vibrio* spp.: Life strategies, ecology, and risks in a changing environment. *Diversity*, 14(2), 97.
 - Serrano, I., Verdial, C., Tavares, L., & Oliveira, M. (2023). The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics*, 12(3), 505.
 - Stalin, N., & Srinivasan, P. (2016). Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Microbial Pathogenesis*, 97, 110-118.
 - Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X. H., Wang, R., Guo, Q., & Dong, Y. (2008). Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 37-44.
 - Sáez, L. A., Unanue, M., Latatu, A., Azua, I., Ayo, B., Artolozaga, I., & Iriberry, J. (2009). Changes in marina prokaryotic community induced by varying types of dissolved organic matter and subsequent grazing pressure. *Journal of Plankton Research*, 31(11), 1373-1383.

- Tang, K. F. J., & Reantaso, M. G. B. (2019). Impacts of acute hepatopancreatic necrosis disease on commercial shrimp aquaculture. *Revue Scientifique et Technique (International office of epizootics)*, 38(2), 477-490.
- Tang, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Gao, Y., Duan, Y., Zeng, T., & Zhou, S. (2022). Temporal dynamics of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in activated sludge upon exposure to starvation. *Science of The Total Environment*, 840, 156594.
- Tao, Y., Duma, L., & Rossez, Y. (2021). *Galleria mellonella* as a good model to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Pathogens*, 10(11), 1483.
- Teo, J. W., Zhang, L. H., & Poh, C. L. (2003). Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene*, 303, 147-156.
- Thompson, F. L., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431.
- Tsai, C. J. Y., Loh, J. M. S., & Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229.
- Wang, R. X., Yao, T., Liu, X. J., & Wang, J. Y. (2018). Isolation and characterisation of *Vibrio harveyi* as etiological agent of foot pustule disease in the abalone *Haliotis discus hannai* Ino 1953. *Indian Journal of Fisheries*, 65(1), 79–85.
- Wang, M., Chan, E. W. C., Yang, C., Chen, K., So, P. K., & Chen, S. (2020). N-acetyl-D-glucosamine acts as adjuvant that re-sensitizes starvation-induced antibiotic-tolerant population of *E. coli* to β -lactam. *Science*, 23(11), 101740.
- Wang, M., Chan, E. W. C., Wan, Y., Wong, M. H. Y., & Chen, S. (2021). Active maintenance of proton motive force mediates starvation-induced bacterial antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Communications biology*, 4(1), 1068.
- Wojda, I. (2017). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24(3), 342-357.
- Xie, J., Bu, L., Jin, S., Wang, X., Zhao, Q., Zhou, S., & Xu, Y. (2020). Outbreak of vibriosis caused by *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* in farmed seahorse *Hippocampus kuda* in China. *Aquaculture*, 523, 735168.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8, 313-323.
- Xu, K. D., Franklin, M. J., Park, C. H., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2001). Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 67-71.
- Xu, T., Wang, X., Meng, L., Zhu, M., Wu, J., Xu, Y., ... & Zhang, W. (2020). Magnesium links starvation-mediated antibiotic persistence to ATP. *Mosphere*, 5(1), e00862-19.
- Zanetti, S., Spanu, T., Deriu, A., Romano, L., Sechi, L. A., & Fadda, G. (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio spp.* isolated from the environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(5), 407-409.
- Zhang, X., Lin, H., Wang, X. et al. Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle—A review. *Science. China Earth Science*. 61, 1357–1368 (2018).



- Zhang, X. H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2(3), 231-245.
- Zhang, X. H., Ahmad, W., Zhu, X. Y., Chen, J., & Austin, B. (2021). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Marine Life Science & Technology*, 3(2), 189-203.
- Zhao, F., Wang, Y., An, H., Hao, Y., Hu, X., & Liao, X. (2016). New insights into the formation of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 induced by high-pressure CO₂. *Mbio*, 7(4), e00961-16.