

Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente



Informe Final del Proyecto

*“Empleo de bacterias luminiscentes para la detección
de xenobióticos en la zona costera cubana”*

2019

INDICE

I INTRODUCCIÓN.....	1
Zona de Muestreo.....	3
Aislamiento de bacterias luminiscentes.....	3
Mantenimiento y conservación de los aislados.....	4
Conservación de los aislamientos.....	4
Evaluación de métodos alternativos para la conservación de bacterias luminiscentes.....	4
Ubicación taxonómica de los aislados.....	5
Caracterización fisiológica.....	5
Caracterización molecular.....	5
Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia.....	7
Influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la luminiscencia.....	8
Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia.....	9
Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y la luminiscencia.....	9
Efecto de diferentes xenobióticos sobre la luminiscencia de los aislados.....	9
Cálculo de la EC50.....	10
Efecto de muestras naturales sobre la luminiscencia de los aislados.....	11
Procesamiento estadístico de los resultados.....	13
III. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	14
Aislamiento de bacterias luminiscentes.....	14
Evaluación de métodos alternativos para la conservación de bacterias luminiscentes.....	14
Ubicación taxonómica de los aislados.....	15
Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados.....	22
Influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la luminiscencia.....	24
Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados.....	27
Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados.....	30
Efecto de diferentes compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de los aislados.....	33
Efecto de muestras naturales sobre la luminiscencia de los aislados.....	40
IV. CONCLUSIONES.....	44
V. RECOMENDACIONES.....	45
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

Los ensayos de toxicidad que emplean bacterias luminiscentes constituyen herramientas prometedoras para evaluar la calidad de los ambientes acuáticos, dada la alta sensibilidad de este ecosistema frente a contaminantes. Este método proporciona una estimación integral de la toxicidad y supera a otros bioensayos empleados para el análisis de contaminantes químicos en velocidad, precisión, sensibilidad y simplicidad. En esta investigación se realizó la ubicación taxonómica de los aislados así como la evaluación de su crecimiento y la luminiscencia en diferentes condiciones de cultivo. Además, evaluó el efecto de contaminantes de diferente naturaleza y muestras naturales sobre la luminiscencia de los aislados. Los aislados CBM-784, CBM-976 y CBM-992 se ubicaron en la especie *Vibrio harveyi* combinando técnicas convencionales y moleculares. Los medios más adecuados para el crecimiento y la luminiscencia de los aislados resultaron ser LM y Zobell. Los valores de temperatura, pH y salinidad que favorecen la luminiscencia de las cepas son 28 °C; 7 y 3,5% respectivamente. Las cepas aisladas mostraron una mayor sensibilidad a los 15 min de exposición a los compuestos evaluados y la secuencia de toxicidad en las tres cepas fue: $\text{HgCl}_2 > \text{CuSO}_4 > \text{Cuproflow} > \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{Sphere Max} > \text{Kospi-sc 130} > \text{AgNO}_3 > \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 > \text{Envidor}$. Los aislados presentaron entre 30 y 32 % de inhibición de la luminiscencia ante muestras naturales. Los resultados sugieren que estos cultivos podrían emplearse como biosensor de contaminación, ya que la luminiscencia responde a concentraciones nanomolares de los tóxicos evaluados.

I INTRODUCCIÓN

La bioluminiscencia es un proceso bioquímico, por el que los organismos emiten luz. Este fenómeno ocurre en muchas especies de animales tanto vertebrados como invertebrados, plantas, hongos, insectos y bacterias (Girotti *et al.*, 2015). Los organismos luminiscentes se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del planeta en numerosos ambientes, pero se consideran a las bacterias bioluminiscentes marinas como las más abundantes en la naturaleza (Medvedeva *et al.*, 2009).

Los géneros más representativos de bacterias luminiscentes son *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella*; siendo las especies más comunes *V. harveyi*, *V. fischeri*, (actualmente propuesta como *Aliivibrio fischeri*), *P. phosphoreum*, *P. leiognathi* y *S. hanedai* (Martín *et al.*, 2010). Todos ellos bacilos Gram negativos, quimioorganótrofos y aerobios facultativos y se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en zonas costeras como en mar abierto (Sáenz & Nevárez, 2010).

La emisión de luz por las bacterias luminiscentes es el resultado del sistema enzimático luciferina-luciferasa que se encuentra íntimamente relacionado con los procesos de transferencia de energía en las células (Martín *et al.*, 2010). Asimismo, este fenómeno solo ocurre cuando existe alta densidad celular, y es regulado por un sistema denominado “percepción del quorum” (*quorum sensing*) (Meighen, 1993, Martín *et al.*, 2010)

Los métodos empleados para la medición de la bioluminiscencia (luminométricos, espectrofluorimétricos y de conteo de centelleo líquido con anticoincidencia) son muy sensibles, rápidos y proporcionan una información precisa e instantánea (Berthold & Tarkkanen, 2013), lo cual ha extendido el empleo de la luminiscencia bacteriana a diferentes campos como la búsqueda de antibióticos inhibidores de la síntesis proteica (Ahmed *et al.*, 2008, Arulmoorthy *et al.*, 2014), en ensayos de mutagenicidad (Podgórska & Węgrzyn, 2006) y como biosensores ambientales (Podgórska *et al.*, 2005).

El uso de estas bacterias como organismos indicadores de toxicidad se fundamenta en el hecho de que algunos sistemas bioquímicos y fisiológicos se encuentran altamente conservados durante la evolución y determinados xenobióticos actúan de manera análoga en diversos organismos (Boynton, 2009, Lopez-Roldan *et al.*, 2012, Girotti *et al.*, 2015). Las diferencias que existen entre especies, en los modos de acción de los agentes tóxicos, dependen de la especialización de los sistemas bioquímicos y fisiológicos. Los ensayos con bacterias luminiscentes en general muestran buena correlación con respecto a los bioensayos de toxicidad usando otros organismos más complejos como algas, crustáceos y peces. (Girotti *et al.*, 2008, Sáenz & Nevárez, 2010).

Debido a su gran sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, y bajo costo de los ensayos basados en la luminiscencia bacteriana se han recomendado como parte de un conjunto de análisis para el establecimiento de la toxicidad en algunos ecosistemas (Giesy & Hoke, 1989, Parvez *et al.*, 2006).

En la detección de contaminaciones ambientales, tanto en aguas como en sedimentos, se han empleado diferentes especies de este grupo de bacterias. Entre ellas podemos citar: *Vibrio harveyi*, (ISO-11348-1:2007, Podgórska *et al.*, 2007) *Photobacterium leiognathi* (Ulitzur & Weiser, 1981), *Vibrio fischeri* (Jones *et al.*, 2011) y *Photobacterium phosphoreum* (Nunes-Halldorson & Duran, 2003).

Las bacterias luminiscentes ampliamente usadas con estos fines (*Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*) poseen temperaturas óptimas de crecimiento y emisión de luz alrededor de los 25°C. Sin embargo, en 1994, Lugioyo *et al.* realizaron el primer registro sobre bacterias luminiscentes aisladas de aguas de la plataforma noroccidental cubana y aguas oceánicas al sur de la isla. Más adelante en 2003 se realizó un estudio sobre la distribución del bacterioplancton en aguas oceánicas (Lugioyo, 2003). En ambos artículos las aguas oceánicas al sur se encontraron representadas por las especies *P. phosphoreum*, *V. harveyi* y *V. splendidus*, mientras en las aguas de la plataforma noroccidental de Cuba todos los aislamientos fueron identificados como *P. leiognathi*, cuya distribución está asociada a temperaturas relativamente altas (Lugioyo, 2003).

Teniendo en cuenta las ventajas que ofrece el ensayo de toxicidad con bacterias luminiscentes para el fortalecimiento de los programas de vigilancia de la calidad ambiental y el hecho de conocer que en las aguas de la plataforma de Cuba habitan bacterias luminiscentes, el trabajo tuvo como **objetivo general:**

- Evaluar la pertinencia del uso de bacterias luminiscentes, aislada de aguas de la plataforma de Cuba, para ser empleadas en la detección de contaminantes de diferente naturaleza en ecosistemas marinos.

Para darle cumplimiento se propusieron los siguientes **objetivos específicos:**

- Caracterizar taxonómicamente, por métodos tradicionales y moleculares las cepas luminiscentes seleccionadas.
- Determinar las características fisiológicas óptimas para el crecimiento, emisión de luz y conservación de los aislados.
- Evaluar el efecto de diferentes xenobióticos (metales pesados, detergentes, plaguicidas) sobre la emisión de luminiscencia de las cepas.
- Evaluar la eficacia de las cepas en la determinación de toxicidad en muestras ambientales de diferentes naturalezas o grado de contaminación.

II. MATERIALES y MÉTODOS

Zona de Muestreo

Aislamiento de bacterias luminiscentes

Para el aislamiento de las bacterias marinas luminiscentes se realizaron muestreos en tres áreas de costa NW de Cuba (Figura 1). Los muestreos se realizaron en siete estaciones distribuidas en zona al norte del Archipiélago Sabana-Camagüey, la Rada del IDO (actual ICIMAR) y Rincón de Guanabo; entre marzo de 2011 y abril de 2015 (Tabla I).



Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreos para el aislamiento de bacterias luminiscentes (A: Zona al norte del Archipiélago Sabana-Camagüey, B: Rada del IDO (actual ICIMAR), C: Rincón de Guanabo).

La toma de las muestras se realizó mediante buceo autónomo empleando frascos de vidrio estériles de 250 mL de capacidad para su posterior procesamiento. Las muestras de agua fueron tomadas a nivel subsuperficial (25-30 cm) (Miravet *et al.*, 2009). El procesamiento microbiológico de las muestras se realizó inmediatamente después de la colecta según la metodología descrita por (Harrigan & McCance, 1968, Miravet *et al.*, 2009). Las diluciones decimales seriadas se realizaron empleando agua de mar estéril.

Tabla I. Ubicación geográfica de las estaciones de las áreas de muestreo para el aislamiento de bacterias luminiscentes.

Estaciones	Área	Latitud	Longitud
1	Zona al norte del Archipiélago Sabana-Camagüey	22°50'58	79°28'08
2		23°05'36	84°28'16
3	Rada de IDO (actual ICIMAR)	23°05'33	84°28'16
4		23°05'34	84°28'20
5		23°10'26	84°06'03
6	Rincón de Guanabo	23°10'22	84°05'56
7		23°10'28	84°05'57

Las diluciones seleccionadas se inocularon en superficie a razón de 100 μL por placa Petri con medio LM agarizado, recomendado para el aislamiento de bacterias marinas luminiscentes. Las placas Petri fueron incubadas a 28 ± 2 °C por 48 h para determinar la concentración de bacterias luminiscentes.

Mantenimiento y conservación de los aislados

Conservación de los aislamientos

Los cultivos axénicos de las bacterias marinas luminiscentes aisladas fueron depositados y registrados en la Colección de Bacterias Marinas del Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR). El medio empleado para el mantenimiento de estos cultivos fue el LM, recomendado para el aislamiento de bacterias luminiscentes (Baumann & Baumann, 1981).

Toda la información referente a la fecha del aislamiento, fuente de procedencia, ubicación geográfica del área de aislamiento; así como las características de los cultivos se registró según lo establecido por los Lineamientos para las Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos (Iglesias *et al.*, 2005)

Las cepas fueron conservadas por el método tradicional de subcultivos regulares bajo aceite mineral estéril con seis réplicas y almacenados en refrigeración (5-10 °C) (Malik, 1991), los cuales constituyeron el banco maestro con seis réplicas. De este se realizaron pases a tubos con planos inclinados con igual medio de cultivo pero sin aceite mineral, que constituyeron el banco de trabajo.

Evaluación de métodos alternativos para la conservación de bacterias luminiscentes

Para los cultivos aislados fueron evaluadas tres variantes de conservación alternativas. Como base para la conservación se utilizó agua destilada, agua de mar al 75 % y agua de mar al 100% en todos los casos sin nutrientes suplementarios y ajustadas a pH 7.

Para las diferentes variantes se utilizaron cultivos jóvenes (18 h) inoculados a una concentración final entre 10^8 - 10^9 cel·mL⁻¹ en 150 mL de medio, homogenizados por agitación en zaranda orbital a durante

20 min a $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$. Finalmente la mezcla fue dispensada en condiciones asépticas a razón de 1mL y se conservaron 10 réplicas a una temperatura de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Con el objetivo verificar la pureza y viabilidad de las cepas conservadas, a las 24 h, se evaluaron tres viales de cada tratamiento, para la comprobación de la pureza y viabilidad de las cepas recién conservadas. En este caso fueron verificadas las características macro y microscópicas (morfología colonial y tinción de Gram). Asimismo; se procedió a los 7, 30, 90, 180 días, 12, 24 y 36 meses a partir de la fecha de implementación de cada método de conservación evaluado.

La viabilidad de las cepas bacterianas se determinó mediante el conteo de colonias en placas con medio LM agarizado empleando el método de Miles *et al.* (1938) modificado por (Koch, 1981). Las diluciones seriadas se realizaron en solución salina (NaCl 0,85%) y la concentración celular fue expresada en $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se evaluó la luminiscencia de estos cultivos de forma visual, permaneciendo en una habitación totalmente oscura por aproximadamente 2 min al cabo de los cuales se agitaban los frascos y se comprobaba si emitían luz.

Ubicación taxonómica de los aislados

Caracterización fisiológica

La caracterización fisiológica de los cultivos se llevó a cabo mediante la aplicación de 40 pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

La forma de la célula, su agrupación y la presencia de endosporas se determinaron mediante procedimientos estándar de tinción de Gram y con Verde Malaquita. Las pruebas realizadas incluyeron: movilidad; catalasa; oxidasa; luminiscencia; crecimiento a 4, 10, 15,25, 30, 35 y 40 °C usando medio LM; y tolerancia al NaCl al 0, 1, 3, 6, 8 y 10%.

La reducción de nitratos, el metabolismo óxido-fermentativo (O/F) de la glucosa, la hidrólisis de ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), la arginina dihidrolasa (Ramasamy *et al.*, 2014), la producción de H_2S a partir de tiosulfato, la reducción de indol, la hidrólisis de urea, la hidrólisis de esculina y gelatina, y el uso de citrato se examinaron usando tiras de API 20 NE (BioMeriux, SA, Francia) con incubación a 28 ° C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La producción de amilasa y lipasa, la reacción de Voges-Proskauer (VP), la lisina (LDC) y ornitina descarboxilasa (ODC) se realizaron siguiendo el método propuesto por Harrigan & McCance (1968).

Caracterización molecular

La extracción total de ADN genómico de los aislados bacterianos se realizó usando el método de fenol/cloroformo, según Thompson *et al.* (2005). Para la taxonomía bacteriana se emplearon cebadores

específicos (Tabla II) por amplificación mediada por PCR de los genes 16S rRNA, *gyrB* y *pyrH*. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 20 μL usando tampón 10X (TrisHCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), ADN Taq polimerasa ($1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Invitrogen™), trifosfatos de desoxinucleósidos 0,2 mM, 0,4 μM de cebadores inversos, MgCl_2 2,5 mM y 100 ng de ADN molde. Los parámetros de termociclador para los tres genes consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguidos de 36 ciclos de desnaturalización (95 °C, 45 s), alineación (58-62 °C, 1 min, 30 s), extensión (72 °C, 1 min, 15 s) y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Las reacciones de PCR se realizaron usando un termociclador (Proflex PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, EE. UU.). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa (1,5%) TBE 1X (base Tris, ácido bórico, EDTA, pH 8), teñidos con GelRed® (Biotium). GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas®) se usó como escalera. Se utilizó agua de grado de biología molecular (Fermentas®) como control negativo.

Tabla II. Cebadores específicos para la amplificación de los genes taxonómicos bacterianos (análisis de secuencias multilocus).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Temp. de alineación (°C)	Sitio	Gen diana	Reference
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	58	9 - 27	16S rRNA	Lane (1991)
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	58	1513-1492	16S rRNA	Lane (1991)
<i>gyrB</i> f	GAAGTTATCATGACGGTACTTC	62	11359- 11380	<i>gyrase</i> beta subunit	Ast & Dunlap (2005)
<i>gyrB</i> r	AGCGTACGAATGTGAGAACC	62	12582- 12602	<i>gyrase</i> beta subunit	Ast & Dunlap (2005)
<i>pyrH</i> f	ATGASNACBAAYCCWAAACC	58	1-20	Uridylate kinase	Thompson <i>et al.</i> (2005)
<i>pyrH</i> r	GTRAABGCNGMYARRTCCA	58	599-618	Uridylate kinase	Thompson <i>et al.</i> (2005)

Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial PureLink Purification (Invitrogen™), la cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific™) y se emplearon para la secuenciación directa de ADN. Se secuenciaron fragmentos de genes parciales del ARNr 16S, la subunidad beta de la girasa y la uridilatoquinasa en ambas direcciones, utilizando los mismos cebadores de amplificación directa e inversa (BigDye Terminator™ V3.1, Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. Los productos resultantes se purificaron con el Kit Xterminator™ (Applied Biosystems), y luego se ejecutaron en un secuenciador multicapilar de ADN (Modelo 3130, Applied Biosystems) en el Laboratorio de Análisis Genómico, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Costa Rica. Las secuencias recuperadas se editaron con el software Geneius (versión R8, Biomatters Limited). La secuencia local 16S rRNA de los aislados y todas las secuencias del mismo gen se procesaron y los nucleótidos de las posiciones 300 a 400 se eliminaron de las secuencias parciales, debido a la baja calidad. Las secuencias se analizaron usando el algoritmo

BLAST (Altschul *et al.*, 1990) con parámetros por defecto, y se compararon con otras secuencias 16S rRNA, *gyrB* y *pyrH* disponibles de la base de datos GenBank. Las secuencias de nucleótidos de los aislados de la plataforma de noroccidental cubana se depositaron en la biblioteca de datos del GenBank. Las secuencias obtenidas de este estudio y las obtenidas del GenBank se replicaron (agrupamiento de secuencias duplicadas) mediante el software USEARCH v7.0 (Edgar, 2010) a través de la aplicación de comando rápido de clúster (con una identidad de umbral de 0,99000). Luego, las secuencias de clústeres no duplicados se alinearon en el programa en línea MAFFT 7.0 con el método de refinamiento iterativo (FFT-NS-i) y los parámetros 1PAM/k = 2. El árbol filogenético se realizó con la máxima probabilidad (ML) (raxMLGUI v.7.4.2) (Stamatakis *et al.*, 2005, Silvestro & Michalak, 2012) software por modelo general reversible en el tiempo (Modelo de sustitución GTRGAMMA y 1000 inferencias de arranque rápido). Los árboles de consenso fueron visualizados y editados en FigTree 1.4 (Rambaut, 2009).

Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia

Para conocer si existían diferencias en el crecimiento y emisión de la luminiscencia de los aislados al variar la composición del medio de cultivo, se cultivaron las cepas en cuatro medios recomendados en la literatura para bacterias luminiscentes marinas: Boss (Prakash *et al.*, 2014), Chalk (Atlas, 2010), LM (Amutha & Shamini, 2015) y Zobell (Lee *et al.*, 2009) (Tabla III). En este experimento se fijaron los valores de pH y salinidad en 7 y 3,5%, respectivamente, según lo propuesto por (Ramahian & Chandramohan, 1994).

A partir de un cultivo de los aislados en plano inclinado se inocularon en erlenmeyers que contenía 50 mL de medio LM líquido y se incubó en zaranda orbital (Infors HT Ecotron) a $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ y $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. La densidad óptica aparente (DO) del cultivo inicial se midió a las 18 h a una longitud de onda (λ) de 620 nm, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Empleando este cultivo inicial fueron inoculados 150 mL de los medios de cultivo seleccionados para el ensayo a una DO de 0,1 según lo recomendado por (Stuart, 1998).

Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas, mediante la medición de DO en (espectrofotómetro Shimadzu UV-1201) cada 2 h por un periodo de 12 h. En cada medición se tomaron 2 mL de muestras de cada frasco de cultivo. Se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial mediante el modelo de crecimiento no restringido (López & Gódia, 1998).

Tabla III. Composición de los medios de cultivos empleados

Boss		Chalk	
Peptona	10 g·L ⁻¹	Peptona	5 g·L ⁻¹
Extracto de Carne	3 g·L ⁻¹	Extracto de Levadura	3 g·L ⁻¹
NaCl	30 g·L ⁻¹	NaCl	30 g·L ⁻¹
Glicerol	1 g·L ⁻¹	Glicerol	10 g·L ⁻¹
Agua destilada	1000 mL	Agua destilada	1000 mL

LM		Zobell	
Triptona	5 g·L ⁻¹	Peptona	5 g·L ⁻¹
Extracto de Levadura	5 g·L ⁻¹	Extracto de Levadura	1 g·L ⁻¹
CaCO ₃	1 g·L ⁻¹	Fe ₃ SO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g·L ⁻¹
Glicerol	3 mL	Agua de mar	750 mL
Agua de mar	750 mL	Agua destilada	250 mL
Agua destilada	250 mL		

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados por 15 min a 121 °C.

En este ensayo se realizaron valoraciones rápidas y cualitativas de la luminiscencia de los cultivos en los intervalos de tiempo seleccionados para la medición de la DO. Estas se realizaron agitando los erlenmeyers en una habitación totalmente oscura, según lo propuesto por (Boynton, 2009).

A los medios de cultivo descritos se les evaluó en paralelo la luminiscencia (espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301pc, mode: spectrum; slit opening: 20 nm; scan speed: fast) y en crecimiento como la DO a 620 nm (espectrofotómetro Genesys 10UV). Las determinaciones de luminiscencia y DO se realizaron en cubetas de cuarzo pulido de 1 cm de paso de luz cada hora por un periodo de 8 h.

En el caso particular de la luminiscencia los máximos se obtuvieron integrando los espectros de emisión de luz desde los 400 nm hasta los 600 nm, la fuente de luz de excitación se fijó en 0 nm para eliminar la interferencia de luz de la lámpara.

Influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la luminiscencia

Para analizar la influencia de la temperatura en el crecimiento y la luminiscencia de la cepa evaluada, se seleccionó el medio cultivo que presentó los mayores valores de luminiscencia y se incubaron los cultivos a 5, 15, 25, 27, 28, 29, 30 y 37 °C. En todos los casos se midió el crecimiento y la luminiscencia cada 2 h.

Se determinó la μ como parámetro cinético, que describe el efecto de la temperatura en el cultivo de esta bacteria. Asimismo, fueron calculados los parámetros de la ecuación de Arrhenius en la zona de la curva donde la velocidad específica de crecimiento era ascendente, ya que esta ecuación permite establecer una relación matemática entre la μ y la temperatura.

$$\mu = A e^{-Ea/RT}$$

Donde: μ : es la velocidad específica de crecimiento

A : factor preexponencial

Ea : es la energía de activación

R : constante de universal de los gases

T : Temperatura absoluta en Kelvin.

Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia

Los experimentos para la evaluación la influencia del pH sobre los aislados se realizaron en el medio donde las cepas emitieran mayor luminiscencia, manteniendo constantes la temperatura y la agitación (28 ± 1 °C, de $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$). Los valores de pH a evaluar fueron: 3, 5, 7, 8 y 9; ajustando los medios de cultivo con NaOH ó HCl 1N según el caso.

Posteriormente se calculó μ y fue modelada su relación con el pH mediante el empleo del modelo de polinomios ortogonales para la selección del rango de pH en el cual se favorece la emisión de luz.

Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y la luminiscencia

La evaluación del efecto de la salinidad fue realizada en el medio con mejores valores de luminiscencia a 28 ± 2 °C, pH 7 y $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$. La salinidad se evaluó variando las concentraciones de NaCl hasta obtener los valores deseados (0, 1, 2, 3, 3.5, 4 y 5), en el caso de los medios que emplean agua de mar esta se sustituyó por agua destilada.

Se calculó μ y fue modelada su relación con respecto a la salinidad mediante el empleo del modelo de polinomios ortogonales para la selección del rango de salinidad en el cual se favorece el crecimiento de los aislados.

Efecto de diferentes xenobióticos sobre la luminiscencia de los aislados

Las cepas evaluadas fueron inoculadas en las condiciones seleccionadas en los experimentos previos durante el tiempo equivalente al momento en el que la cepa mostraba su máxima luminiscencia.

Fueron evaluados nueve xenobióticos entre los que se encuentran las sales de metales pesados: HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, AgNO_3 , CuSO_4 y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; y compuestos empleados en la industria agrícola en Cuba como: Cuproflow (fungicida, oxiclورو de cobre), Envidor (acaricida, spirodiclorofen), Kospi-sc 130 (insecticida sistémico, midacloprid y bifentrina) y Sphere Max (fungicida, trifloxistrobin y cyproconazol). Se realizaron las diluciones pertinentes para cada metal en función de las concentraciones a evaluar (Tabla IV). Para la preparación de las soluciones se utilizó como solvente solución salina y fueron utilizadas inmediatamente después de preparadas.

Tabla IV. Concentraciones empleadas en la evaluación del efecto de diferentes xenobióticos sobre la luminiscencia de los aislados.

Compuesto	Concentraciones empleadas (mg·L ⁻¹)								
HgCl ₂	3,70	1,85	0,93	0,46	0,23	0,12	0,06	0,03	0,01
K ₂ Cr ₂ O ₇	90,0	45,0	22,5	11,3	5,6	2,8	1,4	0,7	
AgNO ₃	320,0	160,0	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,3
CuSO ₄	90,0	45,0	22,5	11,3	5,6	2,8	1,4	0,7	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	320,0	160,0	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,3
Cuproflow	90,0;	45,0	22,5	11,3	5,6	2,8	1,4	0,7	
Envidor	320,0	160,0	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,3
Kospi-sc 130	320,0	160,0	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,3
Sphere Max	320,0	160,0	80,0	40,0	20,0	10,0	5,0	2,5	1,3

Se evaluó el efecto de la concentración de los compuestos tóxicos siguiendo un diseño en bloques completamente aleatorizados en el que los bloques correspondían a los metales seleccionados. Fueron expuestos 200 µL del cultivo (en su máxima luminiscencia) a 200 µL de las soluciones de los tóxicos a diferentes concentraciones, el control fue reemplazado sustituyendo la solución del tóxico por solución salina. Los tiempos de incubación se fijaron a los 5 y 15 min (Parvez *et al.*, 2006, Beh *et al.*, 2010). Las determinaciones de luminiscencia se realizaron en un espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BGM Labtech) y los datos fueron procesados con el programa Optima 2,20R2.

Cálculo de la EC₅₀

La concentración del tóxico que provocó una disminución de un 50 % de la luminiscencia original (EC₅₀) se determinó según lo recomendado por la ISO-11348 para este tipo de ensayos.

Para estimar este valor de concentración se determinó la relación del blanco o control (R_t), la cual se utiliza como factor para compensar la pérdida natural de la luz (en ausencia del tóxico) de la suspensión celular a un tiempo determinado (t):

$$R_t = \frac{I_t}{I_0}$$

donde: **R_t**: para compensar la pérdida natural de la luz

I₀: luminiscencia inicial del control

I_t: luminiscencia del control transcurrido un tiempo t.

El factor gamma (Γ) indica la relación entre la pérdida de luz y la luz remanente, para un tiempo determinado, en presencia de un tóxico dado. Γ se relaciona con la concentración del tóxico mediante la siguiente función exponencial:

$$\Gamma = bC^m$$

donde: Γ : factor gamma

b y **m**: parámetros que caracterizan la función

C: concentración del tóxico.

El factor gamma fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$\Gamma = \left[\frac{R_t \cdot I_0}{I_t} \right] - 1$$

Para calcular los valores de EC_{50} se linealizaron los datos aplicando una transformación logarítmica como muestra la siguiente expresión:

$$\log \Gamma = m \log C + \log b$$

Con la formula anterior podemos determinar la EC_{50} ya que cuando $\Gamma = 1$, C es equivalente al EC_{50} .

Efecto de muestras naturales sobre la luminiscencia de los aislados

Fue evaluada la pérdida de luminiscencia de CBM-784, CBM-976 y CBM-992 frente a cuatro muestras naturales con diferentes grados de contaminación, colectadas en junio de 2018 y provenientes del Rincón de Guanabo, Rada IdO, así como de los ríos Almendares y Quibú. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su llegada al laboratorio. Los cultivos de estas bacterias se utilizaron cuando presentaban su máxima emisión de luz (Tabla V).

Tabla V. Ubicación geográfica de las estaciones de las áreas de muestreo empleadas para evaluar la sensibilidad de la luminiscencia en los aislados.

Estaciones	Área	Latitud	Longitud
MN1	Rincón de Guanabo	23°10'25"	84°05'53"
MN2	La Puntilla (río Almendares)	23°05'36"	84°28'16"
MN3	Calle 170 (río Quibú)	23°10'26"	84°06'03"
MN4	Rada (IDO)	23°05'52"	84°28'13"

Se evaluó el efecto de la concentración de las muestras exponiendo 200 μ L de las mismas a 200 μ L del cultivo (en su máxima luminiscencia), el control fue reemplazado sustituyendo la muestra por solución salina y se dejó incubar por 15 min. Como control positivo se empleo una solución de dicromato de potasio a 50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Zhou *et al.*, 2006, Masner *et al.*, 2016). Las determinaciones de luminiscencia se realizaron en un espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA, BGM Labtech) y los datos fueron procesados con el programa Optima 2,20R2.

La atenuación de la intensidad de la luminiscencia en respuesta a las concentraciones de las muestras naturales evaluadas se calculó como el porcentaje entre la intensidad luminosa de la muestra y el control, y expresada como tanto por ciento, según lo establecido en la ISO-11348 (2007) y empleando

las formulas siguientes:

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0} \quad I_{ct} = I_0 \times f_{kt} \quad H_t = \frac{(I_{ct} - I_t)}{(I_{ct} \times 100)}$$

donde: f_{kt} : factor de corrección para el tiempo de exposición (t)

I_{kt} : intensidad de la luminiscencia de la muestra control en el tiempo de exposición (t)

I_0 : intensidad de la luminiscencia de la muestra control inmediatamente después de adicionada

I_{ct} : factor de corrección de luminiscencia de la muestra en el tiempo 0

H_t : inhibición de la luminiscencia

I_t : intensidad de la luminiscencia en un tiempo de exposición (t)

En paralelo se realizaron determinaciones de las variables físico-químicas para comprobar la calidad de estas aguas. Las muestras se tomaron de forma manual en el nivel subsuperficial, sumergiendo el frasco por debajo de la interface aire-agua (ISO-5667-9:1992).

Los indicadores evaluados fueron: oxígeno disuelto mediante el método de Winkler (IOC-UNESCO, 1983), la demanda bioquímica de oxígeno DBO_5 por incubación directa (ISO-5815:1989). Las muestras de agua para los análisis de nutrientes y materia orgánica fueron almacenadas en frascos plásticos de 1 L y congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se determinó la demanda química de oxígeno DQO por oxidación de la materia orgánica con permanganato de potasio en medio alcalino FAO (1975), el amonio NH_4 de acuerdo al procedimiento analítico indicado por FAO (1975) y el fósforo inorgánico PO_4 por las metodologías establecidas en los manuales IOC-UNESCO (1983) y FAO (1975).

Tabla VI. Índice de calidad de las variables químicas para aguas marinas costeras.

Índice	Calidad	NO_3+NO_2 columna ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)	NO_3+NO_2 hidracina ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)	NH_4 ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)	Nitrógeno Total (NT) ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)	PO_4 ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)	Fósforo Total (PT) ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	Calidad buena	0,05-0,70	0,05-0,58	0,05-1,25	3,76- 23,66	0,03-0,11	0,10-0,43
2	Calidad regular	0,71-1,18	0,59-1,28	1,26-2,58	23,67- 36,08	0,12-0,22	0,44-0,66
3	Calidad mala	1,19-13,6	1,28-7,59	2,59-28,42	36,1-123,25	0,23-8,16	0,67-10,08

En la determinación de la calidad del agua de mar de la zona marino costera se utilizaron estándares nacionales para poder considerar todos los indicadores físico-químicos de calidad empleados en la presente evaluación. Se emplearon las normas cubanas para uso recreacional (NC-22:1999) y para uso pesquero (NC-25:1999). Además, se utilizó el Índice de calidad química para aguas marinas costeras del norte de Cuba (García- Ramil, inédito) (Tabla VI).

Procesamiento estadístico de los resultados

Para el análisis de similitud entre el cultivo de estudio y las cepas de referencia se empleó el programa estadístico PRIMER 6.1.6. Los resultados de las pruebas fisiológicas realizadas se codificaron como 1 (presencia/positivo), 0 (ausencia/negativo) y 9 (datos no comparables). Se realizó la clasificación normal de los datos, empleando métodos aglomerativos jerárquicos a partir de una matriz con los valores del coeficiente de similitud de Brays-Curtis obtenidos. A partir de esta información se realizó el dendrograma correspondiente. La agrupación se logró mediante el promedio matemático del grupo de pares no ponderado (UPGMA) (Bagordo *et al.*, 2012). La correlación entre los valores respectivos en la matriz de similitud y el dendrograma correspondiente se calcularon usando el coeficiente de correlación de Pearson (r).

Los valores máximos de luminiscencia fueron calculados integrando los espectros de luminiscencia obtenidos entre 400 y 600 nm, empleando los programas Fluorescence Spectroscopy, Optima 2,20R2 y Origin 8.0. Mientras que los datos relacionados con el crecimiento del cultivo fueron normalizados mediante una transformación logarítmica. La normalidad de los datos transformados se verificó mediante la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza a través de la prueba de Bartlett. Para el procesamiento estadístico de los datos se usó análisis de varianza de clasificación simple con un coeficiente de significación del 95% y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977). Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Spss v.21.0 y Excel 7.0 para Windows.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan en términos de la media \pm desviación estándar (DS).

III. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias luminiscentes

Se logró el aislamiento y caracterización taxonómica de tres bacterias marinas capaces de emitir luz visible en la oscuridad, procedentes de aguas de diferentes zonas de la plataforma cubana: al norte del Archipiélago Sabana-Camagüey (Estación 1), Rada del IDO (Estación 2) y Rincón de Guanabo (Estación 5).

Estos resultados confirman la presencia de bacterias luminiscentes en las aguas marinas cubanas que ya habían sido informados por Lugioyo *et al.* (1994) quienes realizaron el primer registro sobre bacterias luminiscentes aisladas de aguas de la plataforma noroccidental y aguas oceánicas al sur de Cuba. Así mismo en un estudio posterior sobre la distribución del bacterioplancton en aguas oceánicas cubanas se logró el aislamiento de este tipo de microorganismos (Lugioyo, 2003).

Evaluación de métodos alternativos para la conservación de bacterias luminiscentes

Teniendo en cuenta el interés de las cepas aisladas y la frecuencia de pases necesarios para el desarrollo de experimentos relacionados con la fisiología de estas bacterias fueron evaluados métodos alternativos de conservación. En la Tabla VII se presentan los resultados correspondientes a 12, 24 y 36 meses para la valoración de cada uno de los métodos.

Los tres métodos alternativos evaluados garantizaron la viabilidad y características fenotípicas de interés (emisión de luz) de los cultivos en condiciones restringidas de actividad metabólica, con un consumo mínimo de energía para el mantenimiento celular a partir de la limitación de nutrientes. En general, para cada uno de los cultivos viables de cada tratamiento se obtuvieron a los tres años valores de concentración celular en el orden de 10^4 a 10^5 cel·mL⁻¹ que muestran la efectividad de los tres métodos.

La concentración celular disminuyó significativamente en dos o tres órdenes a los tres años con respecto a la concentración inicial. Aunque, debe destacarse que aun cuando la concentración de células viables se afectó, al cabo de tres años los aislados mantuvieron su capacidad de emitir luz siendo esta potencialidad medida de su estabilidad genética y la de mayor interés para nuestra evaluación.

Tabla VII. Comportamiento de la concentración de células en el tiempo de los métodos de conservación alternativos para cada cepa.

Cepas	Método	Concentración (UFC·mL ⁻¹)		
		0	2 años	3 años
CBM-784	Solución salina	$2,3 \cdot 10^7 \pm 4,8 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^5 \pm 4,5 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3 \pm 1,0 \cdot 10^1$
	Agua de mar 100%	$1,4 \cdot 10^7 \pm 3,7 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5 \pm 3,4 \cdot 10^2$
	Agua de mar 75%	$9,0 \cdot 10^6 \pm 3,6 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^5 \pm 3,6 \cdot 10^2$
CBM-796	Solución salina	$7,9 \cdot 10^6 \pm 2,8 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^4 \pm 2,1 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^4 \pm 1,0 \cdot 10^2$
	Agua de mar 100%	$3,1 \cdot 10^7 \pm 5,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^5 \pm 4,0 \cdot 10^1$	$1,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^3$
	Agua de mar 75%	$4,0 \cdot 10^7 \pm 6,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^5 \pm 3,7 \cdot 10^2$
CBM-992	Solución salina	$4,0 \cdot 10^7 \pm 6,3 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^4 \pm 3,1 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^2$
	Agua de mar 100%	$3,4 \cdot 10^7 \pm 5,8 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^6 \pm 1,2 \cdot 10^3$
	Agua de mar 75%	$4,4 \cdot 10^7 \pm 6,6 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^6 \pm 1,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^5 \pm 3,9 \cdot 10^2$

Los tres métodos resultaron satisfactorios de modo general y particularmente los conservados en agua de mar (tanto al 75 como al 100%) (Tabla VII) para la conservación a mediano plazo. Teniendo en cuenta el mantenimiento de la viabilidad y luminiscencia de estos cultivos recomendamos su utilización por un periodo de dos años para el mantenimiento alternativo de su potencial biotecnológico.

Ubicación taxonómica de los aislados

La microbiología marina presenta dificultad en la identificación de microorganismos de este ambiente, pues la taxonomía bacteriana se ha desarrollado a partir de microorganismos aislados del medio terrestre y comprende una serie de ensayos y evaluaciones limitados a estos microorganismos. Por esta razón, los métodos para ambientes extremadamente variables como el marino no han sido totalmente desarrollados. En general, las pruebas para clasificación empleadas regularmente pueden ser aplicadas a aislados marinos; sin embargo para algunos cultivos ciertas modificaciones son requeridas como la adición de cloruro de sodio al medio de cultivo y modificaciones en la temperatura de incubación dependiendo de los ecosistemas muestreados (Pérez *et al.*, 2001).

Los tres cultivos evaluados presentaron en los medios LM y Zobell agarizados características culturales muy similares, presentando colonias con una coloración amarilla clara, brillantes, translúcidas, redondas y con bordes regulares. Además, emiten una luz azul-verdosa que se aprecia a simple vista al colocar estas placas en la oscuridad. Por otra parte, la observación microscópica de los cultivos reveló que son bacilos Gram negativos que no forman endospora y son bacterias móviles.

Los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a los cultivos aparecen reflejados en la Tabla VIII, junto a las características fisiológicas de algunas cepas luminiscentes de referencia.

Tabla VIII. Características fenotípicas evaluadas en los cultivos de CBM-784, CBM-976, CBM-992 y datos de cepas de referencia de estudios previos*.

Característica	CBM-784	CBM-976	CBM-992	P.l	P.p	V.h	V.f	V.l	V.s	S.h	S.w
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Luminiscencia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Test de O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	O	O
ADH	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
LDC	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ONPG	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Utilización de citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Esculina	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Amilasa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Lipasa	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a T:											
4°C	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
35°C	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
40°C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a salinidad:											
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+: positivo, -: negativo, F: fermentativo, O: oxidativo, ADH: arginina dihidrolasa, LDC: lisina descarboxilasa, ODC: ornithina descarboxilasa, ONPG: ortho-nitrophenyl-β D-galactopiranosas, VP: Vogues- Proskauer.

P.l., *Photobacterium leiognathi* ATCC 25521; P.p., *Photobacterium phosphoreum* ATCC 11040; V.h., *Vibrio harveyi* ATCC 14126; V.f., *Vibrio fischeri* ATCC 7744; V.l., *Vibrio logei* ATCC 29985; V.s., *Vibrio splendidus* biovar I ATCC 33125; S.h., *Shewanella hanedai* ATCC 33224; S.w., *Shewanella woodyi* ATCC 51908.

*(Makemson *et al.*, 1997, Farto *et al.*, 1999, Venkateswaran *et al.*, 1999, Lunder *et al.*, 2000, López-Caballero *et al.*, 2002, Satomi *et al.*, 2003, Chiu *et al.*, 2007, Bagordo *et al.*, 2012)

Las cepas bacterianas aisladas presentan al igual que *V. harveyi* ATCC 14126 respiración aeróbica facultativa y producen enzimas con actividad gelatinolítica, lisina carboxilasa, lipasa (Tween 80), caseinasa y amilasa. Los tres cultivos fueron capaces de reducir nitrato, presentaron crecimiento en medio TCBS y fueron capaces de crecer entre 15 y 40 °C, pero no a 4 °C. En el caso de *V. harveyi* ATCC 14126 no presenta crecimiento a 40 °C esta diferencia puede estar relacionada con la adaptación a los ecosistemas de aislamiento ya que gran número de reportes de aislamientos de bacterias luminiscentes son provenientes de zonas templadas (Bagordo *et al.*, 2012, Dunlap, 2014).

Las cepas no presentaron actividades enzimáticas como la producción de indol y de ornitina carboxilasa, características que las diferencian la cepa de *V. harveyi* ATCC 14126 empleada en la comparación. En el caso particular de la cepa bacteriana CBM-784 además se diferencia de la de referencia en la respuesta a la prueba ONPG, de forma similar a los resultados encontrados por Lal & Ransangan (2013) para una cepa aislada en un ecosistema marino de Malasia.

Los resultados del análisis fenotípico mostraron que las cepas CBM-784, CBM-976 y CBM-992 difieren de la cepa ATCC 14126 en cuanto a varias características metabólicas. La variabilidad en las características bioquímicas de *V. harveyi* podría estar relacionada con la transferencia de genes que ocurre tanto dentro de la misma especie como entre diferentes géneros bacterianos (Lal & Ransangan, 2013). Urbanczyk *et al.* (2014) demostraron la transferencia horizontal de genes *lux* en la naturaleza de vibrios luminosos (*V. harveyi*) a no luminosos (*V. vulnificus* y *V. chagasii*), filogenéticamente distintos en las secuencias de los genes *gyrB*, *recA* y *pyrH*.

En el dendograma (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) correspondiente a la clasificación numérica de los aislados se evidencia el grado de similitud entre estos y *V. harveyi* ATCC 14126 (84,4%). Asimismo puede apreciarse un 100,0% de similitud entre CBM-992 y CBM-784 y un 96,9% entre estos y el aislado CBM-976 (Figura 2, Tabla IX).

Los métodos tradicionales de bacteriología pueden ayudar a detectar patógenos comunes y fácilmente cultivables, pero pueden llevar mucho tiempo (Balcázar *et al.*, 2007), son menos sensibles y están sujetos a interpretaciones fisiológicas erróneas (Ransangan & Mustafa, 2009) en comparación con los métodos moleculares. Por tanto los resultados obtenidos hasta este punto se complementaron con los análisis filogenéticos de tres genes descritos para la identificación de bacterias luminiscentes (Lane, 1991, Ast & Dunlap, 2005, Thompson *et al.*, 2005).

De acuerdo con el posicionamiento filogenético del gen de ARN ribosómico 16S, estos aislados se relacionaron con la familia *Vibrionaceae*, género *Vibrio* (asociado específicamente a *V. harveyi* y

Vibrio rotiferianus), mostrando un soporte de nodo de un 86% (Figura 3A). Sin embargo, a pesar de que herramientas moleculares como la secuenciación del gen 16S, han demostrado ser útiles para la clasificación e identificación de especies bacterianas (Ransangan & Mustafa, 2009, Cano-Gómez *et al.*, 2015) no resultaron suficientes para una identificación definitiva, particularmente para las bacterias que tienen altas tasas de transferencia horizontal de genes y recombinación entre especies relacionadas, tal como sucede en el género *Vibrio*.

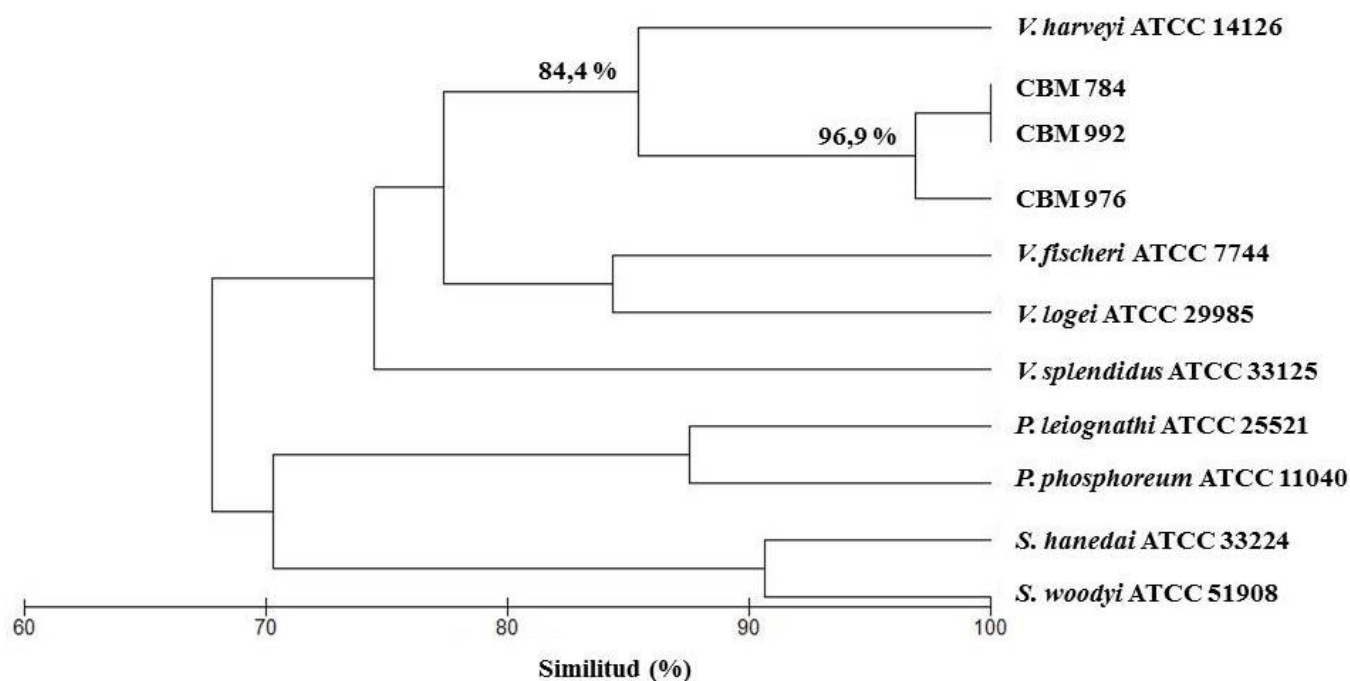


Figura 2. Dendrograma de similitud simplificado que muestra las relaciones fenotípicas entre los cultivos aislados (CBM-784, CBM-976 y CBM-992) y cultivos de bacterias luminiscentes de referencia empleando los datos que se muestran en la Tabla VIII.

Para confirmar la identificación de especies de *Vibrio* se han propuesto el análisis de otros genes, tales como *gyrB* y *pyrH* (Ast & Dunlap, 2005, Thompson *et al.*, 2005). En consecuencia los aislados se localizan en el cluster *Vibrio* del árbol taxonómico creado para el gen *gyrB*, compartiendo su posición taxonómica con aislados de *Vibrio campbellii*, *Vibrio rotiferianus* y *V. harveyi* con un soporte de nodos del 94%. Además, las cepas se localizaron en el cluster *Vibrionaceae* dentro de la topología del gen uridilato quinasa (*pyrH*), compartiendo su posición en el cluster *V. harveyi*. Por otro lado, el grupo *Aliivibrio*, *Photobacteriaceae*, *Enterovibrionaceae* y *Shewanellaceae* revelaron una separación aparente entre los aislados localizados en el grupo *Vibrio*. Las secuencias obtenidas para el aislado CBM-784 fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso correspondientes para cada gen (KU761562 y KU761563 secuencias parciales del gen 16S, KU902454 de *gyrB* y KU868079 de *pyrH*) (Delgado *et al.*, 2017) quedando el resto de las secuencias obtenidas

pendiente de registro en esta base de datos.

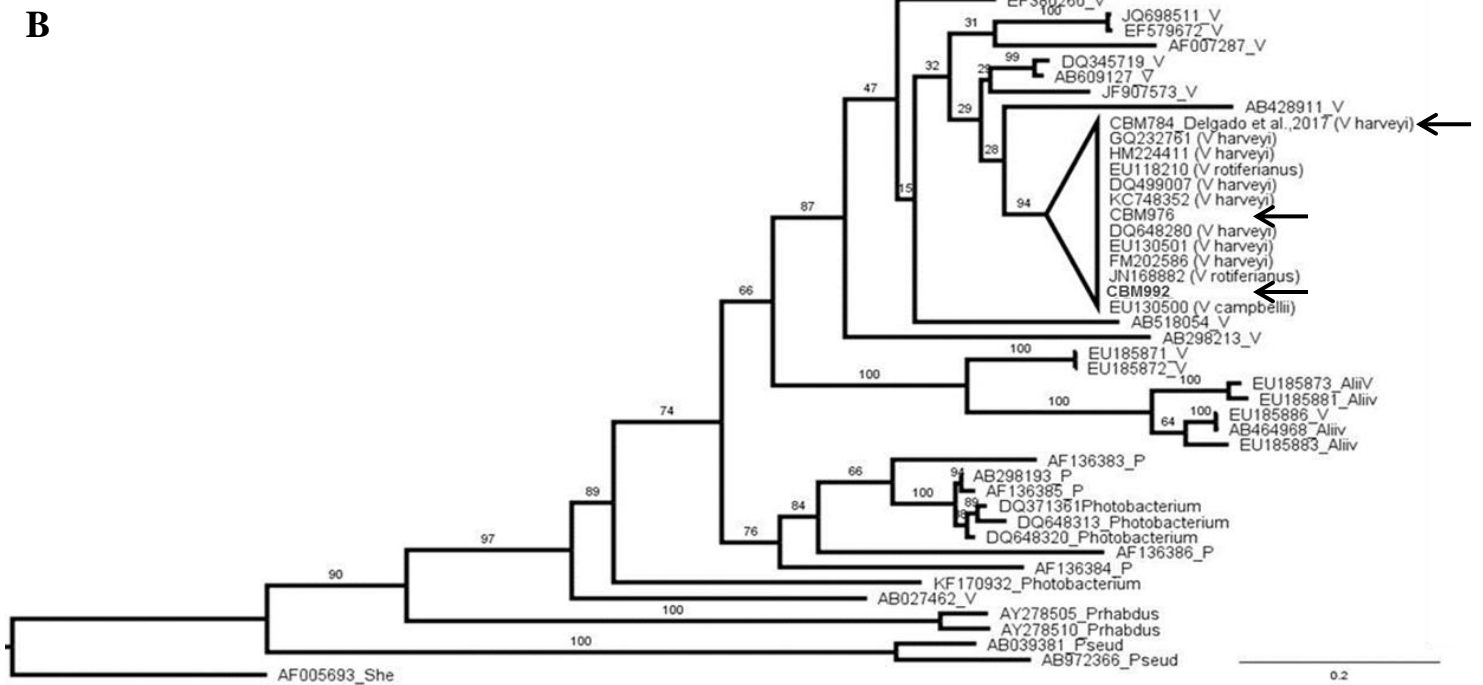
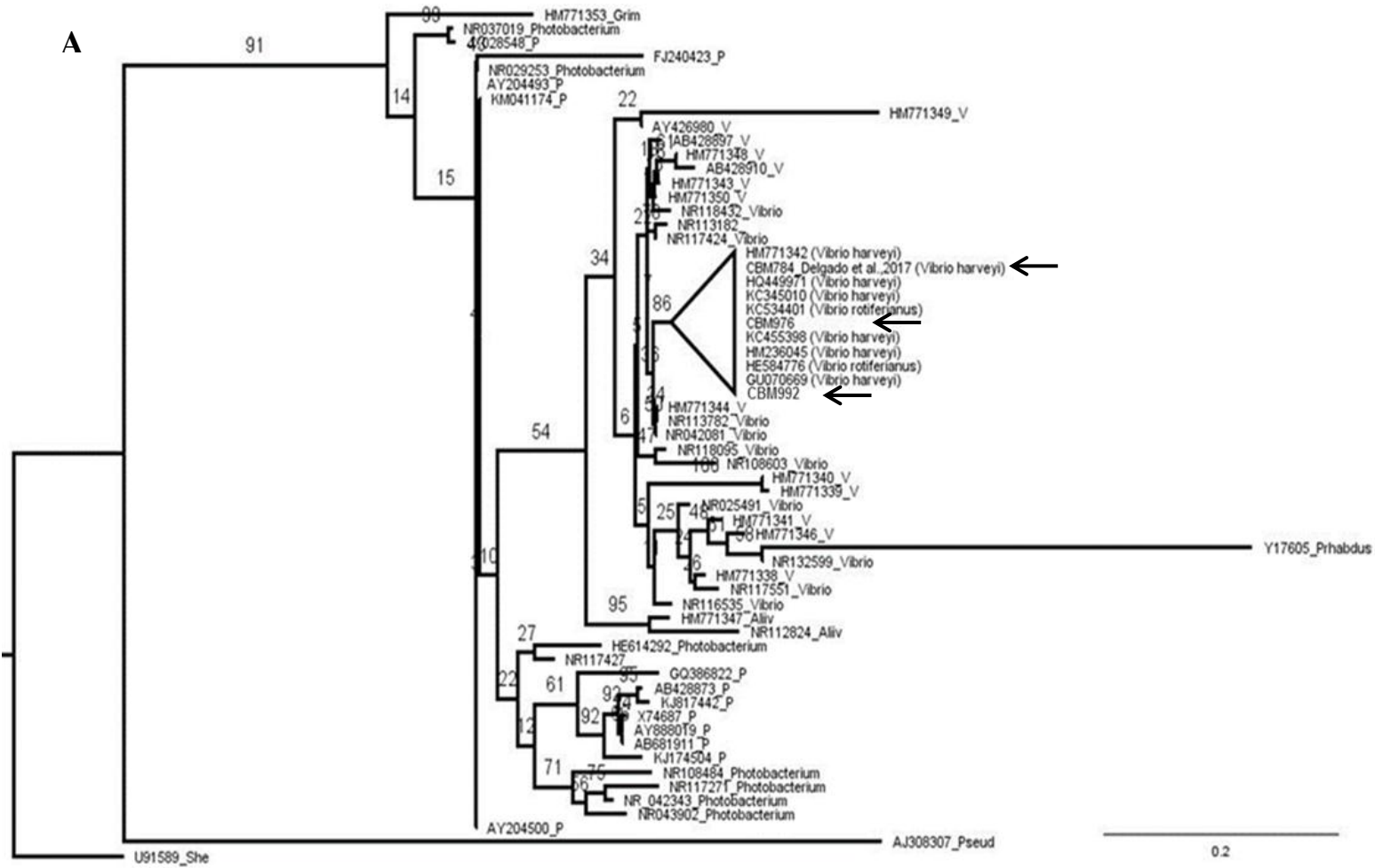
Tabla IX. Matriz de similitud obtenida del análisis de las características fenotípicas de las bacterias luminiscentes aisladas y cepas de referencia (Tabla VIII). Los valores de similitud están expresados en tanto por ciento.

	CBM-784	CBM-976	CBM-992	P.l	P.p	V.h	V.f	V.l	V.s	S.h
CBM-976	96,9									
CBM-992	100,0	96,9								
P.l	68,8	65,6	68,8							
P.p	62,5	65,6	62,5	87,5						
V.h	84,4	87,5	84,4	65,6	65,6					
V.f	75,0	78,1	75,0	62,5	68,8	78,1				
V.l	78,1	81,3	78,1	59,4	71,9	75,0	84,4			
V.s	71,9	75,0	71,9	65,6	78,1	81,3	71,9	75,0		
S.h	65,6	68,8	65,6	65,6	78,1	68,8	71,9	75,0	75,0	
S.w	62,5	65,6	62,5	62,5	75,0	65,6	75,0	71,9	71,9	90,6

P.l., *Photobacterium leiognathi* ATCC 25521; P.p., *Photobacterium phosphoreum* ATCC 11040; V.h., *Vibrio harveyi* ATCC 14126; V.f., *Vibrio fischeri* ATCC 7744; V.l., *Vibrio logei* ATCC 29985; V.s., *Vibrio splendidus* biovar I ATCC 33125; S.h., *Shewanella hanedai* ATCC 33224; S.w., *Shewanella woodyi* ATCC 51908.

Los análisis de secuencia multilocus y el empleo de la caracterización fenotípica de las cepas luminiscentes CBM-784, CBM-976 y CBM-992 permitieron su posicionamiento en el género *Vibrio* con una fuerte relación con la especie *V. harveyi*.

Las variaciones detectadas en la identificación de especies pertenecientes al grupo Harveyi (*V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. campbellii*, *V. owensii*, and *V. jasicida*) (Urbanczyk *et al.*, 2013, Cano-Gómez *et al.*, 2015), empleando herramientas bioquímicas y moleculares, se debe a que es un grupo fenotípicamente heterogéneo (Alsina & Blanch, 1994). Además, se ha comprobado que este grupo contiene elementos genéticos móviles tales como los bacteriófagos (Cano-Gómez *et al.*, 2011) y ocurren importantes eventos de recombinación entre ellas (Urbanczyk *et al.*, 2014), contribuyendo a la adquisición de nuevas características fenotípicas. Por lo anterior, es difícil identificar cepas de *V. harveyi* solo con pruebas convencionales. Aunque se han propuesto caracterizaciones bioquímicas más completas para diferenciar *Vibrio* spp estrechamente relacionado (Dunlap & Urbanczyk, 2013), estas pueden ser poco confiables dada la variabilidad en los rasgos.



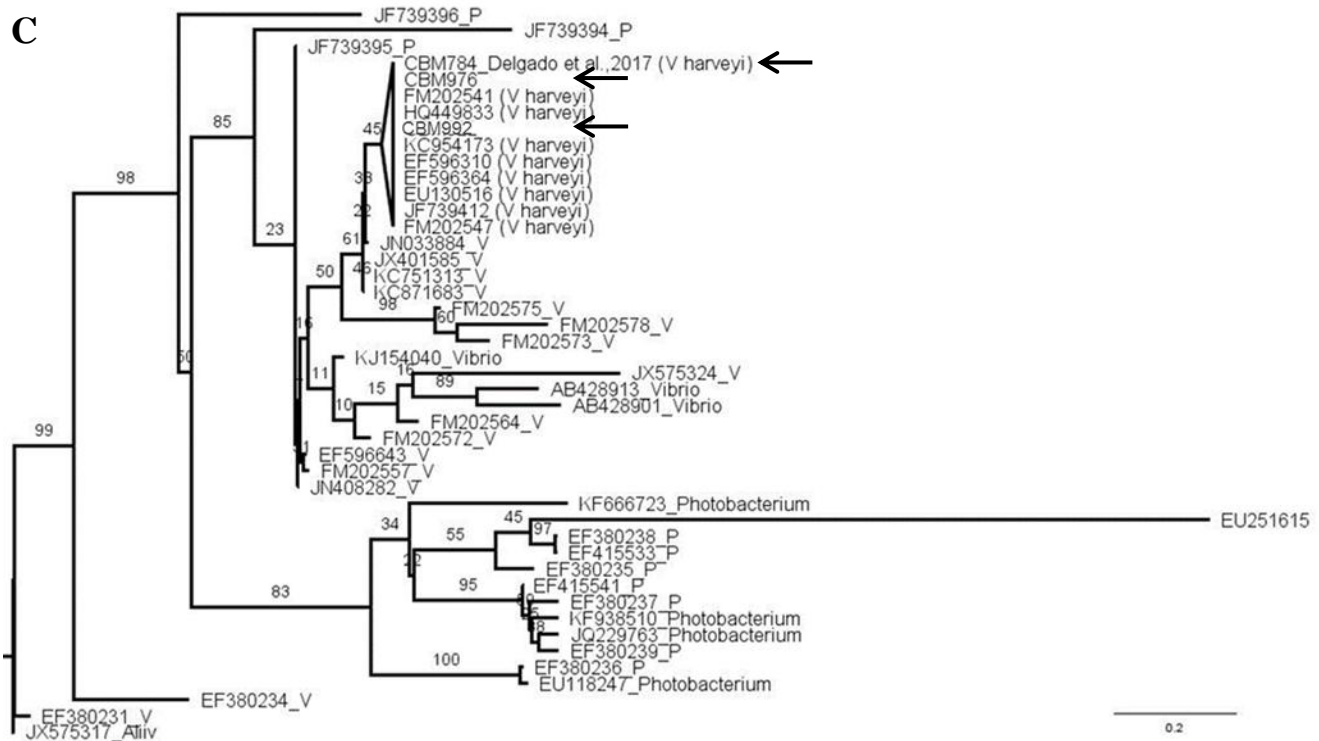


Figura 3. Árbol filogenético construido con el método de máxima verosimilitud usando las secuencias parciales de A) gen ribosomal 16S RNA, B) gen de la subunidad beta girasa (*gyrB*) y C) gen de la urilidato quinasa (*pyrH*) obtenida del GenBank. Las secuencias de los aislados se identifican como CBM-784, CBM-976 y CBM-992. Los números en las ramas indican el Bootstrap (porcentajes de 1000 permutaciones). Las ramificaciones con valor bootstrap inferior a 45% (1000 repeticiones) no fueron mostradas. *Shewanella* spp. y *Escherichia coli* se establecieron como grupos externos. Los números de acceso de GenBank se indican en cada rama.

Con respecto al posicionamiento filogenético de las cepas, el soporte de los nodos fue de 94% y 95% para los genes 16S rRNA y *gyrB*, respectivamente, asociado a *V. harveyi* incluyendo *V. rotiferianus* y *V. campbellii* mostró que las cepas están estrechamente relacionadas. El grupo Harveyi consiste de cinco especies muy relacionadas según Urbanczyk *et al.* (2013) y Cano-Gómez *et al.* (2015). Estos autores encontraron una estrecha relación entre el número de eventos de recombinación entre especies y la identidad genómica general, como se deduce de la identidad de nucleótidos promedio (ANI). La relación entre el ANI y el número de eventos de recombinación entre especies detectados fue comparable cuando analizaron cepas aisladas con más de 80 años de diferencia, procedentes de diferentes hemisferios y variados ecosistemas, así como en cepas aisladas de la misma ubicación geográfica dentro de un corto tiempo (Urbanczyk *et al.*, 2014). Por otro lado, la topología basada en el gen codificador de la proteína *pyrH* reveló un grupo con un soporte de nodo del 99% que permite identificar a los aislados CBM-784, CBM-976 y CBM-992 como *V. harveyi* (Figura 3). Sin embargo, el

uso único del gen uridilato quinasa no es adecuado para la identificación de especies dentro del clado Harveyi (Pascual *et al.*, 2010). Los eventos de recombinación en bacterias son posibles, generando errores en la agrupación, por esta razón, se recomiendan al menos cinco genes de limpieza en el análisis de secuencia multilocus (MLSA) (Cano-Gómez *et al.*, 2011).

Algunos estudios basados en la caracterización fenotípica de bacterias luminiscentes informan a *V. harveyi*, *V. fischeri*, y *P. leiognathi* como especies frecuentemente encontradas en aguas costeras templadas y tropicales (Chiu *et al.*, 2007).

En Cuba han sido descritas especies como *P. phosphoreum*, *V. harveyi* y *V. splendidus* en las aguas oceánicas al sur de la isla, mientras en las aguas de la plataforma noroccidental fue informada solo la especie *P. leiognathi* (Lugioyo, 2003, Pérez, 2013).

Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados

En la literatura se describen diversos medios para el crecimiento y emisión de luz en bacterias luminiscentes (Baumann & Baumann, 1981, Ramahian & Chandramohan, 1994, Danyluk *et al.*, 2007), por lo que resulta de interés seleccionar el que favorece el crecimiento de los aislados a fin de seleccionar las condiciones en que se ejecutaran el resto de los ensayos.

La Figura 4 muestra las curvas de crecimiento y luminiscencia de los aislados a 28 ± 1 °C y 160 r·min⁻¹ en los medios de cultivo Boss, Chalk, LM y Zobell. Los gráficos presentan curvas típicas de cultivos discontinuos o batch que varían en respuesta al medio de cultivo, aunque no son apreciables las fases de latencia en los medios evaluados. La ausencia de esta fase puede deberse a una rápida adaptación debido a las similitudes entre los medios de cultivo empleados para la fermentación en cuanto a salinidad y pH, así como los intervalos de medición seleccionados (Figura 4).

La fase exponencial en los tres cultivos evaluados duró aproximadamente 6 h en las fermentaciones realizadas alcanzándose a las 8 h los máximos valores de crecimiento de toda la curva, en el caso del medio Chalk esta fase se prolongó por al menos 8 h. Estas valoraciones se corresponden con los valores de μ determinados para cada medio (Tabla X).

En la Figura 4 se muestra como a las 4 h los cultivos eran capaces de emitir luz en los medios LM, Chalk y Boss, aunque en Zobell la luminiscencia solo fue detectable a partir las 6 h. En todos los medios las intensidades máximas de luz ocurrieron a las 6 h de cultivo, siendo significativamente superiores al final de la fase exponencial o inicio de la fase estacionaria en los medios LM y Zobell en todos los aislados (Figura 4). En el caso particular del medio LM se ratifica su efectividad en estudios

fisiológicos para el crecimiento y luminiscencia de bacterias marinas ya que fue uno de los primeros medios de cultivo utilizados en el cultivo de microorganismos luminiscentes (Baumann & Baumann, 1981).

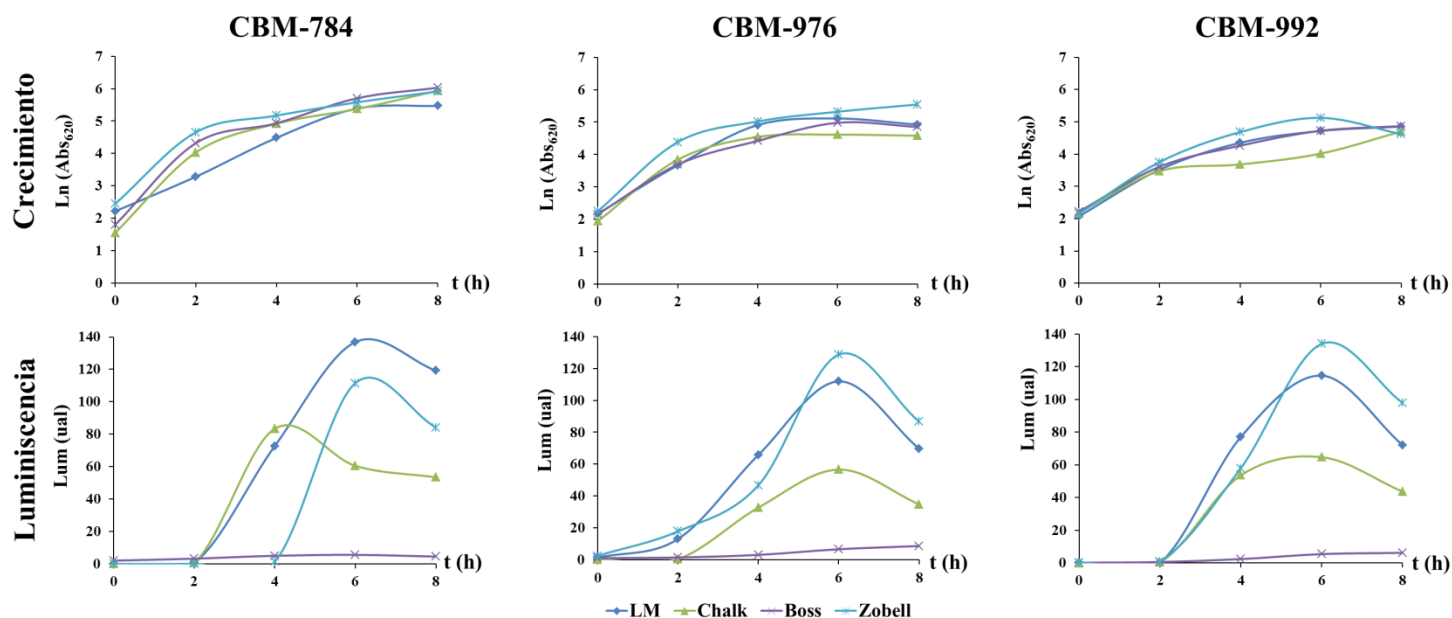


Figura 4. Influencia de la composición de los medios de cultivo en el crecimiento (primera fila) y la luminiscencia (segunda fila) de los aislados, cultivados a 28 °C, pH 7 y 160 r·min⁻¹.

Por otra parte, las máximas intensidades de luz se obtuvieron durante el final de la fase exponencial o inicio de la fase estacionaria y coinciden con lo encontrado en la literatura por otros autores (Meighen, 1993, Ramahian & Chandramohan, 1994, Soto & Gutierrez, 2009). Krieg & Holt (1984) los cuales plantean que en el principio de la fase estacionaria del crecimiento se obtiene la máxima luminiscencia, pero pasado este punto se ha comprobado que disminuye rápidamente. Otros estudios han demostrado que cuando se alcanza cierto nivel de luminiscencia la síntesis de la enzima cesa y comienza la inactivación de ésta, sin embargo no se limita su crecimiento (Soto & Gutierrez, 2009). Estos análisis nos permiten fijar el tiempo de experimentación relacionado con la intensidad de la luminiscencia en el entorno de las 6 h de cultivo.

Los tres aislados cuando se observan en la oscuridad emiten una luz de color verde-azulada. En general, los máximos de emisión de luz en las bacterias luminiscentes marinas descritas en la literatura se encuentran sobre los 490 nm (Makiguchi *et al.*, 1979, Dunlap, 2014). Los espectros de emisión obtenidos en las mediciones realizadas describen una curva gaussiana típica de este tipo de ensayo (Ramahian & Chandramohan, 1994, Chee *et al.*, 2010). El pico máximo de emisión se observó a los 476 ± 5 , 479 ± 6 y 483 ± 3 nm para CBM-784, CBM-976 y CBM-992, respectivamente.

Tabla X. Influencia de la composición de los medios de cultivo en los valores de μ y la luminiscencia máxima de los aislados, cultivados a 28 °C, pH 7 y 160 r·min⁻¹.

Medio de Cultivo	CBM-784		CBM-976		CBM-992	
	μ (h ⁻¹)	Lum máx (ual·mL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Lum máx (ual·mL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Lum máx (ual·mL ⁻¹)
Boss	0,62 ± 0,01 ^a	5,58 ± 1,16 ^c	0,46 ± 0,02 ^{bc}	6,71 ± 0,82 ^c	0,51 ± 0,01 ^{bc}	5,40 ± 2,32 ^c
Chalk	0,62 ± 0,03 ^a	60,51 ± 4,78 ^b	0,44 ± 0,04 ^d	56,63 ± 5,53 ^b	0,37 ± 0,06 ^d	64,66 ± 8,04 ^b
LM	0,54 ± 0,01 ^{bc}	136,87 ± 11,70 ^a	0,50 ± 0,01 ^{ab}	111,86 ± 10,58 ^a	0,57 ± 0,03 ^{ab}	114,51 ± 10,07 ^a
Zobell	0,50 ± 0,05 ^c	111,55 ± 10,56 ^a	0,61 ± 0,02 ^a	128,67 ± 10,34 ^a	0,63 ± 0,01 ^a	133,94 ± 11,57 ^a

Existen investigaciones que refieren de la existencia de proteínas accesorias fluorescentes que tienden a desplazar el máximo de emisión. Por ejemplo, Makiguchi *et al.* (1979) informan la máxima luminiscencia para *P. phoshoreum* MT-10208 a 470 nm. Se ha descrito en *V. fisheri* Y-1 la existencia de una proteína fluorescente amarilla (YFP) que provoca la emisión de luz de color amarillo con un máximo a una longitud de onda de 450 nm (Eckstein *et al.*, 1990). Además, Yoshizawa *et al.* (2012) informan por primera vez en especies del género *Vibrio* la existencia de una proteína fluorescente azul causante del desplazamiento del pico máximo de emisión hacia los 472 nm.

En los medios de cultivo Zobell y LM, incluso en su fase de máxima luminiscencia, no fue visible la luz hasta ser agitados. Luego de efectuada la agitación, la emisión de luz retornó a valores cercanos a cero en un período de tiempo relativamente corto, que osciló desde unos pocos segundos hasta alrededor de un minuto. La superficie del medio de cultivo fue el área que permaneció iluminada por más tiempo, indicando que la falta de oxígeno inhibe la producción de luz. Este fenómeno se debe a que la reacción requiere la presencia de oxígeno molecular para la producción de un fotón de luz (Egland & Greenberg, 2001).

Finalmente, como los resultados sobre medios de cultivos fueron similares para LM y ZoBell, se decidió seleccionar el medio LM para realizar el resto de los experimentos de fisiología ya que este medio de cultivo presenta en su composición glicerol y CaCO₃ que son inductores de la luminiscencia.

Influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la luminiscencia

El comportamiento del crecimiento y la luminiscencia de las cepas a 5, 15, 25, 27, 28, 29, 30 y 37 °C mostró diferencias significativas en los valores de densidad óptica aparente (DO) (p=0,05 y n=72) y de emisión de luz (p=0,05 y n=72) (Figura 5 y Tabla XI).

El máximo valor de crecimiento se observó en los cultivos a 27 °C (6,010 ± 0,164) a las 6 h. Mientras a temperaturas de 5 y 15 °C no se aprecia incremento en la población para ninguno de los aislados. Las

tres cepas mostraron su máxima intensidad de luminosa a los de 28 °C, a las 6 h de iniciado el cultivo (Figura 5). En las temperaturas de 30 y 37 °C a pesar de mostrar elevadas velocidades de crecimiento, la intensidad de emisión de luz fue baja o prácticamente indetectable (Tabla XI).

En la Figura 6 se puede apreciar la influencia de la temperatura sobre la μ , utilizando la ley de Arrhenius. Como se puede observar, se produce un aumento significativo de la velocidad específica de crecimiento mientras aumenta la temperatura hasta 28 °C, a partir de ese momento los valores de μ no varían significativamente ($p=0,05$ y $n=9$).

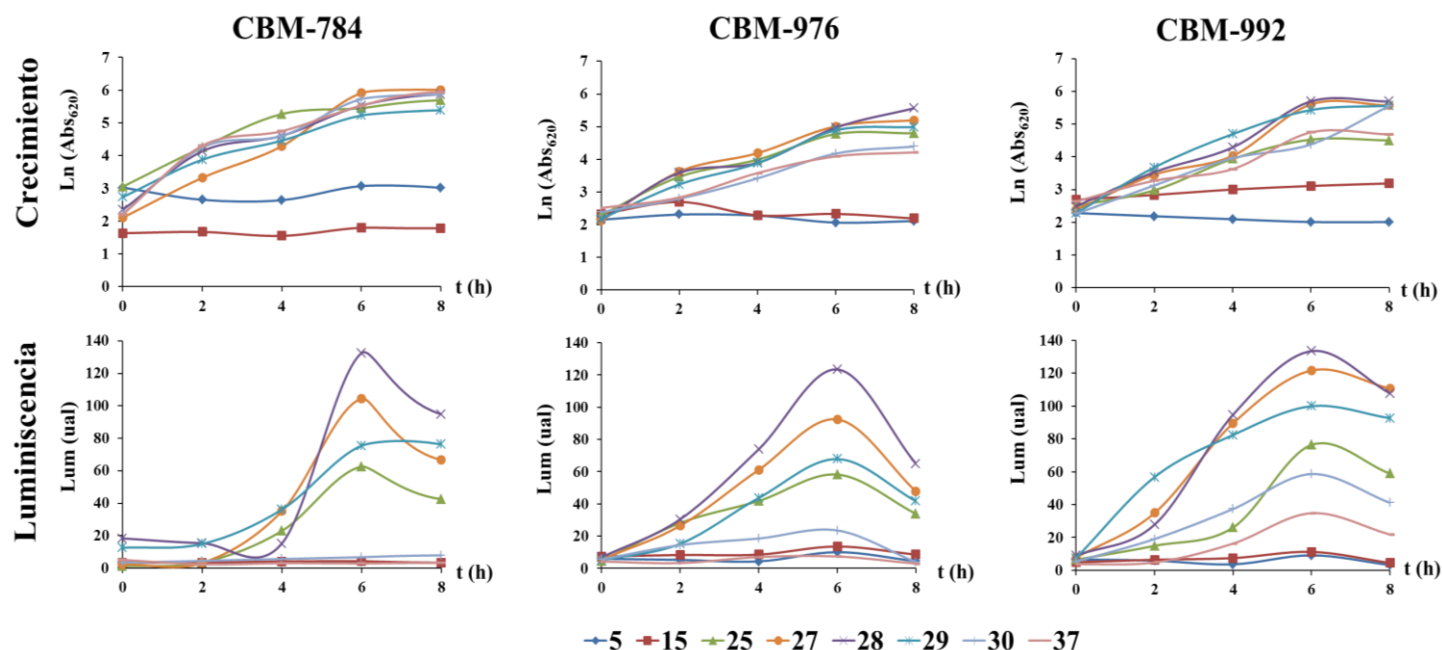


Figura 5. Influencia de la variación de temperatura en el crecimiento y la luminiscencia de los aislados, cultivados en medio LM a pH 7 y 160 r·min⁻¹.

Los parámetros de la ecuación de Arrhenius calculados en la zona de velocidad ascendente permitieron determinar los valores correspondientes a la energía de activación de estas bacterias para llevar a cabo su crecimiento poblacional.

Estos resultados demuestran que al aumentar la temperatura, se incrementa la μ de estos cultivos, en correspondencia con la ley de Arrhenius. Sin embargo, esto no se cumple en todo el rango de temperaturas como en las reacciones de síntesis química. Solo entre los 27 y 28 °C (300 y 301 K, respectivamente) este microorganismo desarrolló mejor sus potencialidades fisiológicas, con mayor capacidad de multiplicación a los 27 °C y mejor emisión de luz a los 28 °C en relación al resto de las temperaturas ensayadas.

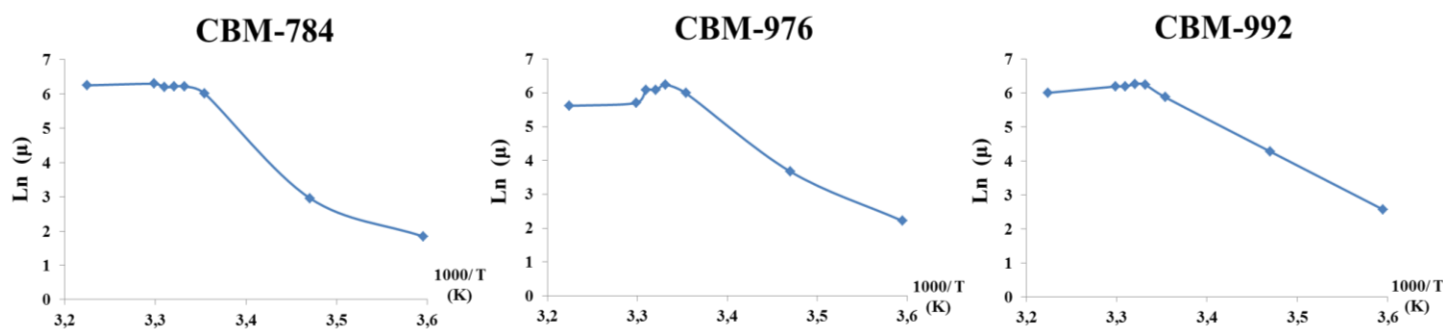


Figura 6. Influencia de la variación de temperatura en la velocidad específica de crecimiento (μ) en función de la temperatura según la ley de Arrhenius, empleando medio LM a $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ y pH 7. (T expresada en Kelvin, ver Tabla XI).

La disminución de los valores de μ a temperaturas superiores de $27 \text{ }^\circ\text{C}$ para CBM-784 y CMB-992 y $28 \text{ }^\circ\text{C}$ para CBM-976, puede estar dado a que las células contienen moléculas orgánicas complejas como proteínas y enzimas que pueden inactivarse con aumentos de temperatura e inhibir procesos metabólicos esenciales involucrados en el crecimiento celular.

Tabla XI. Influencia de la temperatura en los valores de μ de los aislados de bacterias luminiscentes, cultivadas en medio LM, pH 7 y $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$.

T($^\circ\text{C}$)	CBM-784		CBM-976		CBM-992	
	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Lum max ($\text{ual}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Lum max ($\text{ual}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Lum max ($\text{ual}\cdot\text{mL}^{-1}$)
5	$0,01 \pm 0,02^e$	$3,88 \pm 0,07^e$	$0,01 \pm 0,01^e$	$10,00 \pm 3,02^e$	$0,01 \pm 0,01^e$	$9,14 \pm 3,16^f$
15	$0,02 \pm 0,01^e$	$4,29 \pm 0,23^e$	$0,04 \pm 0,01^e$	$13,52 \pm 3,35^{de}$	$0,07 \pm 0,06^e$	$11,23 \pm 3,68^f$
25	$0,31 \pm 0,04^c$	$62,59 \pm 3,91^d$	$0,40 \pm 0,02^b$	$58,16 \pm 8,74^c$	$0,35 \pm 0,01^{bc}$	$76,33 \pm 7,63^c$
27	$0,50 \pm 0,05^a$	$104,47 \pm 9,97^b$	$0,51 \pm 0,02^a$	$92,38 \pm 5,03^b$	$0,51 \pm 0,02^a$	$121,61 \pm 6,61^a$
28	$0,50 \pm 0,04^a$	$132,56 \pm 1,59^a$	$0,47 \pm 0,04^{ab}$	$123,37 \pm 3,55^a$	$0,52 \pm 0,01^a$	$133,41 \pm 8,11^a$
29	$0,49 \pm 0,04^a$	$75,47 \pm 6,78^c$	$0,44 \pm 0,01^b$	$67,78 \pm 9,99^c$	$0,49 \pm 0,02^a$	$99,87 \pm 8,23^b$
30	$0,34 \pm 0,01^{bc}$	$6,77 \pm 1,33^e$	$0,30 \pm 0,02^c$	$23,45 \pm 7,65^d$	$0,48 \pm 0,03^a$	$58,58 \pm 4,84^d$
37	$0,22 \pm 0,02^d$	$2,86 \pm 0,78^e$	$0,17 \pm 0,01^d$	$7,33 \pm 5,90^e$	$0,40 \pm 0,01^b$	$34,75 \pm 2,71^e$
Óptimo	$29,69 \pm 1,58$		$29,70 \pm 1,48$		$30,08 \pm 1,71$	

Numerosos autores plantean que la temperatura es importante tanto para el crecimiento como para la luminiscencia, pues la enzima responsable de este fenómeno (luciferasa) es termolábil (Meighen, 1993, Soto & Gutierrez, 2009). En otros estudios relacionados con la influencia de la temperatura en el crecimiento y la producción de metabolitos se ha encontrado, independientemente del modelo utilizado, un intervalo de temperatura en el que las condiciones fisiológicas se ven favorecidas y donde se obtienen los valores máximos de crecimiento y producción, existiendo una zona en la cual la actividad metabólica se ve restringida (Ortiz, 2004, Madigan *et al.*, 2012).

De acuerdo a la respuesta de los aislados frente a diferentes temperaturas pudimos demostrar que la

temperatura de 27 °C resulta la más favorable para el crecimiento, sin embargo, el complejo enzimático involucrado en la luminiscencia resulta más activo a los 28 °C.

Los resultados anteriores nos demuestran como la luminiscencia de estas cepas se favorece a temperaturas entre 27 y 28 °C, lo que pudiera estar relacionado con el rango de temperaturas de las aguas de la plataforma NW cubana, de donde fueron aisladas. Por lo que se puede considerar que la zona de crecimiento óptimo y emisión de luz se encuentra entre los 27 y 28 °C. El rango óptimo encontrado en este estudio para el crecimiento y la luminiscencia se encuentra dentro de los reportados por otros autores para bacterias luminiscentes marinas aisladas de otras latitudes (Bagordo *et al.*, 2012). (Ramahian & Chandramohan, 1994) encontraron para cuatro especies diferentes de bacterias luminiscentes aisladas del Mar Árabe (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. leiognathi* y *P. phosphoreum*) valores máximos de crecimiento a temperaturas alrededor de los 30 °C, excepto para *P. phosphoreum*, que su máximo crecimiento fue alrededor de los 25 °C, demostrando su carácter psicrófilo. Mientras que Ruangsri *et al.* (2004) encontraron temperaturas óptimas de crecimiento en agua de mar de *V. harveyi* asociados a camarones en un rango más amplio de entre 25 y 32 °C.

Lugioyo *et al.* (1994) al analizar la influencia de la temperatura en el crecimiento de 20 cepas de bacterias luminiscentes, aisladas de la plataforma noroccidental y Zona Exclusiva Económica al Sur de Cuba, encontraron que estas bacterias eran capaces de crecer en un amplio rango de temperatura, obteniendo los mayores valores de crecimientos entre 28 y 30 °C. Sin embargo, a temperaturas entre 35 y 40 °C el crecimiento disminuyó. A temperatura ambiente (28-30 °C) la intensidad de la emisión de luz disminuyó con relación a las temperaturas más bajas ensayadas; a 40 °C la luminiscencia en todas las cepas fue negativa.

Todos estos estudios coinciden en que la temperatura no influye de forma similar en el crecimiento y la emisión de luz de las bacterias luminiscentes, como lo encontrado en nuestra investigación. Lo que a su vez, significa que la producción máxima de la enzima luciferasa no ocurre vinculada directamente con el máximo de crecimiento celular (Lugioyo *et al.*, 1994).

Influencia del pH sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados

Los máximos valores de crecimiento bacteriano se obtuvieron a las 6 h de cultivo a pH entre 7 (CBM-976) y 8 (CBM-784 y CBM-992), al final de la fase exponencial. Las cepas en general mostraron una amplia tolerancia a pH entre 7 y 9, sin embargo no fueron capaces de crecer a los pH más ácidos evaluados como 2, 3 y 5 (Figura 7).

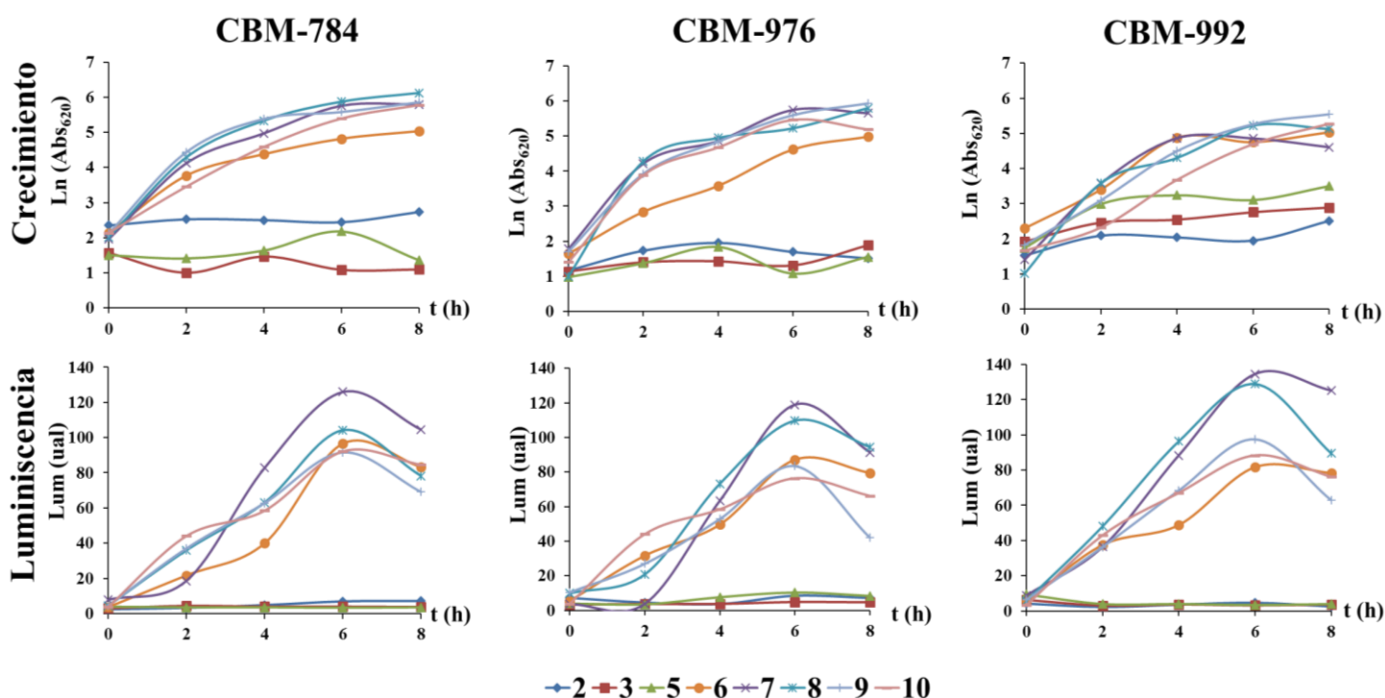


Figura 7. Influencia de la variación de pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados, cultivados en LM a 28 °C y 160 r·min⁻¹.

En las curvas de crecimiento descritas por las cepas analizadas entre los pH 6 y 10 no se pudo observar la fase de latencia (Figura 7). Lo cual pudiera relacionarse con las elevadas velocidades de crecimiento de los microorganismos y además porque el medio empleado para los preinóculos fue el mismo en todo los casos. Por estas razones las bacterias probablemente estuvieran adaptadas, lo cual constituiría un factor importante en el acortamiento de la etapa de latencia (Martínez *et al.*, 1989).

La emisión de luz de la cepa CBM-784 frente a pH 7 resultó significativamente superior al resto de los pH evaluados. En los casos de las CBM-976 y CBM-992 los pH 7 y 8 no presentaron diferencias significativas y a su vez resultaron estadísticamente diferentes al resto de los valores ensayados ($p=0,05$ y $n=72$). A pH ácidos (2, 3 y 5) no hubo emisión de luz, ya que no hubo crecimiento aparente. Por el contrario, a pH entre 7 y 9 exhibieron intensidades de luz más elevadas (Figura 7).

La mayor intensidad de luminiscencia se alcanzó a pH 7 en todos los cultivos con valores de $135,93 \pm 7,31$; $118,97 \pm 5,73$ y $134,50 \pm 8,59$ ual (CBM-784, CBM-976 y CBM-992, respectivamente) a los 6 h de crecimiento. Es importante destacar que a ese tiempo se midieron las máximas intensidades de luz en todos los pH ensayados (Tabla XII).

Tabla XII. Influencia del pH en los valores de μ de los aislados de bacterias luminiscentes y sus óptimos en la zona de estudio calculados empleando el modelo de los polinomios ortogonales, cultivadas en medio LM, pH 7 y 160 r·min⁻¹.

pH	CBM-784		CBM-976		CBM-992	
	μ (h ⁻¹)	Lum max (ual·mL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Lum max (ual·mL ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	Lum max (ual·mL ⁻¹)
2	0,01 ± 0,01 ^d	7,16 ± 0,05 ^d	0,09 ± 0,01 ^d	8,49 ± 1,91 ^e	0,06 ± 0,03 ^d	4,69 ± 2,17 ^e
3	0,02 ± 0,01 ^d	4,56 ± 3,97 ^e	0,03 ± 0,02 ^d	4,85 ± 1,20 ^e	0,13 ± 0,03 ^d	3,23 ± 1,80 ^e
5	0,11 ± 0,03 ^d	3,55 ± 0,02 ^e	0,04 ± 0,01 ^d	10,33 ± 3,72 ^d	0,23 ± 0,04 ^d	3,44 ± 1,86 ^e
6	0,43 ± 0,06 ^{bc}	96,58 ± 2,48 ^{bc}	0,48 ± 0,03 ^b	87,18 ± 7,34 ^b	0,40 ± 0,01 ^{bc}	81,65 ± 9,04 ^{cd}
7	0,61 ± 0,02 ^a	135,93 ± 7,65 ^a	0,63 ± 0,05 ^a	118,97 ± 5,74 ^a	0,58 ± 0,01 ^{ab}	134,50 ± 8,59 ^a
8	0,63 ± 0,03 ^a	104,21 ± 4,65 ^b	0,67 ± 0,03 ^a	109,76 ± 8,48 ^{ab}	0,67 ± 0,02 ^a	128,76 ± 6,35 ^{ab}
9	0,57 ± 0,03 ^{ab}	91,56 ± 6,48 ^c	0,63 ± 0,03 ^{ab}	83,43 ± 9,13 ^{bc}	0,59 ± 0,01 ^{ab}	97,43 ± 9,87 ^{bc}
10	0,54 ± 0,05 ^b	92,12 ± 5,14 ^c	0,65 ± 0,03 ^{ab}	76,42 ± 8,74 ^c	0,52 ± 0,02 ^b	88,35 ± 4,40 ^c
Óptim	8,51 ± 0,14		8,70 ± 0,05		8,50 ± 0,14	

La Figura 8 muestra la dependencia de la velocidad específica de crecimiento (μ) con relación al pH inicial del medio, basada en el modelo de los polinomios ortogonales. Se aprecia que μ varía de forma significativa con los cambios de pH inicial. El valor de μ aumenta a medida que aumenta el pH inicial hasta el rango de pH 7-9 y luego se observa un ligero descenso de μ con el pH 10 excepto para CBM-976 que no presenta diferencias en el rango entre 7 y 10. Por tanto se observa una zona óptima para valores de pH entre 7 y 9.

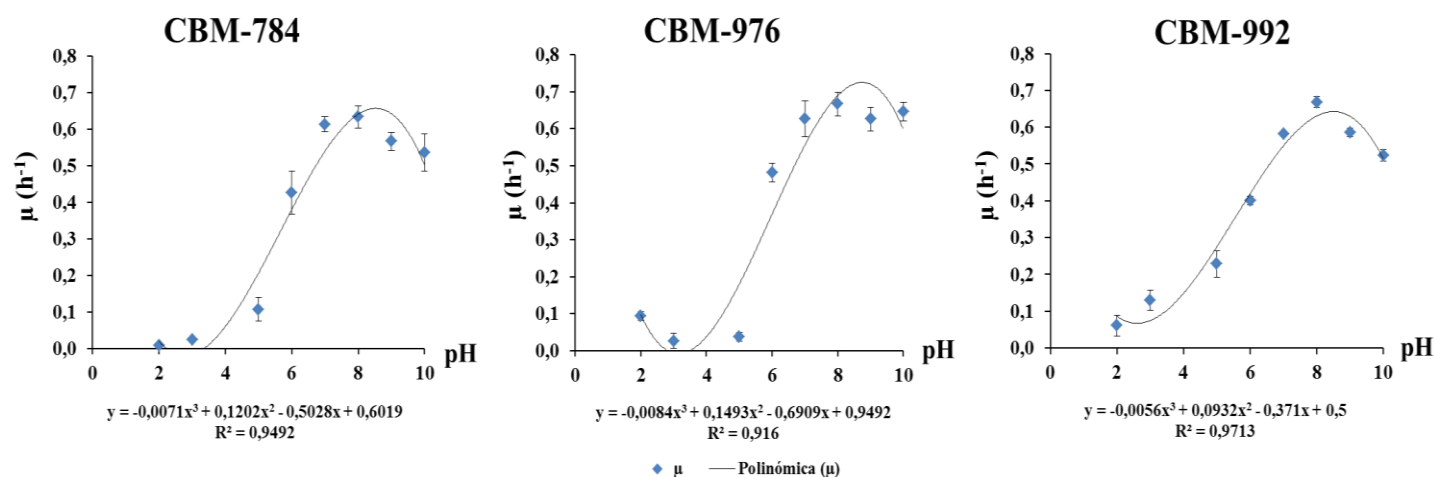


Figura 8. Influencia de la variación del pH sobre la μ de la cepa CBM-784 en medio LM en zaranda a 28 °C y 160 r·min⁻¹.

Los valores óptimos de pH según el modelo de los polinomios ortogonales en las cepas CBM-784, CBM-976 y CBM-992 (8,51 ± 0,14; 8,70 ± 0,05 y 8,50 ± 0,14; respectivamente) se corresponden con el hábitat de aislamiento ya que el pH de las aguas marinas cubanas oscila entre 7-8 (Lluis-Riera, 1972) (Figura 8, Tabla XII).

Los rangos óptimos de pH obtenidos para estas bacterias están dentro de los informados en la literatura especializada del tema. Por ejemplo, Kumar *et al.* (2015), determinó que el crecimiento óptimo de aislados de bacterias luminiscentes de diferentes especies se encontraba entre pH 7 y pH 9 al analizar el efecto de algunos factores que influyen en la luminiscencia de 20 cepas aisladas de la bahía de Bengala. Tanto en este último estudio como para los aislados CBM-784, CBM-976 y CBM-992 se ha demostrado que la luminiscencia en medio líquido no es afectada significativamente por cambios de pH en las proximidades del rango óptimo de cada cepa. Por otra parte, Ramahian & Chandramohan (1994) encontraron que el crecimiento máximo para cuatro especies de bacterias luminiscentes fue a pH 7; sin embargo, a pH superiores (9 y 10) el crecimiento disminuía significativamente, similar a los resultados encontrados para CBM-784 y CBM-992. En el caso de CBM-976 entre pH 7 y 10 no se presentaron diferencias significativas ($p=0,05$; $n=8$)

En general, podemos concluir que el rango de pH entre 7 y 9 es adecuado para el crecimiento de las cepas, ya que no hubo diferencias significativas ($p=0,05$; $n=72$) entre las velocidades específicas de crecimiento y las intensidades de luz en este rango.

Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados

Los aislados mostraron una amplia tolerancia a la variación de la concentración de NaCl en el medio de cultivo (Figura 9).

Los altos valores de DO obtenidas en el rango de salinidad entre 1 y 5% no mostraron diferencias significativas, Sin embargo, a bajas concentraciones (1%) las cepas fueron capaces de emitir luz (Figura 9, Tabla XIII).

La luminiscencia de la cepa CBM-784 mostró una mayor sensibilidad a los cambios de salinidad que el crecimiento bacteriano con relación a las otras dos cepas. Las máximas intensidades de luz se registraron a la concentración de 3,5% de NaCl a las 6 h, el cual resultó significativamente superior al resto de las salinidades evaluadas. El análisis de la μ con respecto a la concentración de NaCl en el medio de cultivo, mostró diferencias significativas entre las salinidades evaluadas (Figura 10).

El valor de la μ aumenta de forma significativa a medida que se incrementa la concentración de NaCl, excepto en el medio con ausencia de NaCl (0%), donde no se aprecia crecimiento para ninguno de los aislados. Los tres aislados muestran su dependencia a la presencia de NaCl en el medio de cultivo al no manifestar ni crecimiento ni luminiscencia en ausencia del mismo.

Es importante señalar que las μ obtenidas entre 2 y 4% son similares estadísticamente (Figura 10). Luego de aplicar el análisis matemático al modelo se obtuvo que los valores óptimos de concentración

de NaCl para el crecimiento de CBM-784, CBM-976 y CBM-992 se corresponden con el $3,57 \pm 0,08$; $3,63 \pm 0,10$ y $3,69 \pm 0,09$ %, respectivamente.

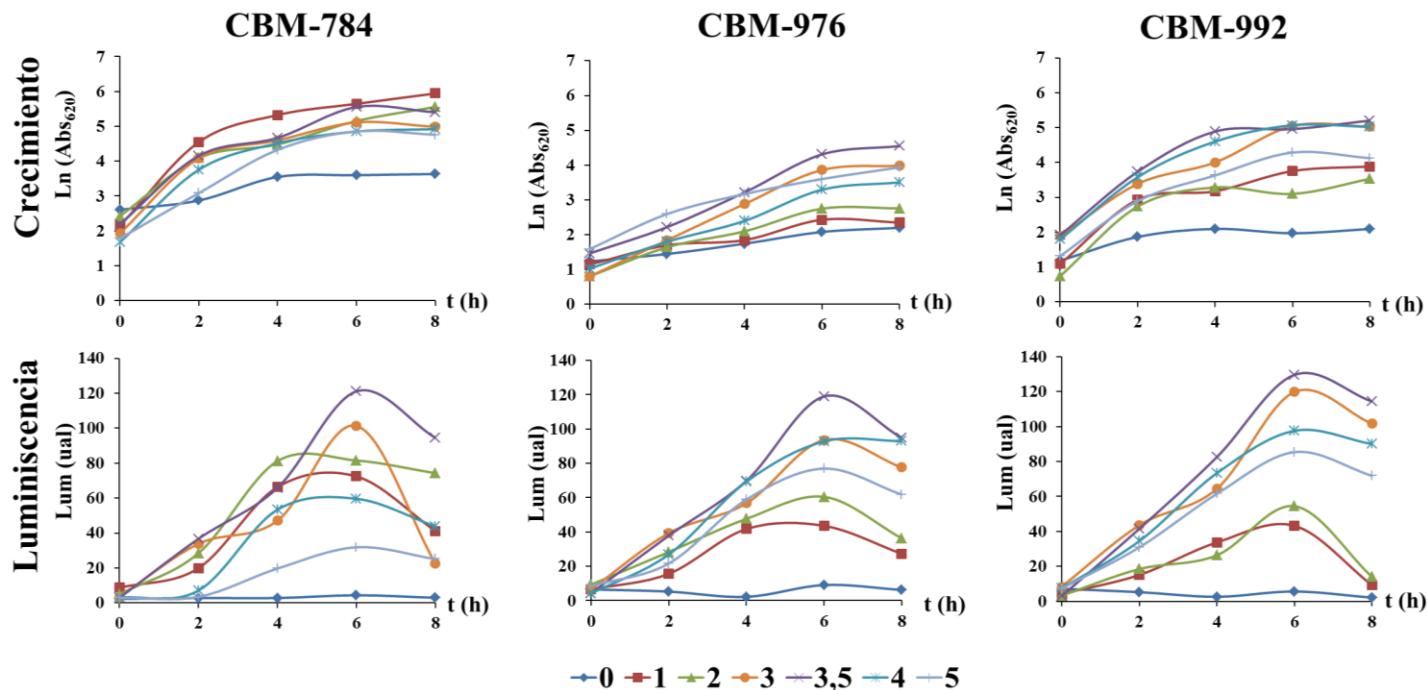


Figura 9. Influencia de la variación de la concentración de NaCl (%) en el medio de cultivo sobre el crecimiento y la luminiscencia de los aislados, cultivados en medio LM a 28 °C, pH 7 y 160 r·min⁻¹.

Los rangos óptimos de salinidad detectados en el crecimiento de las cepas estudiadas resultan similares a los encontrados para bacterias luminiscentes marinas aisladas de diferentes latitudes. Walters & Lloyd (1985) en un estudio realizado en Japón con tres especies de bacterias luminiscentes (dos simbioses: *P. phosphoreum* y *P. leiognathi*, y un aislado de agua de mar *V. fischeri*,) encontraron que todas eran capaces de crecer a concentraciones de NaCl entre 0,9 y 3%, sin embargo, a concentraciones por debajo de 1% no fue observada luminiscencia en *P. leiognathi* y *P. phosphoreum*. En cambio las cepas de *V. fischeri* fueron capaces de crecer y emitir luz en todo el rango de salinidad evaluado.

Soto & Gutierrez (2009) observaron en cepas de *V. fischeri* aisladas de diversos nichos ecológicos (simbioses y de vida libre) como crecían en un rango de concentraciones desde 1 hasta 7% de NaCl.

Otros autores como Ramahian & Chandramohan (1994) proponen 3% de NaCl como valor óptimo de NaCl para el crecimiento de cepas de las especies *V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. phosphoreum* y *P. leiognathi*, aisladas del Mar Árabe. Asimismo, resulta de gran interés que las especies evaluadas por estos investigadores no crecieron en ausencia de NaCl en el medio de cultivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos con los cultivos aislados de la plataforma marina cubana.

Tabla XIII. Influencia de la salinidad en los valores de velocidad específica de crecimiento (μ) de los aislados y sus óptimos en la zona de estudio calculados empleando el modelo de los polinomios ortogonales, cultivadas en medio LM, 28 °C, pH 7 y 160 r·min⁻¹.

Conc. NaCl (%)	CBM-784		CBM-976		CBM-992	
	μ (h ⁻¹)	Lum max (ual)	μ (h ⁻¹)	Lum max (ual)	μ (h ⁻¹)	Lum max (ual)
0	0,18 ± 0,07 ^d	4,39 ± 1,57 ^f	0,14 ± 0,01 ^d	9,01 ± 1,00 ^e	0,13 ± 0,03 ^d	5,69 ± 1,08 ^f
1	0,33 ± 0,03 ^c	72,43 ± 8,23 ^{cd}	0,20 ± 0,01 ^{cd}	43,52 ± 6,60 ^d	0,41 ± 0,01 ^b	43,23 ± 5,01 ^e
2	0,43 ± 0,01 ^b	81,58 ± 4,69 ^c	0,32 ± 0,02 ^c	60,42 ± 7,77 ^c	0,38 ± 0,01 ^b	54,44 ± 6,30 ^{de}
3	0,50 ± 0,03 ^a	101,40 ± 3,55 ^b	0,51 ± 0,05 ^a	93,55 ± 4,67 ^{ab}	0,51 ± 0,02 ^a	119,76 ± 8,07 ^{ab}
3,5	0,53 ± 0,02 ^a	121,14 ± 9,55 ^a	0,48 ± 0,04 ^{ab}	118,97 ± 10,91 ^a	0,51 ± 0,01 ^a	129,55 ± 9,55 ^a
4	0,50 ± 0,01 ^a	59,63 ± 6,72 ^d	0,37 ± 0,03 ^{bc}	92,76 ± 9,63 ^{ab}	0,54 ± 0,02 ^a	97,56 ± 8,55 ^b
5	0,43 ± 0,01 ^b	31,88 ± 2,61 ^e	0,33 ± 0,03 ^c	76,86 ± 8,77 ^b	0,48 ± 0,01 ^{ab}	85,37 ± 7,24 ^c
Óptimo	3,57 ± 0,08		3,63 ± 0,10		3,69 ± 0,09	

Los resultados expuestos demuestran que el ión Na⁺ es imprescindible para el crecimiento y la luminiscencia de las bacterias luminiscentes aisladas y que el valor óptimo puede variar de una especie a otra; e incluso entre aislados de una misma especie proveniente de regiones o nichos ecológicos diferentes (Reichelt y Baumann, 1975, Nunes-Halldorson & Duran, 2003).

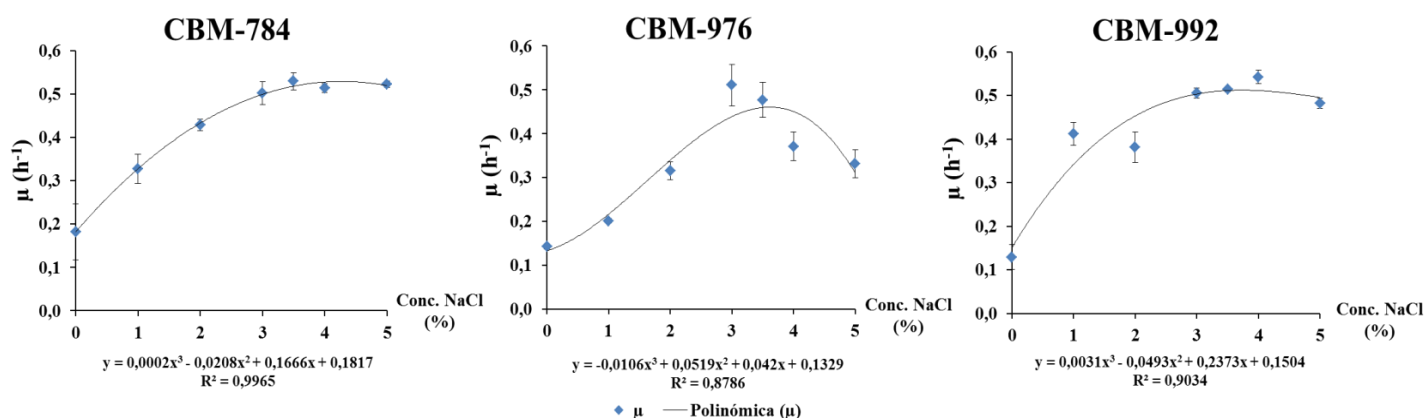


Figura 10. Influencia de la concentración de NaCl sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) de los aislados en medio LM a 28 °C, pH 7 y 160 r·min⁻¹.

Asimismo, los resultados obtenidos sobre la influencia de la temperatura, pH y concentración de NaCl en el crecimiento y la luminiscencia, permitieron proponer como mejores condiciones de cultivo para las tres cepas, temperaturas entre 27 y 28 °C, pH 7 y concentraciones de NaCl entre 3 y 3,5%.

La selección de estos parámetros para el cultivo y la máxima emisión de luz de las cepas permiten establecer las condiciones en las que se obtendrán los cultivos tanto para determinar su sensibilidad ante compuestos xenobióticos como de muestras naturales.

Efecto de diferentes compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de los aislados

Para evaluar el impacto de contaminantes al medio ambiente lo ideal es llevar a cabo tanto análisis físico-químicos como toxicológicos. Los primeros, por sí solos, no brindan información sobre la toxicidad de las muestras ambientales debido a que no valoran la interacción entre los xenobióticos y sus implicaciones para los sistemas vivos; además de ser más laboriosos, lentos y requerir de equipamiento altamente específico (de la Gala Morales, 2014).

Para un mejor entendimiento del perfil toxicológico de contaminantes ambientales, el impacto de estos compuestos debe ser evaluado preferentemente por organismos que representen diferentes niveles tróficos. En la mayoría de los sistemas acuáticos, el nivel trófico más importante en términos de flujo de energía y reciclaje de nutrientes lo constituyen las bacterias (Mansour, 2015). Por este motivo los ensayos microbianos han sido ampliamente utilizados en los tamizajes de toxicidad. Además por la similitud entre sus funciones bioquímicas y las de los organismos superiores, la facilidad de manipulación, el corto tiempo de exposición requerido y la reproducibilidad de los resultados interlaboratorios (Axelroda *et al.*, 2016). Si en una primera fase del tamizaje ambiental, no se detecta toxicidad mediante los bioensayos se evita la realización de análisis químicos por ser generalmente más complejos y costosos.

En especial se ha demostrado que el mecanismo de emisión de luz presente en algunas especies bacterianas es sensible a compuestos tóxicos, por lo que se han utilizado en pruebas ecotoxicológicas para evaluar la calidad de ambientes acuáticos (Perego *et al.*, 2002 , Lopez-Roldan *et al.*, 2012 , Girotti *et al.*, 2015). En 2003, Lugioyo *et al.* identificaron especies de bacterias luminiscentes en aguas de la plataforma cubana. A partir de estos antecedentes, el presente trabajo fue diseñado con el propósito de evaluar si tres cepas aisladas de la zona marino costera del norte de Cuba pueden ser empleadas como sensor de toxicidad.

El parámetro toxicológico que empleamos para evaluar la sensibilidad ante tóxicos es la concentración efectiva media (EC_{50}), el cual es ampliamente utilizado ya que indica la concentración a que se provoca la atenuación de la luminiscencia en un 50%

A continuación se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de nueve compuestos tóxicos sobre la luminiscencia de los aislados en las condiciones descritas anteriormente. En la Tabla XIV se muestran los valores de EC_{50} calculados a los 5 y 15 min de exposición.

El mercurio es uno de los elementos tóxicos más abundantes en la naturaleza (Jan *et al.*, 2016) y se encuentra entre los metales pesados cuyos efectos adversos sobre los organismos se encuentran bien documentado. Sin embargo, aún es muy usado con fines industriales en la producción de plásticos,

fungicidas, en la industria electrónica, tinción de pieles, impresión de telas, en fotografías, en reparaciones dentales, etc. (Vishnivetskaya *et al.*, 2011, Ayangbenro & Babalola, 2017).

En la Figura 11 se muestra como varía la intensidad de la luminiscencia de los aislados en respuesta a variaciones de la concentración de mercurio. Se puede observar que de modo general para una misma concentración la pérdida de la luminiscencia es mayor a los 15 min de exposición, a pesar de no presentar diferencias significativas ($p=0,05$ y $n=24$) al comparar los valores de EC_{50} a los diferentes tiempos de incubación. Los valores de EC_{50} obtenidos para el mercurio a 5 min (Tabla XIV) se encuentran en el orden de lo informado para una cepa de *P. leiognathi* aislada de aguas marinas cubanas (Stuart *et al.*, 1999) ($EC_{50-5min} = 0,21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y por debajo de los obtenidos por Cho *et al.* (2004) ($EC_{50-5min} = 1,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $EC_{50-15min} = 0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Estos últimos basaron su experimento en la utilización del ensayo Microtox con *V. fischeri* como organismo modelo.

Tabla XIV. Valores estimados de EC_{50} de los aislados de bacterias luminiscentes, basados en la atenuación de la intensidad de la luminiscencia a 5 y 15 min de exposición a los tóxicos ensayados.

Tóxico	EC_{50} a 5 min ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			EC_{50} a 15 min ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	CBM-784	CBM-976	CBM-992	CBM-784	CBM-976	CBM-992
HgCl₂	0,51 ± 0,07	0,57 ± 0,18	0,54 ± 0,27	0,43 ± 0,11	0,51 ± 0,08	0,39 ± 0,15
K₂Cr₂O₇	31,62 ± 5,29	35,43 ± 4,76	39,36 ± 1,62	28,6 ± 2,31	29,04 ± 2,98	33,44 ± 3,90
AgNO₃	63,93 ± 4,12	65,26 ± 5,22	39,85 ± 26,34	61,55 ± 5,09	60,03 ± 8,36	41,08 ± 31,01
CuSO₄	9,48 ± 3,37	13,75 ± 2,54	10,45 ± 3,34	9,28 ± 4,75	11,83 ± 3,27	8,81 ± 1,69
Fe₂(SO₄)₃	67,30 ± 3,22	74,62 ± 4,42	55,15 ± 7,47	47,36 ± 8,82	47,36 ± 5,13	43,81 ± 0,37
Cuproflow	11,78 ± 0,23	12,04 ± 0,87	10,64 ± 0,76	10,56 ± 0,29	10,54 ± 0,45	9,52 ± 0,25
Envidor	74,37 ± 6,22	80,45 ± 7,87	50,85 ± 5,21	69,64 ± 2,45	76,51 ± 6,51	48,44 ± 2,84
Kospi-sc 130	42,91 ± 3,29	44,16 ± 9,31	40,69 ± 4,02	36,18 ± 5,78	44,92 ± 9,38	38,73 ± 3,14
Sphere Max	39,69 ± 8,19	37,21 ± 8,01	39,62 ± 8,36	37,92 ± 4,31	36,81 ± 6,97	36,33 ± 6,29

La plata ha llegado a ser un metal ampliamente explotado y no sólo a nivel metalúrgico y en la joyería sino incluso para la medicina (Rodríguez & Gutiérrez, 2007). Este metal y sus derivados corresponden al grupo de compuestos reconocidos como biocidas (agentes con propiedades antibacterianas). Algunos autores han informado índices de toxicidad dependientes del tiempo de interacción de las células bacterianas con la suspensión de plata (Zarubina *et al.*, 2015), resultando en que a mayor tiempo de exposición es mayor la toxicidad. De modo que en nuestro estudio determinamos que a los 15 min de exposición la EC_{50} no varía significativamente ($p=0,05$ y $n=24$) con respecto a 5 min (Tabla XIV). Los valores de EC_{50} obtenidos para la plata a los 5 min de exposición coinciden con los obtenidos por Futra *et al.* (2014) ($60,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sin embargo, se encuentran por debajo de lo informado por Wie *et al.* (2012) ($EC_{50} = 12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

El cobre está ampliamente distribuido en la naturaleza y sus principales usos son fabricación de equipamiento eléctrico, materiales de construcción como techumbres y tuberías, maquinaria industrial, distintos tipo de aleaciones y la agricultura (Ashish *et al.*, 2013, Sánchez, 2013). Los análisis estadísticos de la EC_{50} del cobre tanto en forma de $CuSO_4$ o como oxiclórico de cobre (Cuproflow) demostraron que no existen diferencias significativas ($p=0,05$ y $n=48$) entre los tiempos de exposición a este metal.

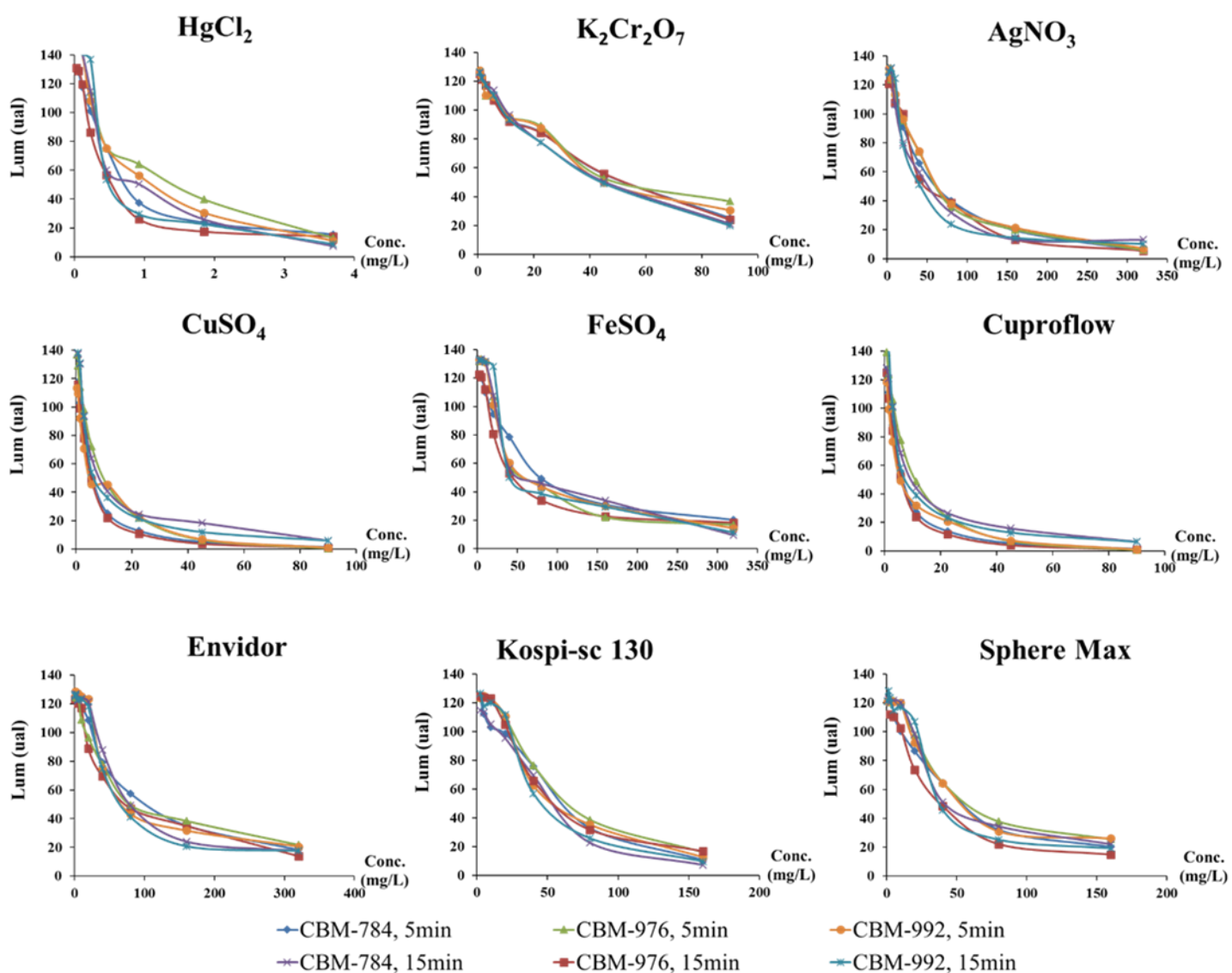


Figura 11. Influencia de la concentraciones de los compuestos tóxicos seleccionados sobre la sobre la intensidad de la luminiscencia de de los aislados a 5 y 15 min de exposición.

Futra *et al.* (2014) obtienen una $EC_{50-5min}$ para el cobre de $0,17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para una especie de *Aliivibrio fischeri*. Otros autores refieren valores similares a los detectados con los aislados de la plataforma marina cubana, como es el caso de los obtenidos por Cho *et al.* (2004) (para una cepa bacteriana

ingenierizada) ($EC_{50-5\text{min}} = 10,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $EC_{50-15\text{min}} = 9,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Lopez-Roldan *et al.* (2012) ($EC_{50-15\text{min}} = 10,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

El cromo es un elemento natural que se considera abundante en la corteza terrestre formando parte de gran cantidad de minerales (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013). Diversos compuestos de cromo son comunes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras, tales como cromado electrolítico, fabricación de explosivos, curtido de pieles, aleación de metales, fabricación de colorantes y pigmentos, etc. (Fulladosa *et al.*, 2006, Gutiérrez & Cervantes, 2008). Se puede observar en la Figura 11 las curvas de los aislados en respuesta a diferentes concentraciones de cromo (5 y 15 min de exposición) son muy similares; lo que se respalda con el hecho de que los valores de EC_{50} no presentan diferencias significativas entre los tiempos de exposición ($p=0,05$ y $n=24$) (Tabla XIV). Estos resultados coinciden con trabajos como el de Cho *et al.* (2004) ($EC_{50-5\text{min}} = 18,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $EC_{50-15\text{min}} = 17,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en que no se evidencian diferencias entre los tiempos de incubación. Los valores de EC_{50} mostrados por la cepa en estudio para Cr^{6+} se encuentran muy por debajo de los informados por otros investigadores. Tal es el caso de Villaescusa *et al.* (1997) ($EC_{50-5\text{min}}=1\ 164 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $EC_{50-15\text{min}} = 584 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y Lopez-Roldan *et al.* (2012) ($EC_{50-15\text{min}} = 190,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Esto evidencia la sensibilidad de esta cepa para la detección de cromo en muestras de agua.

El hierro es uno de los metales trazas más importantes para la vida. Actúa como cofactor de disímiles enzimas que intervienen en procesos metabólicos esenciales para la vida como: respiración, fotosíntesis, fijación de nitrógeno, metanogénesis, ciclo de la ácidos tricarbóxicos, transporte de oxígeno y regulación génica (Mackenzie *et al.*, 2008). A pesar de ser el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, se encuentra a muy bajas concentraciones en aguas superficiales marinas debido al bajo suministro externo y limitada biodisponibilidad (Westrich, 2015).

En la Figura 10 se muestra la poca variación de la intensidad de la luminiscencia de las cepas evaluadas en respuesta a diferentes concentraciones de hierro, coincidiendo con que no existen diferencias significativas ($p=0,05$ y $n=24$) entre las EC_{50} de los tiempos ensayados. Los valores de EC_{50} obtenidos para la exposición al hierro se encuentran por encima de los informados en la literatura, sugiriendo una menor sensibilidad del aislado a este mineral. Algunos autores plantean valores de EC_{50} de 15,9 y 16,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a los 5 y 15 min respectivamente (Cho *et al.*, 2004) y otros como Futra *et al.* (2014) refieren 70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a los 5 min y Lopez-Roldan *et al.* (2012) 52,08 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a los 15 min.

Los tóxicos correspondientes a tres plaguicidas ampliamente empleados en nuestro país (Envidor, Kospi-sc 130 y Sphere Max) han sido poco referidos en la literatura en cuanto a su acción inhibitoria de

la luminiscencia, por lo que estas evaluaciones resultan novedosas. Aunque de modo general, algunos autores plantean rangos de EC_{50} de entre 0,007 y 100 $mg \cdot L^{-1}$ (Fernández-Alba *et al.*, 2002) para pesticidas de variada naturaleza y en ambos casos empleando cepas de *V. fischeri*.

La entrada de compuestos tóxicos al interior celular es llevada a cabo fundamentalmente por los sistemas de regulación de cationes divalentes, debido a que las proteínas transmembranales son incapaces de distinguir entre estos compuestos y otros cationes divalentes necesarios para el crecimiento celular (Charrier *et al.*, 2010). La entrada de compuestos no-esenciales al interior celular a menudo involucra transportadores que intervienen en la adquisición de iones orgánicos e inorgánicos esenciales. Estos transportadores facilitan la entrada directa de estos elementos o el cotransporte en complejos con ligandos de baja masa molecular (Lemire *et al.*, 2013).

Los efectos causados por estos compuestos tóxicos en bacterias se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los primarios son resultado de su interacción con los componentes celulares, mientras que los efectos secundarios ocurren a nivel macromolecular (reemplazamiento de cofactores esenciales de moléculas biológicas y estrés oxidativo) (Hobman *et al.*, 2007).

El mercurio resultó ser el metal más tóxico de los compuestos evaluados ya que es capaz de desestabilizar un gran número de macromoléculas presentes en las células bacterianas. Además, actúa potentemente sobre las membranas celulares causando alteraciones tanto en su estabilidad como en su función. De esta manera desestabiliza la primera barrera de defensa de las células microbianas aumentando la permeabilidad de las mismas y por tanto causando un colapso total del equilibrio celular. Esto es evidente a concentraciones muy pequeñas del tóxico y bajos tiempos de exposición.

Para el mercurio se ha presentado una hipótesis que sugiere la entrada a través de proteínas transportadoras de cationes divalentes (Schaefer *et al.*, 2014), mientras otros autores proponen que las sales mercúricas como el $HgCl_2$ forman compuestos divalentes solubles que pueden atravesar la membrana por difusión simple (Broussard, 2002, Liu *et al.*, 2016). En el caso del cobre, todas las enzimas dependientes de este ion se localizan fuera del citosol (en la membrana citoplasmática y/o el espacio periplasmático) y que las mismas adquieren su cofactor directamente a partir de fuentes exógenas (Festa & Thiele, 2011, Stevenson *et al.*, 2013), esto sugiere que no debe existir la necesidad de que los iones cobre entren a las células bacterianas.

El ion Cr^{6+} por su parte atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato, constituyendo un inhibidor competitivo del mismo (Cervantes & Campos-García, 2007, Gutiérrez & Cervantes, 2008). Mientras

los iones Ag^+ tienen como blancos principales la proteína translocadora de sodio (NADH: ubiquinona oxireductasa) (Dibrov *et al.*, 2002, Zhan, 2012) por lo que puede interferir con la translocación de sodio generando un colapso del gradiente transmembranal de pH de la célula (Rodríguez & Gutiérrez, 2007). También se conoce que uno de los mecanismos mediante los cuales se internaliza la plata es el transporte a través de las porinas (Marrero & Fando, 2009, Zarubina *et al.*, 2015), por lo que pudiera plantearse que a los 5 min la toxicidad de la plata está limitada por el paso a través de la proteína transportadora transmembranal y a los 15 min el efecto se magnifica sobre su acumulación en el citosol.

Una de las estrategias descritas en especies del género *Vibrio* para la internalización de Fe^{3+} lo constituye la producción de sideróforos (compuestos que presentan una alta afinidad por este metal) (de Carvalho & Fernandes, 2010, Westrich, 2015). Estos son secretados al medio externo y forman complejos solubles con el Fe^{3+} que se reincorporan al interior celular a través de receptores específicos (Braun & Hantke, 2007). Otro mecanismo descrito en bacterias Gram negativas para el transporte de hierro lo constituye la familia de proteínas OFeT (oxidasas dependientes de Fe^{2+}), este complejo proteico reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} y este último es oxidado e internalizado por su receptor en membrana (Grass, 2007).

Ya en el interior celular ocurren numerosas interacciones que pudieran justificar el efecto tóxico de los compuestos evaluados. Tal es el caso de iones como el mercurio y la plata que pueden formar complejos con los grupos sulfhidrilos presentes en numerosas proteínas (Tabei *et al.*, 2012). Estos grupos permiten el mantenimiento de la estructura secundaria y terciaria de muchas enzimas que intervienen en diferentes vías metabólicas. Al desestabilizar estas estructuras, la enzima generalmente pierde su actividad, lo cual trae como consecuencia serias implicaciones biológicas como disrupción y malfuncionamiento de rutas metabólicas (Jaishankar *et al.*, 2014) como por ejemplo bloqueo de la respiración y el transporte de electrones (Rodríguez, 2008). Además, estos grupos debido a su susceptibilidad a la oxidación, son componentes esenciales de determinados agentes antioxidantes como el glutatión, las peroxirredoxinas (Tabei *et al.*, 2012) y otras enzimas que participan en el transporte electrolítico transmembranal (Rodríguez & Gutiérrez, 2007).

De modo general los pesticidas son necesariamente tóxicos por su función agrícola. En el caso de los organofosforados y organoclorados presentan como el resto de los compuestos evaluados en este estudio daños directos sobre la membrana celular, inhibición y desnaturalización de proteínas así como estrés oxidativo (Halmi, 2016).

Así mismo pueden producir precipitación de proteínas, inhibición enzimática y asociarse también a

grupos fosforilos, carboxilos, amida y amino; generando la destrucción de lípidos con la consecuente disrupción de las membranas celulares, daños a proteínas a lo largo de diferentes rutas bioquímicas así como daños al ADN (Broussard, 2002, Ayangbenro & Babalola, 2017).

Estos compuestos al reaccionar en el interior de la célula desencadenan estrés oxidativo con el consecuente aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (Hauenstein *et al.*, 2002, Oves *et al.*, 2016), produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daños a los ácidos nucleicos. Aunque se ha demostrado la capacidad de especies del género *Vibrio* de reducir el cromo hexavalente a una especie menos tóxica (Cr^{3+}) (Fulladosa *et al.*, 2006, Gutiérrez & Cervantes, 2008). Así mismo, la habilidad del cobre de pasar cíclicamente de su estado oxidado (Cu^{2+}) a su estado reducido (Cu^{+}) y viceversa, es aprovechado por las enzimas dependientes de cobre para llevar a cabo reacciones redox (Tchounwou *et al.*, 2014). Esta propiedad lo convierte un valioso biometal, pero también en un compuesto potencialmente tóxico pues las reacciones de interconversión pueden resultar en la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO).

Otros autores han reportado la existencia de otros mecanismos indirectos de tolerancia al estrés oxidativo en especies de vibrios luminiscentes (Czyz *et al.*, 2000, Szpilewska *et al.*, 2003, Łyzen & Wegrzyn, 2005). Estos plantean que la luciferasa bacteriana pudiera tener un rol fisiológico en la protección de las células contra especies reactivas del oxígeno (ERO), lo que sugiere que la célula de alguna manera atenúa el daño ocasionado para este intervalo de tiempo.

La sensibilidad mostrada por los aislados avizora la posibilidad de ser utilizados en la detección de concentraciones milimolares de estos compuestos tóxicos, por lo que podrían ser utilizados como indicadores de toxicidad en ecosistemas marinos.

Atendiendo a los valores de EC_{50} obtenidos como medida indirecta de la toxicidad de los compuestos evaluados, la secuencia que se obtuvo fue coincidente en los cultivos ($\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Ag}^{+} > \text{Fe}^{3+}$), aun cuando presentaron variaciones en su magnitud. De manera general el mercurio resultó ser el metal más tóxico para las cepas en estudio, lo que coincide con los resultados obtenidos por Stuart *et al.* (1999) donde este metal fue el más tóxico de los cuatro compuestos evaluados por los autores. El Fe^{3+} fue el metal al que estos cultivos mostraron menor sensibilidad independientemente del tiempo evaluado. Los resultados de la secuencia de toxicidad coinciden con los presentados por (Futra *et al.*, 2014) ($\text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Ag}^{+} > \text{Fe}^{3+}$).

Son notables las variaciones en cuanto a los valores de toxicidad obtenidos en bioensayos con bacterias luminiscentes. Las principales diferencias las constituyen la instrumentación (fluorímetro, luminómetro), la especie de bacteria luminiscente empleada, la sal metálica utilizada, los tiempos de exposición y el ajuste del pH (Lopez-Roldan *et al.*, 2012). Aunque de modo general los valores

obtenidos se encuentran en los mismos órdenes de magnitud que los informados en la literatura.

Efecto de muestras naturales sobre la luminiscencia de los aislados

La contaminación como consecuencia del vertimiento de residuales de origen antropogénico es uno de los problemas más importantes y complejos con los que se enfrenta la sociedad actual. Estos niveles de contaminación se ven influenciados fundamentalmente por aportes de fuentes terrestres (residuos urbanos, industriales, mineros, agrícolas y otros) aunque los residuos generados por la actividad marítima contribuyen de manera significativa a las afectaciones de estos ecosistemas (Chabalina & Gonzalez, 1999). Esta contaminación es un problema medioambiental grave debido a su elevada persistencia en el medio ambiente, elevada toxicidad y potencial de bioacumulación y biomagnificación (Paba *et al.*, 2008, Mancilla-Villa *et al.*, 2012, El-Moselhy *et al.*, 2014).

Por lo anterior resulta de gran importancia contar con nuevos métodos que permitan determinar la presencia de compuestos tóxicos en las aguas marinas cubanas. Para ello se seleccionaron cuatro puntos de muestreo que permitieran evaluar la sensibilidad de los cultivos a aguas marinas con diferentes aportes de contaminación. Todas las estaciones se ven afectadas por los contaminantes de residuales domésticos, pero en especial las desembocaduras de los ríos Almendares y Quibú presentan un aporte constante de desechos industriales.

En la Figura 12 se muestra la inhibición de la luminiscencia empleando muestras naturales incubadas por 15min y la sensibilidad a elevadas concentraciones de $K_2Cr_2O_7$ como control del experimento. Las muestras tomadas en el Rincón de Guanabo y la Rada IdO solo inhibieron entre 3,37 y 6,00 % y no difieren estadísticamente ($p=0,05$ y $n=24$) entre las estaciones, ni los aislados evaluados. En el caso de las muestras sin diluir de las desembocaduras de los ríos Almendares ($30, 24 \pm 3,16$; $30, 67 \pm 4,05$ y $32,31 \pm 4,13$; para CBM-784, CBM-976 y CBM-992, respectivamente) y Quibú ($31, 41 \pm 2,75$; $30, 38 \pm 2,94$ y $33,65 \pm 4,21$; para CBM-784, CBM-976 y CBM-992, respectivamente) presentan mayores porcentajes de inhibición. Las muestras de las desembocaduras de los ríos no presentan diferencias significativas ($p=0,05$ y $n=24$) entre los cultivos empleados.

Estos resultados coinciden con autores como Zhou *et al.* (2006), los que encontraron entre un 10 y un 80 % de inhibición en muestras naturales no diluídas en las que previamente se han reportado compuestos tóxicos como el Irgarol 1051 y el Diuron (ambos pesticidas). Así mismo, (Cho *et al.*, 2004) detectaron porcentajes de inhibición de la luminiscencia entre 10 y 58 en efluentes de plantas de tratamiento coreanas.

Además, simultáneamente se evaluó la calidad del agua a partir de indicadores químicos y se evidenció

que los contenidos de oxígeno variaron entre 4,78 y 7,29 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Las concentraciones medias de oxígeno disuelto fueron superiores a 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que pueden considerarse como aguas de buena calidad, con excepción de la estación MN1 (Rincón de Guanabo) donde se halló un mínimo de oxígeno por debajo del límite establecido por NC-25:1999, aunque muy cerca del límite inferior (Tabla XIV).

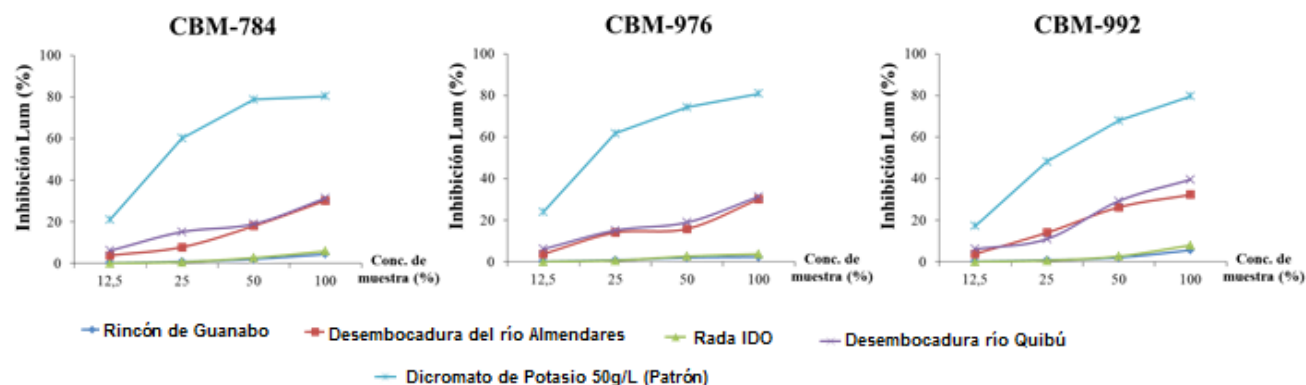


Figura 12. Efecto de cuatro diluciones de muestras naturales (provenientes del Rincón de Guanabo, la rada de IDO y las desembocaduras de los ríos Almendares y Qibú) sobre la luminiscencia de los aislados, así como de una solución control de dicromato de potasio (50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Las concentraciones medias de materia orgánica de naturaleza biodegradable (DBO_5), fueron inferiores a lo establecido por la normativa NC-25:1999 (Tabla XIV). Por su parte, la DQO presentó valores medios inferiores al valor de la norma NC-22:1999 ($< 2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), aunque la estación MN3 mostró mala calidad en cuanto a este indicador lo que indica que son aguas marinas contaminadas por materia orgánica.

Tabla XIV. Valores medios de oxígeno disuelto (OD), demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO), amonio (NH_4) y fósforo inorgánico (PO_4) en los sitios muestreados.

Estación	Localidad	OD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	DBO_5 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	DQO ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NH_4 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	PO_4 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
MN1	Rincón de Guanabo	4,78	0,45	1,09	15,38	0,08
MN2	La Puntilla (río Almendares)	7,29	1,04	1,87	8,50	1,60
MN3	Calle 170 (río Quibú)	5,64	2,15	2,50	23,71	2,14
MN4	Rada (IDO)	6,04	1,57	1,72	3,58	0,93

La disponibilidad de amonio (NH_4) como la forma reducida del nitrógeno inorgánico mostró valores entre 3,58 y 23,71 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabla XIV, Figura 13). Para el fósforo inorgánico (PO_4) (Tabla XIV) se encontró que a diferencia del amonio la mayoría de las estaciones presentaron buena calidad, con excepción de la estación MN3 que mostró características de mala calidad (NC-25:1999), lo que pudiera

estar asociado a los desechos de origen domésticos de esa zona, que vierten al emisario que está partido.

En general, todas las estaciones presentaron características de mala calidad para el amonio según (NC-25:1999) y el Índice de calidad química propuesto por García-Ramil (inédito). Asimismo las estaciones MN1 y MN3 se distingue del resto de los sitios evaluados por presentar un incremento de los valores de los compuestos del nitrógeno amoniacal, lo que pudiera estar asociado al reforzamiento de los vertimientos puntuales de origen doméstico que ocurren en estos sitios.

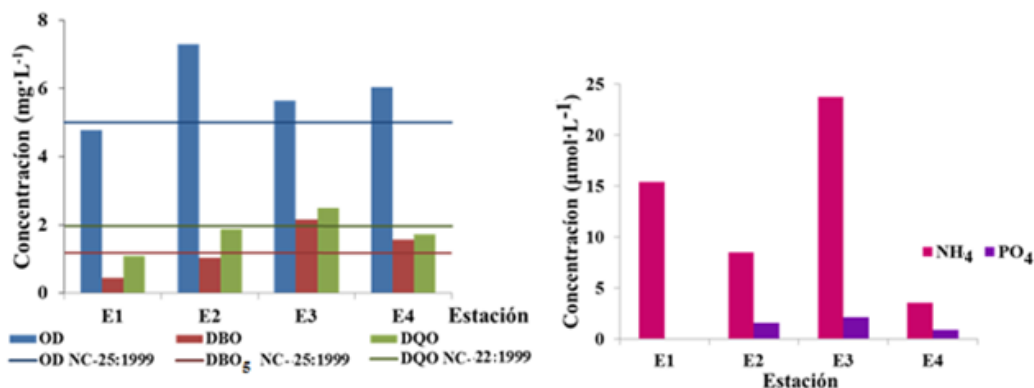


Figura 13. Distribución de Oxígeno Disuelto (OD), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) (grafico a la izquierda); amonio (NH₄) y fósforo inorgánico (PO₄) (grafico a la derecha) para las estaciones muestreadas. E1: Rincón de Guanabo, E2: río Almendares, E3: río Quibú y E4: Rada (IDO).

La reducción de la intensidad luminosa de los cultivos no parece estar directamente relacionada con los parámetros químicos evaluados. Aun así, se presentan valores fuera de norma para el fosfato en la estación MN3 y valores muy similares en la MN2; que son las estaciones que presentaron los mayores porcentajes de inhibición en el ensayo de bioluminiscencia. Así mismo, en estas dos estaciones se presentan los mayores valores de DQO.

Algunos estudios realizados en playas de La Habana advierten la presencia de metales como Ni, Cu, Zn y Pb en concentraciones de 8 ± 12 ; 35 ± 12 ; 31 ± 11 y $6,0 \pm 1,8$ mg·kg⁻¹ respectivamente. Por tanto estas zonas evidencian un enriquecimiento entre moderadamente severo y severo, en comparación con las guías de calidad de sedimentos y en el caso particular de Cu y Ni, pues sus concentraciones superan los valores permisibles (Díaz & Olivares). En el caso del Cu, el cual coincide con los metales evaluados, se encuentra en concentraciones superiores a las detectables empleando los aislados de bacterias luminiscentes.

Pesticidas y metales pesados son comúnmente encontrados como mezclas en agua potable, ríos, lagos y

mares (Allsop *et al.*, 1993) siendo los principales compuestos responsables de la toxicidad de las mismas. Dada la presencia de estas combinaciones resulta vital considerar que sus efectos tóxicos pueden ser sinérgicos, antagónicos o incluso aditivos (Thomulka *et al.*, 1993, Sixt *et al.*, 1995).

Para evaluar integralmente el impacto de contaminantes al medio ambiente deben ser llevados a cabo tanto análisis físico-químicos como toxicológicos. Los análisis físico-químicos, por sí solos, no brindan información sobre la toxicidad de las muestras ambientales debido a que no valoran la interacción entre los xenobióticos y sus implicaciones para los sistemas vivos, además de ser laboriosos, lentos y requerir de personal altamente calificado (de la Gala Morales, 2014). Es por ello que la detección de la toxicidad es esencial en la evaluación de la contaminación ambiental.

Para un mejor entendimiento del perfil toxicológico de contaminantes ambientales, el impacto de estos compuestos debe ser evaluado preferentemente por organismos que representen diferentes niveles tróficos. En la mayoría de los sistemas acuáticos, el nivel trófico más importante en términos de flujo de energía y reciclaje de nutrientes lo constituyen las bacterias (Mansour, 2015). Por este motivo los ensayos microbianos han sido ampliamente utilizados en los tamizajes de toxicidad. Además de por la similitud entre sus funciones bioquímicas y las de los organismos superiores, la facilidad de manipulación, el corto tiempo de exposición requerido y la reproducibilidad de los resultados interlaboratorios (Axelroda *et al.*, 2016). Si en una primera fase del tamizaje ambiental, no se detectara toxicidad empleando bioensayos pudiera evitarse la realización de análisis químicos por ser generalmente más complejos y costosos.

Por tanto el desarrollo de métodos sencillos y rápidos para la detección de contaminantes en las aguas resulta de vital importancia debido a su carácter tóxico y capacidad de biomagnificación.

IV. CONCLUSIONES

- La combinación de técnicas convencionales y moleculares permitió determinar que las cepas luminiscentes CBM-784, CBM-976 y CBM-992 aisladas de aguas marinas cubanas corresponden a la especie *Vibrio harveyi*.
- Los medios más adecuados para el crecimiento y la luminiscencia de los aislados resultaron ser LM y Zobell. Los valores de temperatura, pH y salinidad que favorecen la luminiscencia de las cepas son 27-28°C; 7-8 y 3-3,5% respectivamente, condiciones similares a las encontradas de las aguas de la plataforma costera cubana de donde fueron aisladas.
- Las cepas aisladas mostraron una mayor sensibilidad a los 15 min de exposición a los compuestos evaluados y la secuencia de toxicidad mostrada por las cepas ante los compuestos evaluados fue: $\text{HgCl}_2 > \text{CuSO}_4 > \text{Cuproflow} > \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{Sphere Max} > \text{Kospi-sc 130} > \text{AgNO}_3 > \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 > \text{Envidor}$.
- La luminiscencia de las cepas experimentó una disminución entre 30 y 32% frente a muestras naturales evidenciando su sensibilidad y su posible uso como bioindicador de toxicidad.

V. RECOMENDACIONES

- Evaluar la sensibilidad de los aislados ante combinaciones de compuestos tóxicos, en un mayor número de muestras naturales de ambientes impactados e incrementar los tiempos de exposición.
- Optimizar las condiciones de cultivo de las cepas teniendo en cuenta la relación C:N y la agitación.
- Diseñar un bioensayo con las cepas seleccionadas empleando muestras naturales de diferentes ecosistemas marinos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed N, Uzair B, Ayaz S & Ahmed VU (2008) Antibacterial activity of marine bacteria from Arabian Sea of Pakistan. *The Internet Journal of Microbiology* **4**: 1-10.
- Alsina M & Blanch AR (1994) A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* **76**: 79-85.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **21**: 403-410.
- Allsop P, Chisti Y, Moo-Young M & Sullivan G (1993) Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and bioengineering* **41**: 572-580.
- Amutha K & Shamini S (2015) Metal tolerance of bioluminescent bacteria isolated from marine organisms. *Indian Journal of Geo-Marine Science* **44**: 1799-1806.
- Arulmoorthy MP, Karunakaran K, Vignesh R, Vasudevan S & Srinivasan M (2014) Identification and antimicrobial potential of bioluminescent bacteria isolated from the mangrove ecosystem of the Roach Park, Tuticorin, South east coast of India. *BioMed Research* **1**: 1-15.
- Ashish B, Neeti K & Himanshu K (2013) Copper toxicity: a comprehensive study. *Research Journal of Recent Sciences* **2**: 58-67.
- Ast JC & Dunlap PV (2005) Phylogenetic resolution and habitat specificity of the *Photobacterium phosphoreum* species group. *Environmental Microbiology* **7**: 1641-1654.
- Atlas RM (2010) *Handbook of microbiological media*. Fourth Edition. AMS Pres and CRC Pres.
- Axelroda T, Eltzov E & Marks RS (2016) Bioluminescent bioreporter pad biosensor for monitoring water toxicity. *Talanta* **149**: 290-297.
- Ayangbenro AS & Babalola OO (2017) A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **14**: 1-16.
- Bagordo F, Serio F, Lugoli F, Grassi T, Idolo A, Gabutti G & De Donno A (2012) Phenotypic characterization of culturable marine luminous bacteria isolated from coastal waters of the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy). *Ciencias Marinas* **38**: 599-608.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Girones O & Múzquiz JL (2007) Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 323-328.
- Baumann P & Baumann L (1981) *The marine Gram-negative eubacteria: genera Photobacterium, Beneckea, Alteromonas, Pseudomonas, & Alcaligenes. The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, & identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlin.
- Beh WC, Lim YK, Asmat A, Lee YH & Salmijah S (2010) The potential of luminescent Bacteria “*Photobacterium leiognathi*” as biosensor for the detection of aquatic toxicity. *Environment and Natural Resources j* **8**: 1-9.
- Berthold F & Tarkkanen V (2013) Luminometer development in the last four decades: recollections of

- two entrepreneurs. *Luminescence* **28**: 1-6.
- Boynton L (2009) Using bioluminescent bacteria to detect water contaminants. *Journal of the US SJWP* **4**.
- Braun V & Hantke K (2007) Acquisition of iron by bacteria. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, (Nies DH & Silver S, eds.), 78 pp.
- Broussard LA (2002) The toxicology of mercury. *Laboratory medicine* **33**: 614-624.
- Cano-Gómez A, Høj L, Owens L & Andreakis N (2011) Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens. *Syst Appl Microbiol* **34**: 561-565.
- Cano-Gómez A, Høj L, Owens L, Baillie BK & Andreakis N (2015) A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species. *Aquaculture* **437**: 195-200.
- Cervantes C & Campos-García J (2007) Reduction and efflux of chromate by bacteria. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, (Nies DH & Silver S, eds.), p.^pp.
- Cortés-Sánchez AdJ, Troconis-Torres IG & Jaramillo-Flores ME (2013) Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias* **15**: 16-23.
- Cyz A, Wrobel B & Wegrzyn G (2000) *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. *Microbiology* **146**: 283–288.
- Chabalina L & Gonzalez JB (1999) Contaminación marina en bahías y zonas costeras de Cuba y del Gran Caribe. *Informe Científico de Proyecto Centro de Ingeniería y manejo Ambiental de Bahías y Costas Cuba*.
- Charrier T, Durand MJ, Affi M, Jouanneau S, Gezekel H & Thouand G (2010) Bacterial bioluminescent biosensor characterisation for on-line monitoring of heavy metals pollutions in waste water treatment plant effluents. *Biosensors*, Vol. 1 (Serra PA, ed.) p.^pp. 179. Croatia.
- Chee BW, Kheng LY, Ahmad A, Heng LY & Surif S (2010) The potential of luminescent bacteria '*Photobacterium leiognathi*' as a biosensor for the detection of aquatic toxicity. *Environ and Natl Res J* **8**: 1-9.
- Chiu H-H, Chou H-H, Jean W-D & Shieh W-Y (2007) Isolation and characterization of marine luminous bacteria from shallow coastal waters of Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **40**: 14-23.
- Cho J-C, Park K-J, Ihmb H-S, Park J-E, Kima S-Y, Kanga I, Leeb K-H, Jahng D, Leed D-H & Kim S-J (2004) A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium. *Biosensors and Bioelectronics* **20**: 338–344.
- Danyluk B, Uchman W, Konieczny P & Bilaska A (2007) An objective method to assess bioluminescent properties of selected bacterial strains. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **6**: 5-16.
- de Carvalho CCCR & Fernandes P (2010) Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs* **8**: 705-727.
- de la Gala Morales M (2014) Desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías analíticas para la determinación de contaminantes ambientales (metales pesados y benzo(a)pireno). Thesis,

Universidad de Extremadura.

- Delgado Gomez Y, Umana Castro R, Solano Gonzalez S, Iglesias Rodriguez M, Ortiz Guilarte E, Alvarez C & Lugioyo M *Vibrio harveyi* strain CBM-784A, 16S ribosomal RNA gene, partial. GenBank: Accession# KU761562.
- Delgado Gomez Y, Umana Castro R, Solano Gonzalez S, Iglesias Rodriguez M, Ortiz Guilarte E, Alvarez C & Lugioyo M *Vibrio harveyi* strain CBM-784B, uridylylate kinase (pyrH) gene, partial. GenBank: Accession# KU868079.
- Delgado Gomez Y, Umana Castro R, Solano Gonzalez S, Iglesias Rodriguez M, Ortiz Guilarte E, Alvarez C & Lugioyo M *Vibrio harveyi* strain CBM-784B, gyrase B subunit (gyrB) gene, partial. GenBank: Accession# KU902454.
- Delgado Gomez Y, Umana Castro R, Solano Gonzalez S, Iglesias Rodriguez M, Ortiz Guilarte E, Alvarez C & Lugioyo M *Vibrio harveyi* strain CBM-784B, 16S ribosomal RNA gene, partial. GenBank: Accession# KU761563.
- Díaz O & Olivares S (2018) Estudio de la contaminación por metales pesados en el medioambiente de La Habana mediante técnicas nucleares y conexas. Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas (InSTEC-UH). Informe. 16pp.
- Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK & Häse CC (2002) Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *American Society for Microbiology Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 2668-2670.
- Dunlap P (2014) Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 1*, p. 37-64. Springer.
- Dunlap PV & Urbanczyk H (2013) Luminous bacteria. *The Prokaryotes*, p. 495-528. Springer Berlin Heidelberg.
- Eckstein JW, Woong C, Colepicolo P, Ghisla S, Hastings JW & Wilson T (1990) A time-dependent bacterial bioluminescence emission spectrum in an in vitro single turnover system: Energy transfer alone cannot account for the yellow emission of *Vibrio fischeri* Y-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 1466-1470.
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Egland KA & Greenberg EP (2001) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*. *Journal of bacteriology* **183**: 382-386.
- El-Moselhy KM, Othman AI, El-Azem HA & El-Metwally MEA (2014) Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **1**: 97-105.
- FAO (1975) Manual of Methods in aquatic Environment Research Fish. Tech. . 137.
- Farto R, Montes M, Pérez MJ, Nieto TP, Larsen JL & Pedersen K (1999) Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *J Appl Bacteriol* **86**: 796-804.
- Fernández-Alba A, Hernando M, Piedra L & Chisti Y (2002) Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* **456**: 303-312.

- Festa RA & Thiele DJ (2011) Copper: An essential metal in biology. *Current Biology* **21**: 877-883.
- Fulladosa E, Desjardin V, Murat J-C, Gourdon R & Villaescusa I (2006) Cr(VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution. *Chemosphere* **65**: 644-650.
- Futra D, Heng LY, Surif S, Ahmad A & Ling TL (2014) Microencapsulated *Aliivibrio fischeri* in alginate microspheres for monitoring heavy metal toxicity in environmental waters. *Sensors* **14**: 23248-23268.
- Giesy JP & Hoke RA (1989) Freshwater sediment toxicity bioassessment: Rationale for species selection and test design. *J Great Lakes Res* **15**: 539-569.
- Girotti S, Ferri EN, Fumo MG & Maiolini E (2008) Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria (Review). *Analytica Chimica Acta Article* 2-29.
- Girotti S, Bolelli L, Ferri E, Carpené E & Isani G (2015) Bioindicators in environmental monitoring: bioluminescent bacteria, algae and honeybees. p.^pp. Rhodes, Greece.
- Grass G (2007) New transport deals for old iron. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, (Nies DH & Silver S, eds.), p.^pp.
- Gutiérrez JF & Cervantes C (2008) Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. *Ides CONCYTEG* **37**: 21-37.
- Halmi MIE (2016) Rapid ecotoxicological tests using bioassay systems - A review. *Journal of biochemistry, microbiology and biotechnology* **4**: 29-37.
- Harrigan WF & McCance ME (1968) *Métodos de laboratorio en microbiología*. Editorial Academia, España.
- Hauenstein E, González M, Peña-Cortés F & Muñoz-Pedrerros A (2002) Clasificación y caracterización de la flora y vegetación de los humedales de la costa de Tolten, Chile. *Gayana Bot* **59**: 87-100.
- Hobman JL, Yamamoto K & Oshima T (2007) Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, (Nies DH & Silver S, eds.), p.^pp. 72-116.
- Iglesias E, Morales M, González RA, Alfonso MJ, Weng Z, López G & Cabrera RI (2005) *Lineamientos para el establecimiento y funcionamiento de las colecciones cubanas de microorganismos y otros materiales biológicos*. Finlay Ediciones.
- IOC-UNESCO (1983) Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and guides. 12.
- ISO-5667-9:1992 Water quality. Part -9 Guidance on sampling from marine waters.
- ISO-5815:1989 Water quality. Determination of Biochemical Oxygen Demand after 5 days (BOD₅) - Dilution and seeding method.
- ISO-11348-1:2007 Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 1: Method using freshly prepared bacteria (ISO 11348-1:2007, IDT). p.^pp.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB & Beeregowda KN (2014) Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology* **7**: 60-72.

- Jan AT, Azam M, Choi I, Ali A & Haq QMR (2016) Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. *Brazilian Journal of Microbiology* **47**: 55–62.
- Jones D, Scarlett AG, West CE & Rowland SJ (2011) Toxicity of individual naphthenic acids to *Vibrio fischeri*. *Environmental science & technology* **45**: 9776-9782.
- Koch AL (1981) *Growth Measurement Methods. Manual of Methods for General Bacteriology*. Gerhardt.
- Krieg NR & Holt JG (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1*. Williams and Willkins Baltimore, London.
- Kumar AR, Jayaprakashvel M, FeuK-Lagerstedt E & Hussain AJ (2015) Factors affecting bioluminescence in free living *Photobacterium* spp. isolated from Bay of Bengal, India. *Journal of Marine Biosciences* **1**: 33-49.
- Lal MTBM & Ransangan J (2013) Taxonomic classification of *Vibrio harveyi* using 16S rDNA and atpA gene sequencing method. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* **3**: 17- 24.
- Lane DJ (1991) *16S/23S rRNA sequencing. In nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York.
- Lee C-W, Ng AY-F, Narayanan K, Sim EU-H & Ng C-C (2009) Isolation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters. *Cienc Mar* **35**: 63-68.
- Lemire JA, Harrison JJ & Turner RJ (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 371-384.
- Lerch G (1977) *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Ed. Científico Técnica, La Habana.
- Liu Y, Lu X, Zhao L, An J, He J-Z, Pierce EM, Johs A & Gu B (2016) Effects of cellular sorption on mercury bioavailability and methylmercury production by desulfovibrio desulfuricans ND132. *Environmental Science & Technology* 1-33.
- López-Caballero ME, Torres MDA, Sánchez-Fernández JA & Moral A (2002) *Photobacterium phosphoreum* isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in a model system under controlled atmospheres. *Eur Food Res Technol* **215**: 390-395.
- Lopez-Roldan R, Kazlauskaite L, Ribo J, Riva MC, González S & Cortina JL (2012) Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination. *Science of the Total Environment* **7**.
- López J & Gódiá F (1998) *Ingeniería Bioquímica*. SINTESIS S.A.
- Lugioyo GM (2003) Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba. Thesis, Universidad de La Habana, Cuba.
- Lugioyo GM, Cabrera D, Miravet ME, Núñez R, Delgado Y, Cabrera H & Martí J (2003) Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la Zona Exclusiva Económica al sur de Cuba. *Serie Oceanológica* **1**.
- Lugioyo M, Bellota M & Moreta N (1994) Primer registro sobre bacterias luminiscentes aisladas de aguas cubanas. *Avicennia* **2**: 73-82.

- Lunder T, Sorum H, Holstad G, Steigerwalt AG, Mowinckel P & J BD (2000) Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with 'winter ulcer'. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 427-450.
- Łyzen R & Wegrzyn G (2005) Sensitivity of dark mutants of various strains of luminescent bacteria to reactive oxygen species. *Arch Microbiol* **183**: 203-208.
- Lluis-Riera M (1972) Estudios hidrológicos del Golfo de Batabanó y de las aguas oceánicas adyacentes. *Serie Oceanológica* **14**: 1-49.
- Mackenzie EL, Iwasaki K & Tsuji Y (2008) Intracellular iron transport and storage: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **10**: 997-1030.
- Madigan M, Martinko JM, Stahl DA & Clark DP (2012) *Broock Biology of microorganisms. 13th*. Pearson Education, Inc, San Francisco, Unated Estates of America.
- Makemson JC, Fulayfil NR, Landry W, Van Ert LM, Wimpee CF, Widder EA & Case JF (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1034-1039.
- Makiguchi N, Arita M & Asai Y (1979) Isolation, identification, and several characteristics of luminous bacteria. *J Gen App! Microbiol* **25**: 387-396.
- Malik KA (1991) *Maintenance of microorganisms by simple methods. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a Manual of Laboratory Methods. 2nd Edition*. Academic Press.
- Mancilla-Villa ÓR, Ortega-Escobar HM, Ramírez-Ayala C, Uscanga-Mortera E, Ramos-Bello R & Reyes-Ortigoza AL (2012) Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* **28**: 39-48.
- Mansour SA (2015) Toxicity of some pesticides, heavy metals and their mixtures to *Vibrio fischeri* bacteria and *Daphnia magna*: comparative study. *Journal of Biology and Life Science* **6**.
- Marrero K & Fando R (2009) Sistemas de homeostasis del cobre en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* **40**: 186-198.
- Martín A, Serrano S, Santos. A, Marquina D & Vázquez. C (2010) Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca (Biología) Serie Microbiología* **3**: 75-86.
- Martínez J, Sánchez AI, Quintana M, Pazos V & Del Barrio G (1989) *Microbiología general*. Editorial Pueblo y Educación.
- Masner P, Javůrková B & Bláha L (2016) Rapid in situ toxicity testing with luminescent bacteria *Photobacterium luminescens* and *Vibrio fischeri* adapted to a small portable luminometer. *Environmental Science and Pollution Research* 1-11.
- Medvedeva SE, Tyulkova NA, Kuznetsov AM & Rodicheva EK (2009) Bioluminescent bioassays based on luminous bacteria. *Journal of Siberian Federal University Biology* **4**: 418-452.
- Meighen EA (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation and application of the lux genes. *Reviews* 1016-1022.
- Miles AA, Misra S & Irwin J (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection* **38**: 732-749.
- Miravet ME, Lugioyo M, Loza S, Enriquez D, Delgado Y, Carmenate M & Pérez D (2009)

Procedimientos para el monitoreo de la calidad ambiental en la zona marino costera a partir de microorganismos. Ediciones Centenario Santo Domingo, República Dominicana.

- NC-22: 1999 Norma Cubana: “Lugares de Baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos Higiénicos-Sanitarios”. Oficina Nacional de Normalización. Ciudad de La Habana. Cuba, 9p.
- NC-25:1999 Sistema de Normas para la Protección del Medio Ambiente. Hidrosfera. Especificaciones y procedimientos para la evaluación de los objetos hídricos de uso pesquero. 12 pp.
- Nunes-Halldorson VdS & Duran NL (2003) Bioluminescent bacteria: Lux genes as environmental biosensors. *Brazilian Journal of Microbiology* **34**: 6.
- Ortiz E (2004) Obtención y caracterización de un biotensioactivo a partir de *Bacillus licheniformis* IDO-60. . Tesis de Doctorado Thesis, Fac. Biología. Universidad de la Habana.
- Oves M, Khan MS, Qari AH, Felemban MN & Almeelbi T (2016) Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* **7**: 286-334.
- Paba GM, Angulo IC & Padilla LU (2008) Bioacumulación de cadmio en ostras de la bahía de Cartagena. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín* **7**: 1-10.
- Parvez S, Venkataraman C & Mukherji S (2006) A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment international* **32**: 265-268.
- Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E & Pujalte MJ (2010) Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 154-165.
- Perego P, Fanara L, M. Zilli & Borghi MD (2002) Applications of luminous bacteria on environmental monitoring. *Chem Biochem Eng Q* **16**: 87-92.
- Pérez G, Lugiayo M & Cárdenas D (2001) Identificación de bacterias aisladas de aguas oceánicas cubanas y sus capacidades antimicrobianas. *Rev Electr del Instituto de Oceanología*.
- Pérez V (2013) Caracterización de las condiciones de cultivo de una bacteria luminiscente aislada de la plataforma cubana. Thesis, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.
- Podgórska B & Węgrzyn G (2006) A Modified *Vibrio harveyi* mutagenicity assay based on bioluminescence induction. *Letters in Applied Microbiology* **42**: 578-582.
- Podgórska B, Pazdro K & Węgrzyn G (2007) The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *Journal of applied genetics* **48**: 409-412.
- Podgórska B, Chêæ E, Ulanowska K & Wêgrzyn G (2005) Optimisation of the microbiological mutagenicity assay based on genetically modified *Vibrio harveyi* strains. *Journal of Applied Genetic* **46**: 241-246.
- Prakash V, Rajpurohit D & Suneetha V (2014) Bioluminescent bacteria as future torch lights. Screening, characterisation. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **5**: 949-951.
- Ramahian N & Chandramohan D (1994) Bacterial bioluminescens in marine pollution assessment. *Ocean Technology: Perspectives* 967-980.

- Ramasamy D, Mishra AK, Lagier J-C, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, Raoult D & Fournier P-E (2014) A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 384-391.
- Rambaut A (2009) FigTree v1.4. 2012-2014. Available via <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. p.^pp.
- Ransangan J & Mustafa S (2009) Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased asian seabass *Lateolabrax niloticus* by use of 16s ribosomal DNA sequencing. *Journal of Aquatic Animal Health* **21**: 150-155.
- Rodríguez EMdRC & Gutiérrez RAP (2007) Los compuestos de plata y la salud. *Salud de la comunidad* **3**: 29-38.
- Rodriguez NS (2008) Silver disinfection in water distribution systems. Thesis, University of Arizona.
- Ruangsi J, Wannades M, Wanlem S, Songnui A, Arunrat S, Tanmark N, Pecharat J & Supamattaya K (2004) Pathogenesis and virulence of *Vibrio harveyi* from southern part of Thailand in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Warasan Songkhlankharin*.
- Sáenz CI & Nevárez GV (2010) La bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* **2**: 1-7.
- Sánchez CH (2013) Estudio de acumulación de metales pesados en los sedimentos de jaulas de peces de crianza y en puertos de la isla de Tenerife. tesis doctoral Thesis, Universidad de la Laguna, La Laguna, Canarias. 36pp.
- Satomi M, Oikawa H & Yano Y (2003) *Shewanella marinointestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 491-499.
- Schaefer JK, Szczuka A & Morel FMM (2014) Effect of divalent metals on Hg(II) uptake and methylation by bacteria. *Environmental Science & Technology* **48**: 3007-3013.
- Silvestro D & Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org Divers Evol* **12**: 335-337.
- Sixt S, Altschuh J & Brüggemann R (1995) Quantitative structure-toxicity relationships for 80 chlorinated compounds using quantum chemical descriptors. *Chemosphere* **30**: 2397-2414.
- Soto W & Gutierrez J (2009) Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microbial Ecology* **57**: 140-150.
- Stamatakis A, Ludwig T & Meier H (2005) RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* **21**: 456-463.
- Stevenson J, Barwinska-Sendra A, Tarrant E & Waldron KJ (2013) Mechanism of action and applications of the antimicrobial properties of copper. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, (Méndez-Vilas A, ed.) p.^pp. 468-479.
- Stuart M (1998) Atenuacion de la luminiscencia de una cepa de *Photobacterium leiognathi*, aislada de aguas cubanas, por acción de xenobióticos y muestras ambientales. Thesis, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 35pp.
- Stuart M, Lugioyo M & Alvarez C (1999) Atenuacion de la luminiscencia de una cepa de

- Photobacterium leiognathi*, aislada de aguas cubanas, por acción de xenobióticos y muestras ambientales. *Contribution to Education and environmental protection* **0**: 32-35.
- Szpilewska H, Czyz A & Wegrzyn G (2003) Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Current Microbiology* **47**: 379-382.
- Tabei Y, Era M, Ogawa A & Morita H (2012) Luminescence-based acute toxicity bioassay for heavy metals using insoluble-fibroin-film-immobilized *Vibrio fischeri*. *Sensors and Materials* **24**: 261-273.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK & Sutton DJ (2014) Heavy metals toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB & Swings J (2005) Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5107-5115.
- Thomulka KW, McGee DJ & Lange JH (1993) Use of the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* to detect potentially biohazardous materials in water. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **51**: 538-544.
- Ulitzur S & Weiser I (1981) Acridine dyes and other DNA-intercalating agents induce the luminescence system of luminous bacteria and their dark variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**: 3338-3342.
- Urbanczyk H, Ogura Y & Hayashi T (2013) Taxonomic revision of *Harveyi* clade bacteria (family *Vibrionaceae*) based on analysis of whole genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 2742-2751.
- Urbanczyk H, Ogura Y & Hayashi T (2014) Contrasting inter- and intraspecies recombination patterns in the “*Harveyi* clade” vibrio collected over large spatial and temporal scales. *Rev Genome Biol Evol* **7**: 71-80.
- Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, *et al.* (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 705-724.
- Villaescusa I, Marti S, Matas C, Martine M & Ribó JM (1997) Chromium (VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 871-874.
- Vishnivetskaya TA, Mosher JJ, Palumbo AV, *et al.* (2011) Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated tennessee streams. *American Society for Microbiology Applied and Environmental Microbiology* **77**: 302-311.
- Walters P & Lloyd D (1985) Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analysed on gradient plates. *Journal of General Microbiology* **131**: 2865-2869.
- Westrich JR (2015) Consilience of iron in the ecology of vibrio bacteria. Thesis, Creighton University, Athens, Georgia. 43 pp.
- Wie M-A, Oh S-J, Kim S-C, Kim R-Y, Lee S-P, Kim W-I & Yang JE (2012) Toxicity assessment of silver ions compared to silver nanoparticles in aqueous solutions and soils using microtox bioassay. *Korean J Soil Sci Fert* **45**: 1114-1119.

- Yoshizawa S, Karatani H, Wada M & Kogure K (2012) *Vibrio azureus* emits blue-shifted light via an accessory blue fluorescent protein. *FEMS Microbiology Letters* **329**: 61-68.
- Zarubina AP, Deev LI, Parkhomenko IM, Parshina EY, Sarycheva AS, Novoselova LA, Lukashev EP, Netrusov AI & Rubin AB (2015) Evaluation of toxicity of silver ions and nanoparticles using model bacteria with luminescent phenotype. *Nanotechnologies in Russia* **10**: 475–483.
- Zhan Y (2012) Effects of silver nanoparticles on bacteria and earthworms. Thesis, Lincoln University, New Zealand. 76 pp.
- Zhou X, Okamura H & Nagata S (2006) Applicability of luminescent assay using fresh cells of *Vibrio fischeri* for toxicity evaluation. *Journal of health science* **52**: 811-816.