

Phenotypic characterization of culturable marine luminous bacteria isolated from coastal waters of the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy)

Caracterización fenotípica de bacterias luminosas marinas cultivables aisladas de aguas costeras del sur del mar Adriático (Otranto, Italia)

F Bagordo¹, F Serio¹, F Lugoli¹, T Grassi¹, A Idolo¹, G Gabutti², A De Donno^{1*}

¹ Department of Biological and Environmental Science and Technology (Di.Ste.B.A.), University of the Salento, via Prov. le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce, Italy.

² S.C. Igiene e Sanità Pubblica, ASL4 Chiavarese, Regione Liguria, Italy.

* Corresponding author. E-mail: antonella.dedonno@unisalento.it

ABSTRACT. To determine the abundance and species composition of luminous bacteria in the coastal waters of the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy), samples were collected from three sites affected by different degrees of anthropogenic pollution. A total of 116 strains of marine luminous bacteria were isolated and subjected to phenotypic characterization, which included 36 biochemical tests. Numerical analysis of the data revealed five clusters with >86% similarity, which were readily identified as *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* biovar I, and *Shewanella hanedai*. The relative abundance of each species shows that culturable luminous bacteria in the monitored waters are composed mainly of *V. harveyi* (69.0%), followed by *V. fischeri* (13.8%) and *P. leiognathi* (12.1%). In addition, human activity appears to affect the total abundance of luminous bacteria but not the selection of individual species, since the frequencies of the bacteria were similar at all examined sites.

Key words: luminous bacteria, seawater, phenotypic characterization, coastal waters, heterotrophic bacteria.

RESUMEN. Con el fin de determinar la abundancia y composición de especies de bacterias luminosas en aguas costeras del sur del mar Adriático (Otranto, Italia), se recolectaron muestras en tres sitios con diferente grado de contaminación antropogénica. Se aislaron 116 cepas de bacterias luminosas marinas y se sometieron a 36 pruebas bioquímicas para su caracterización fenotípica. El análisis numérico de los datos mostró cinco grupos con >86% de similitud, los cuales fueron identificados como *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio splendidus* biovar I y *Shewanella hanedai*. La abundancia relativa de cada especie muestra que las bacterias luminosas cultivables en las aguas analizadas consisten principalmente de *V. harveyi* (69.0%), *V. fischeri* (13.8%) y *P. leiognathi* (12.1%). Además, la actividad humana parece afectar la abundancia total de bacterias luminosas pero no la selección de especies individuales, ya que las frecuencias de las bacterias fueron similares en todos los sitios estudiados.

Palabras clave: bacterias luminosas, agua marina, caracterización fenotípica, aguas costeras, bacterias heterótrofas.

INTRODUCTION

Luminescent bacteria (LB) are grouped as a functional unit on the basis of their ability to emit visible light. These bacteria are occasionally found in fresh water, brackish water, and soil environments but are ubiquitous in the marine environment, occupying a variety of niches (Nealson and Hastings 1979).

Marine LB have been isolated from seawater as free-living cells or adhering to sediment and detritus (Reichelt and Baumann 1973, Ramesh *et al.* 1990), and are widely distributed in shallow coastal environments and deep pelagic waters. They often associate with living and non-living marine organisms and colonize marine animals as saprophytes, commensals, and parasites (Ramesh *et al.* 1990, Abraham and Palaniappan 2004, Liu *et al.* 2004, Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006, Stabili *et al.* 2008, Nyholm *et al.* 2009). Certain bioluminescent species have been identified

INTRODUCCIÓN

Las bacterias luminescentes (BL) se agrupan como una unidad funcional con base en su capacidad de emitir luz visible. Estas bacterias se encuentran ocasionalmente en agua dulce, agua salobre y suelos, pero son ubicuas en el ambiente marino, donde ocupan una gran variedad de nichos (Nealson y Hastings 1979).

Las BL marinas han sido aisladas de agua de mar como células de vida libre o adheridas al sedimento y detrito (Reichelt y Baumann 1973, Ramesh *et al.* 1990), y se distribuyen ampliamente en ambientes costeros someros y aguas pelágicas profundas. Frecuentemente se asocian con organismos marinos vivos y no vivos, y colonizan animales marinos como saprófitos, comensales y parásitos (Ramesh *et al.* 1990, Abraham y Palaniappan 2004, Liu *et al.* 2004, Dunlap y Kita-Tsukamoto 2006, Stabili *et al.* 2008, Nyholm *et al.* 2009). Se han identificado algunas especies bioluminescentes como

as species-specific symbionts of marine fish and squids, in which they are concentrated in highly specialized light-emitting organs (Nealson and Hastings 1992, Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006, Abraham and Palaniappan 2004, Liu *et al.* 2004, Stabili *et al.* 2008, Nyholm *et al.* 2009). The light emission is sensitive to several toxic compounds; therefore, some luminous species are used in eco-toxicological tests to evaluate the quality of water environments (Narracci *et al.* 2008).

In uncontaminated seawater the concentration of free-living LB is low (0.01–40 cells mL⁻¹) (Dunlap and Kita-Tsukamoto 2006). However, several studies have suggested that the ratio between LB and total heterotrophic bacteria (plate counts) might be a useful indicator of coastal water quality, because of their sensitivity to anthropogenic impact in estuarine ecosystems (Ramaiah and Chandramohan 1993, Bacci *et al.* 1994, Sbrilli *et al.* 1997, Nocciolini *et al.* 2000, Perego *et al.* 2002).

The present taxonomy of the culturable marine LB includes at least nine species: two are assigned to the genus *Photobacterium* (*P. leiognathi*, *P. phosphoreum*), five to the genus *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. orientalis*, and *V. splendidus* biovar I), and two to the genus *Shewanella* (*S. hanedai* and *S. woodyi*) (Frischer *et al.* 2005, Chiu *et al.* 2007).

Although several studies have described the distribution and abundance of luminous species in marine ecosystems (Ramaiah and Chandramohan 1993, Bacci *et al.* 1994, Sbrilli *et al.* 1997, Nocciolini *et al.* 2000, Perego *et al.* 2002), many aspects of marine LB remain poorly understood, including species composition, population dynamics, ecological functions, and niche relationships.

The present study describes the abundance as well as the species composition of marine LB at three sites located on the coast of the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy). The isolation and biochemical characterization of luminous bacterial strains are described.

MATERIAL AND METHODS

Three sampling sites were selected in a coastal area of the southern Adriatic Sea (fig. 1): site 1, in the harbor area of Otranto, is subject to impact due to shipping and port activities in addition to urbanization surrounding the bay; site 2, about 20 m from the coastline, is subjected to impact due to urbanization; and site 3, about 1000 m offshore, has no noticeable impact. Monitoring was conducted twice, on 14 and 24 September 2007.

Sampling was performed between 09:00 and 11:00 under calm water and clear sky conditions. At each site, two water samples from about 20 cm below the surface were collected in sterile bottles (Abba type). The physical properties (including temperature, salinity, and pH) were measured *in situ* by WTW Multiline P4 meter. The samples were transported to the laboratory and processed within 1 h of

simbiontes de especies específicos de peces marinos y calamares, en donde se concentran en órganos altamente especializados que emiten luz (Nealson y Hastings 1992, Dunlap y Kita-Tsukamoto 2006, Abraham y Palaniappan 2004, Liu *et al.* 2004, Stabili *et al.* 2008, Nyholm *et al.* 2009). La emisión de luz es sensible a varios compuestos tóxicos, por lo que se utilizan algunas especies luminosas en pruebas ecotoxicológicas para evaluar la calidad de ambientes acuáticos (Narracci *et al.* 2008).

En agua marina no contaminada, la concentración de BL de vida libre es baja (0.01–40 cél mL⁻¹) (Dunlap y Kita-Tsukamoto 2006); sin embargo, varios estudios han sugerido que la razón entre BL y bacterias heterótrofas totales (conteo en placa) podría ser un indicador útil de la calidad de agua costera, debido a su sensibilidad a impactos antropogénicos en ecosistemas estuarinos (Ramaiah y Chandramohan 1993, Bacci *et al.* 1994, Sbrilli *et al.* 1997, Nocciolini *et al.* 2000, Perego *et al.* 2002).

La actual taxonomía de BL marinas cultivables incluye al menos nueve especies: dos se asignan al género *Photobacterium* (*P. leiognathi*, *P. phosphoreum*), cinco al género *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. logei*, *V. orientalis* y *V. splendidus* biovar I), y dos al género *Shewanella* (*S. hanedai* y *S. woodyi*) (Frischer *et al.* 2005, Chiu *et al.* 2007).

Aunque varios estudios han descrito la distribución y abundancia de especies luminosas en ecosistemas marinos (Ramaiah y Chandramohan 1993, Bacci *et al.* 1994, Sbrilli *et al.* 1997, Nocciolini *et al.* 2000, Perego *et al.* 2002), aún no se entienden bien muchos aspectos relacionados con las BL marinas, incluyendo la composición de especies, dinámica de poblaciones, funciones ecológicas y relaciones de nicho.

El presente trabajo describe la abundancia así como la composición de especies de las BL marinas en tres sitios localizados en la costa del sur del mar Adriático (Otranto, Italia). Se describen el aislamiento y la caracterización bioquímica de cepas bacterianas luminosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron tres sitios de muestreo en una zona costera del sur del mar Adriático (fig. 1): el sitio 1, en la rada portuaria de Otranto, es impactado por las actividades navieras y protuarias, así como por la urbanización alrededor de la bahía; el sitio 2, a unos 20 m de la línea de costa, es impactado por la urbanización; y el sitio 3, a unos 1000 m mar adentro, no parece estar impactado. Se realizaron dos muestreos, el 14 y 24 de septiembre de 2007.

Las muestras se tomaron entre 09:00 y 11:00 en condiciones de cielo despejado y aguas tranquilas. En cada sitio se recolectaron dos muestras de agua de unos 20 cm por debajo de la superficie en botellas (tipo Abba) esterilizadas. Las propiedades físicas (temperatura, salinidad y pH) fueron medidas *in situ* con un medidor WTW Multiline P4. Las muestras

collection by filtering three volumes of 100, 10, and 1 mL through 0.45- μm pore-size mixed ester cellulose membranes (Millipore). The membranes were placed on Seawater Complete (SWC) agar (Lee *et al.* 2001). The cultures were incubated at 20 °C in the dark for 36–48 h. Total culturable heterotrophic bacteria, labeled as apparent bacterial concentration (ABC) and expressed as colony-forming units per milliliter (CFU mL⁻¹), were determined by enumerating total colonies in the daylight. The plates were also observed in the dark to enumerate luminescent colonies, which were expressed as a percentage of the total heterotrophic bacteria (ABC) and labeled as luminescent fraction (LF).

Luminous colonies produced on the plates were marked in the dark room and successively picked off and purified by successive streaking on SWC plates.

A total of 36 phenotypic characteristics were examined for all strains by using morphological, physiological, and biochemical tests. The following tests were recorded for all strains: Gram-staining; motility; catalase; oxidase (oxidase sticks, Oxoid); luminescence on SWC agar; growth after 7 days at 4 °C and after 2 days at 10, 15, 25, 30, 35, and 40 °C in 2% NaCl tryptic soy broth (TSB); and salt tolerance (0%, 1%, 3%, 6%, 8%, and 10% NaCl) in salt tolerance broth (Pedersen *et al.* 1998).

se transportaron al laboratorio y se precesaron dentro de 1 h de su recolección mediante la filtración de tres volúmenes de 100, 10 y 1 mL a través de membranas de ésteres mixtos de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro (Millipore). Las membranas se colocaron sobre agar (Seawater Complete, SWC) (Lee *et al.* 2001). Los cultivos se incubaron a 20 °C en la oscuridad durante 36–48 h. Las bacterias heterótrofas cultivables, etiquetadas como concentración bacteriana aparente (CBA) expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹), se determinaron mediante la enumeración del total de colonias a la luz del día. Las placas también se observaron en la oscuridad para enumerar las colonias luminescentes, las cuales se expresaron como el porcentaje de bacterias heterótrofas totales (CBA), considerada la fracción luminescente (FL).

Las colonias luminescentes que aparecieron en las placas fueron marcadas en el cuarto oscuro y retiradas sucesivamente y purificadas mediante rayados sucesivos en las placas de SWC.

Se examinaron 36 características fenotípicas de todas las cepas mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Se registraron las siguientes pruebas para todas las cepas: tinción de Gram; movilidad; catalasa; oxidasa (tiras de oxidasa, Oxoid); luminiscencia sobre agar de SWC; crecimiento después de 7 días a 4 °C y después de 2 días a 10, 15, 25, 30, 35 y 40 °C en caldo de soja triptico (TSB) suplementado con 2% de NaCl; y tolerancia a la sal en caldo de NaCl al 0%, 1%, 3%, 6%, 8% y 10% (Pedersen *et al.* 1998).

La reducción de nitratos, el metabolismo óxido-fermentativo (O/F) de la glucosa, la hidrólisis de ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), la lisina (LDC) y ornitina descarboxilasa (ODC), la arginina dihidrolasa (ADH), la producción de H₂S a partir de tiosulfato, la producción de indol, la hidrólisis de urea, la reacción de Voges-Proskauer (VP), la hidrólisis de esculina y gelatina, y el uso de citrato se examinaron usando tiras de API 20 E y API 20 NE (Biomerieux) (Cavallo *et al.* 2009). La hidrólisis de quitina y alginato se determinó según lo descrito por Ortigosa *et al.* (1994). La producción de amilasa y lipasa se realizó siguiendo el método propuesto por Bairagi *et al.* (2002).

Los datos cuantitativos se elaboraron estadísticamente con el programa Statgraphic Plus. Los valores de temperatura, salinidad, pH, CBA y FL (%) en cada sitio se presentan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba *post hoc* de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas y la hipótesis nula fue rechazada cuando $P \leq 0.01$.

Los resultados de la caracterización fenotípica se clasificaron como 1 y 0 para resultados positivos y negativos, respectivamente, y 9 para datos no comparables. La matriz de datos, excluyendo los parámetros para los cuales no se registraron variaciones, se analizó con NTSYSpc 2.0. Las similitudes se calcularon usando el coeficiente de apareamiento

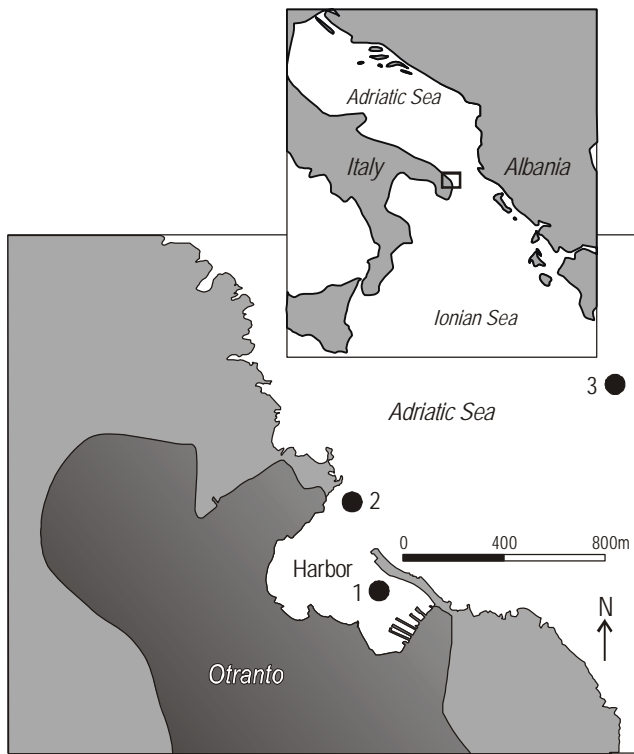


Figure 1. Location of the three water sampling stations (black circles) in the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy).

Figura 1. Localización de las tres estaciones de muestreo (círculos negros) en el sur del mar Adriático (Otranto, Italia).

Nitrate reduction, oxidative/fermentative (O/F) metabolism of glucose, hydrolysis of ONPG (ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranose), lysine (LDC) and ornithine decarboxylase (ODC), arginine dihydrolase (ADH), production of H₂S from thiosulfate, indole production, hydrolysis of urea, Voges-Proskauer (VP) reaction, hydrolysis of aesculin and gelatin, and citrate utilization were all examined by using API 20 E and API 20 NE strips (Biomérieux) (Cavallo *et al.* 2009). The hydrolysis of chitin and alginate was determined as described in Ortigosa *et al.* (1994). The amylase and lipase productions were determined following the method described by Bairagi *et al.* (2002).

Quantitative data were elaborated statistically using the software Statgraphic Plus. The values of temperature, salinity, pH, ABC, and LF (%) at each site are expressed as mean \pm standard deviation. Differences between groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni *post-hoc* test. Differences were considered significant and the null hypothesis was rejected when $P \leq 0.01$.

The results of the phenotypic characterization were coded as 1 and 0 for positive and negative results, respectively, and 9 for non-comparable data. The data matrix, excluding parameters for which no variation was recorded, was analyzed by NTSYSpc 2.0. The similarities were calculated using the simple matching coefficient (S_{SM}). Clustering was achieved by unweighted pair group mathematical averaging (UPGMA). The correlation between the respective values in the similarity matrix and the corresponding dendrogram (cophenetic correlation) was calculated for each coefficient using the cophenetic correlation coefficient (r).

Comparison of relative abundances between the three sites was carried out using the chi-square (χ^2) test. Differences were considered significant when $P \leq 0.01$.

RESULTS

The results of physical detections are reported in table 1. No significant differences (one-way ANOVA) at 99.0% confidence was registered among the three sites.

The measurements of total heterotrophic bacteria (ABC) and relative luminous component (LF) are shown in table 2. The ABC counts at the monitoring stations ranged from 30.50 CFU mL⁻¹ (site 3) to 91.75 CFU mL⁻¹ (site 1) and the LF values from 5.44% (site 1) to 13.44% (site 3). The

simple (S_{SM}). La agrupación se logró mediante el método de agrupamiento por promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados (UPGMA). La correlación entre los valores respectivos en la matriz de similitud y el dendrograma correspondiente (correlación cofenética) se calculó para cada coeficiente con el coeficiente de correlación cofenética (r).

La comparación de las abundancias relativas entre los tres sitios se realizó mediante la prueba χ^2 . Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.01$.

RESULTADOS

Los resultados de las detecciones físicas se presentan en la tabla 1. No se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía) a un nivel de confianza de 99.0% entre los tres sitios.

Las mediciones de las bacterias heterótrofas totales (CBA) y el componente de luminosidad relativa (FL) se muestran en la tabla 2. Los conteos de CBA en las localidades de muestreo variaron de 30.50 UFC mL⁻¹ (sitio 3) a 91.75 UFC mL⁻¹ (sitio 1) y los valores de FL de 5.44% (sitio 1) a 13.44% (sitio 3). El ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas al nivel de confianza de 99.0% entre los sitios 1 y 3 para los conteos de CBA así como los valores de FL.

El dendrograma simplificado, obtenido mediante S_{SM} y UPGMA, de las características fenotípicas de las BL se muestra en la figura 2. Para identificar las cepas silvestres, también se incorporaron en la matriz de datos las características fenotípicas descritas anteriormente para bacterias luminosas. Algunas características que diferencian los grupos fenotípicos se presentan en la tabla 3.

Se suprimieron diez pruebas de la matriz de datos ya que proporcionaron respuestas ya sea positivas (i.e., prueba de Kovacs para citocromo oxidasa, catalasa, O/F, movilidad) o negativas (i.e., Gram, producción de H₂S) para todas las cepas examinadas. La matriz de datos final incorporó información de 116 cepas y 25 parámetros. El coeficiente de correlación cofenética (r) fue 0.95. Se definieron cinco grupos con valores de $S_{SM} > 86\%$. Las bacterias del grupo I ($S_{SM} 86.7\%$) incluyeron 14 cepas catalasa negativa. Las características de estos aislamientos son similares a los descritos previamente para *P. leiognathi* ATCC 25521 (Nogi

Table 1. Geographic and physical characteristics (reported as mean \pm standard deviation of four samples) of the water sampling stations.
Tabla 1. Características geográficas y físicas (media \pm desviación estándar de cuatro muestras) de las estaciones de muestreo.

Sampling station	Geographic coordinates		Bathymetry (m)	T (°C)	pH	Salinity (mg L ⁻¹ NaCl)
	N	E				
1	40°08'870"	18°29'757"	5.5	22.15 \pm 1.33	8.25 \pm 0.08	37.75 \pm 0.17
2	40°09'092"	18°29'472"	6.5	22.00 \pm 1.73	8.25 \pm 0.08	37.85 \pm 0.06
3	40°09'290"	18°29'950"	26.0	22.05 \pm 1.21	8.24 \pm 0.05	37.95 \pm 0.10

one-way ANOVA indicated statistically significant differences at 99.0% confidence between sites 1 and 3 for both the ABC counts and the LF values.

The simplified dendrogram obtained by S_{SM} /UPGMA of the LB phenotypic characteristics is shown in figure 2. In order to identify the wild strains, the data matrix also contained the previously described phenotypic characteristics of standard luminous bacteria. Some characteristics that differentiated the phena are presented in table 3.

Ten tests were deleted from the data matrix because they gave either positive responses (i.e., Kovacs' cytochrome oxidase, catalase, O/F, motility) or negative responses (i.e., Gram, H₂S production) for all the strains studied. The final data matrix contained information on 116 strains and 25 parameters. The cophenetic correlation coefficient (r) was 0.95. Five phena were defined at S_{SM} values of > 86%. The bacteria grouped in phenon I (86.7% S_{SM}) included 14 catalase-negative strains. The characteristics of these isolates are similar to those previously described for *P. leiognathi* ATCC 25521 (Nogi *et al.* 1998, Caccamo *et al.* 1999, López-Caballero *et al.* 2002). The bacteria grouped in phenon II

Table 2. Results (mean ± standard deviation of four samples) of analyses carried out to determine the apparent bacterial concentration (ABC) and relative luminous fraction (LF) at each sampling station.

Table 2. Resultados (media ± desviación estándar de cuatro muestras) de los análisis realizados para evaluar la concentración bacteriana aparente (ABC) y la fracción luminosa relativa (LF) en cada estación de muestreo.

Sampling station	ABC (CFU mL ⁻¹)	LF (%)
1	91.75 ± 58.07	5.44 ± 2.85
2	74.50 ± 31.93	9.04 ± 4.87
3	30.50 ± 19.82	13.44 ± 2.89

et al. 1998, Caccamo *et al.* 1999, López-Caballero *et al.* 2002). Las bacterias del grupo II (S_{SM} 89.0%) incluyeron 16 cepas con un pigmento amarillo que presentan patrones bioquímicos idénticos a los de *V. fischeri* ATCC 7744 (Lunder *et al.* 2000). Las bacterias del grupo III (S_{SM} 90.1%) incluyeron 80 cepas, cuyas características coinciden con las

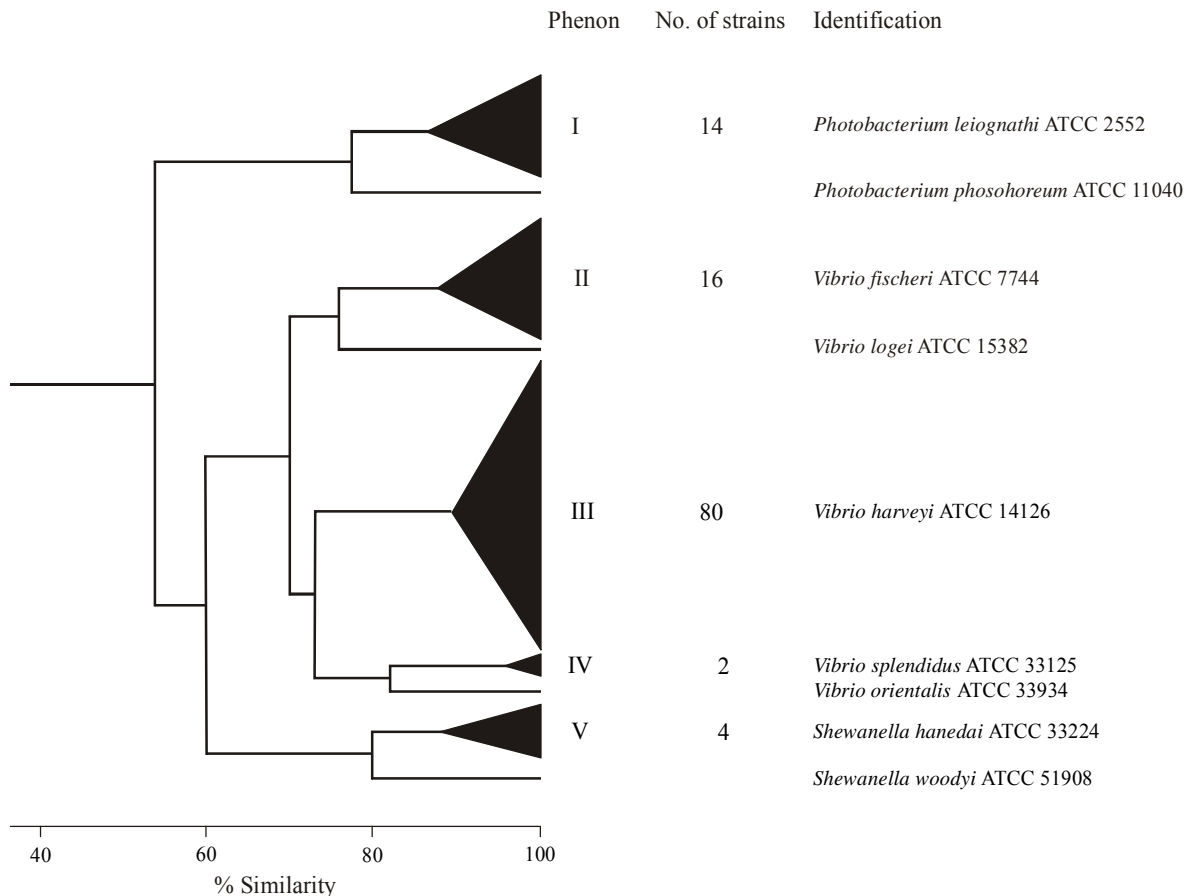


Figure 2. Simplified dendrogram, based on the S_{SM} coefficient and UPGMA clustering, showing the relationship between wild strains grouped in five phena and standard strains.

Figura 2. Dendrograma simplificado, con base en el coeficiente de S_{SM} y el agrupamiento por UPGMA, que muestra la relación entre las cepas silvestres en cinco grupos y las cepas estándar.

Table 3. Main phenotypic characteristics differentiating the phena described: + = positive result, - = negative result, V = uncertain result, F = fermentative, and O = oxidative. Data on standard strains taken from previous studies*.

Tabla 3. Principales características fenotípicas diferenciando las bacterias descritas: + = resultado positivo, - = resultado negativo, V = resultado incierto, F = fermentativo y O = oxidativo. Los datos de las cepas estándar se tomaron de estudios previos*.

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; *V.o.*, *Vibrio orientalis* ATCC 33934; *S.h.*, *Shewanella hanedai* ATCC 33224; *S.w.*, *Shewanella woodyi* ATCC 51908.

Parameter	Bacterial phenotype and strain number included					<i>P.l.</i>	<i>P.p.</i>	<i>V.h.</i>	<i>V.f.</i>	<i>V.l.</i>	<i>V.s.</i>	<i>V.o.</i>	<i>S.h.</i>	<i>S.w.</i>
	I(14)	II(8)	III(40)	IV(2)	V(4)									
Oxidase	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
luminescence	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
O/F test	F	F	F	F	O	F	F	F	F	F	F	F	O	O
ADH	V	V	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
LDC	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
ODC	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Urease	-	V	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Gelatinase	V	V	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Aesculin	-	+	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Chitinase	V	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Algylase	V	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Acetoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amylase	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Lipase	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	-	V	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Growth at temperature														
4 °C	-	V	V	+	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+
10 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	V	+	+	+	+	-	+	+	-	-
35 °C	+	V	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
40 °C	+	-	V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in salinity														
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Yang *et al.* (1983), Liu *et al.* (1996), Makemson *et al.* (1997), Nogi *et al.* (1998), Caccamo *et al.* (1999), Farto *et al.* (1999), Venkateswaran *et al.* (1999), López-Caballero *et al.* (2002) Lunder *et al.* (2000), Satomi *et al.* (2003).

(89.0% S_{SM}) included 16 yellow-pigmented strains that showed biochemical patterns identical to those of the *V. fischeri* ATCC 7744 strain (Lunder *et al.* 2000). The bacteria grouped in phenon III (90.1% S_{SM}) included 80 strains; the characteristics of this group are in agreement with the description of the *V. harveyi* ATCC 14126 strain (Yang *et al.* 1983, Farto *et al.* 1999). The bacteria grouped in phenon IV (96.0% S_{SM}) included two strains with similar characteristics to *V. splendidus* biovar I ATCC 33125; the characteristics of this phenon are in agreement with the description in Farto *et al.* (1999) except for growth at 35 °C, which is positive in the isolated strains. The bacteria grouped in phenon V (88.0% S_{SM}) included four strains that showed biochemical patterns identical to those of the *S. hanedai* ATCC 33224 strain (Makemson *et al.* 1997, Venkateswaran *et al.* 1999, Satomi *et al.* 2003).

The frequency analysis of luminous phena isolation (table 4) showed that the distribution of luminous species was similar at all sampling stations ($P > 0.01$). Phenon III was the most frequently isolated one, with a relative frequency between 68.4% (sites 2 and 3) and 70% (site 1).

DISCUSSION

In the present study, viable heterotrophic bacteria as well as LB abundances were characterized by spatial variations, which may be related to human activities such as sewage disposal from urbanized areas and port activities. Many authors (Ramaiah and Chandramohan 1993, Bacci *et al.* 1994, Sbrilli and Cruscanti 1999, Nocciolini *et al.* 2000, Perego *et al.* 2002, De Donno *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009) have suggested that the abundance of marine heterotrophic bacteria and the relative LF can be used as indicators of coastal water quality in relation to inputs of contaminants in marine environments. High bacterial counts indicate an increase in the respiration rate due to organic pollution, while a reduced or absent luminescent component may be related to the presence, in effective concentrations, of toxic substances (Sbrilli *et al.* 1997).

De Donno *et al.* (2008) described the distribution of pollutants from urban and port activities in the bay of Otranto. They found that the contamination of faecal origin and concentration of toxic substances were high in the port area and decreased off it.

The results obtained in this study suggest that at the site located offshore the bacterial community is probably in a state of relative stability, due to the very low level or absence of organic matter and toxic substances. In these conditions, a minimal concentration of viable bacteria and an abundant LF are observed. In contrast, the higher number of total heterotrophic bacteria and the smaller LF in the water samples collected from the site located in the harbor area reflect higher levels of organic compounds and/or toxins resulting from port activities.

de *V. harveyi* ATCC 14126 (Yang *et al.* 1983, Farto *et al.* 1999). Las bacterias del grupo IV (S_{SM} 96.0%) incluyeron dos cepas con características similares a las de *V. splendidus* biovar I ATCC 33125; los rasgos de este grupo concuerdan con la descripción de Farto *et al.* (1999) excepto para crecimiento a 35 °C, el cual es positivo para las cepas aisladas. Las bacterias del grupo V (S_{SM} 88.0%) incluyeron cuatro cepas que muestran patrones bioquímicos idénticos a los descritos para *S. hanedai* ATCC 33224 (Makemson *et al.* 1997, Venkateswaran *et al.* 1999, Satomi *et al.* 2003).

El análisis de frecuencia de aislamiento de bacterias luminosas (tabla 4) mostró que la distribución de especies luminosas fue similar en todos los sitios de muestreo ($P > 0.01$). Las bacterias del grupo III fueron las que se aislaron con mayor frecuencia, entre 68.4% (sitios 2 y 3) y 70% (sitio 1).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se caracterizaron las bacterias heterótrofas viables así como la abundancia de las BL mediante variaciones espaciales, que pueden estar relacionadas con actividades humanas como el manejo de aguas residuales de las zonas urbanas y actividades portuarias. Varios autores (Ramaiah y Chandramohan 1993, Bacci *et al.* 1994, Sbrilli y Cruscanti 1999, Nocciolini *et al.* 2000, Perego *et al.* 2002, De Donno *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009) han sugerido que la abundancia de bacterias heterótrofas marinas y la FL relativa pueden utilizarse como indicadores de la calidad del agua en cuanto al ingreso de contaminantes en ambientes marinos. Los conteos bacterianos elevados indican un aumento en la tasa de respiración asociado con contaminación orgánica, mientras que un componente luminoso reducido o ausente puede indicar la presencia, en concentraciones efectivas, de sustancias tóxicas (Sbrilli *et al.* 1997).

De Donno *et al.* (2008) describieron la distribución de contaminantes de actividades portuarias y urbanas en la bahía de Otranto. Ellos encontraron que la contaminación de origen fecal y la concentración de sustancias tóxicas eran altas en la rada portuaria pero disminuían mar adentro.

Table 4. Frequency of isolation of luminous phena at sampling stations ($P > 0.01$).

Tabla 4. Frecuencia de aislamiento de bacterias luminosas en las estaciones de muestreo ($P > 0.01$).

Phena	Sampling station			Total
	1	2	3	
I	7.5	15.8	13.2	12.1
II	17.5	10.5	13.2	13.8
III	70.0	68.4	68.4	69.0
IV	2.5	2.6	0.0	1.7
V	2.5	2.6	5.3	3.4

Moreover, the human impact represented at the three stations can affect bacterial luminescence *in vivo*. In fact, as reported by Dunlap and Kita-Tsukamoto (2006), the activity of the luminescence system is part of the cellular response to stress associated with nutrient limitation and decreasing growth rate.

This study showed that culturable LB in the shallow coastal waters of the southern Adriatic Sea during the relatively warm sampling season are dominated by *V. harveyi*, followed by *V. fischeri* and *P. leiognathi*. This distribution is similar to that found in previous studies based on phenotypic characterization of marine LB in temperate near-shore seawaters.

Indeed, *V. harveyi* and *V. fischeri* accounted for more than 90% of the LB isolated from samples collected in the Sargasso Sea, *P. leiognathi* and *P. phosphoreum* accounting for the remainder of isolates (Orndorff and Colwell 1980). *Vibrio harveyi* and *V. fischeri* accounted for 99% of the luminous isolates from California coastal surface waters, the former predominant (60–70%) in the summer but completely replaced by the latter during the winter (Ruby and Neilson 1978).

In the eastern Mediterranean Sea, *V. harveyi* was also described as the dominant luminous species in summer, replaced in winter by *V. fischeri* (Yetinson and Shilo 1979). In coastal waters of the northern Tyrrhenian Sea, *V. harveyi* and *V. fischeri* were found to account for 71% and 23%, respectively, of the strains isolated in summer, while *P. phosphoreum* and *P. leiognathi* were isolated only occasionally (Cruscanti *et al.* 1997). From coastal waters off northeastern Sicily, Caccamo *et al.* (1999) isolated 15 strains that were identified as *V. harveyi* by a combination of phenotypic and molecular tests. In shallow coastal waters off Taiwan during the warm season, *V. harveyi* and *P. leiognathi* appeared to be the most prevalent species of marine LB, with the former more numerous than the latter (Chiu *et al.* 2007).

The low abundance of *S. hanedai* and *V. splendidus* and the lack of *V. logei*, *P. phosphoreum*, *V. orientalis*, and *S. woodyi* recorded in this study could be explained by the psychrophilic nature of these species, which have optimum growth at temperatures lower than 18 °C and thus live better in cold waters (Nishiguchi 2000, Kato and Nogi 2001, Maeda *et al.* 2003). The frequency of luminous species was similar at all sites (table 4). Therefore, human activities present in the studied area are expected to have an effect on the relative abundance of LB but not on the selection of single species.

In conclusion, this study confirms that culturable luminous bacteria distributed in temperate near-shore waters are mainly composed of *V. harveyi*, *V. fischeri*, and *P. leiognathi*, with *V. harveyi* as the predominant species. A few other species may be isolated, but less frequently.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que en el sitio localizado mar adentro la comunidad bacteriana probablemente se encuentra en un estado de relativa estabilidad debido al nivel muy bajo o ausencia de materia orgánica y sustancias tóxicas. En estas condiciones, se observa una concentración mínima de bacterias viables y una abundante FL. En contraste, el mayor número de bacterias heterótrofas totales y una menor FL en las muestras de agua recolectadas en el puerto (sitio 1) reflejan niveles más altos de compuestos orgánicos y/o toxinas que resultan de las actividades portuarias.

El impacto humano que se observa en los tres sitios puede afectar la luminosidad bacteriana *in vivo*. De hecho, como lo documentaron Dunlap y Kita-Tsukamoto (2006), la actividad del sistema de bioluminiscencia es parte de la respuesta celular a estrés asociado con una limitación de nutrientes y una decreciente tasa de crecimiento.

En este estudio se encontró que las BL cultivables en las aguas costeras someras del sur del mar Adriático durante la temporada relativamente cálida están dominadas por *V. harveyi*, seguidas por *V. fischeri* y *P. leiognathi*. Esta distribución es similar a la encontrada en otros estudios basados en la caracterización fenotípica de BL marinas en aguas marinas templadas.

Más del 90% de las BL aisladas de muestras recolectadas en el mar de los Sargazos fueron *V. harveyi* y *V. fischeri*, y el resto fueron *P. leiognathi* y *P. phosphoreum* (Orndorff y Colwell 1980). Asimismo, *V. harveyi* y *V. fischeri* constituyeron 99% de las BL aisladas de aguas superficiales de la costa de California, la primera predominando (60–70%) en el verano pero siendo totalmente reemplazada por la segunda en el invierno (Ruby y Neilson 1978).

En el mar Mediterráneo oriental, *V. harveyi* también fue la especie luminosa predominante en el verano y *V. fischeri* en el invierno (Yetinson y Shilo 1979). En aguas costeras del norte del mar Tirreno, *V. harveyi* y *V. fischeri* constituyeron 71% y 23%, respectivamente, de las cepas aisladas en verano, mientras que *P. phosphoreum* y *P. leiognathi* sólo se aislaron ocasionalmente (Cruscanti *et al.* 1997). Caccamo *et al.* (1999) aislaron 15 cepas de aguas costeras de la parte nororiental de Sicilia, las cuales se identificaron como *V. harveyi* mediante una combinación de pruebas fenotípicas y moleculares. En aguas someras de la costa de Taiwán durante la temporada cálida, *V. harveyi* y *P. leiognathi* fueron las principales especies de BL marinas, la primera siendo más numerosa que la segunda (Chiu *et al.* 2007).

La baja abundancia de *S. hanedai* y *V. splendidus* y la ausencia de *V. logei*, *P. phosphoreum*, *V. orientalis* y *S. woodyi* en el presente estudio podrían explicarse por la naturaleza psicrófila de estas especies, las cuales tienen un crecimiento óptimo a temperaturas inferiores a 18 °C y consecuentemente viven mejor en aguas frías (Nishiguchi 2000, Kato y Nogi 2001, Maeda *et al.* 2003). La frecuencia de especies luminosas fue similar en los tres sitios (tabla 4). Por lo

REFERENCES

- Abraham TJ, Palaniappan R. 2004. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India. *Aquaculture* 232: 81–90.
- Bacci E, Bucci M, Sbrilli G, Brilli L, Gambassi F, Gaggi C. 1994. Marine bacteria as indicators of water quality. *Chemosphere* 6: 1165–1170.
- Bairagi A, Ghosh KS, Sen SK, Ray AK. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquacult. Int.* 10: 109–121.
- Caccamo D, Di Cello F, Fani R, Gugliandolo C, Maugeri TL. 1999. Polyphasic approach to the characterisation of marine luminous bacteria. *Res. Microbiol.* 150: 221–230.
- Cavallo RA, Acquaviva MI, Stabili L. 2009. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (northern Ionian Sea, Italy). *Environ. Monit. Assess.* 149: 465–475.
- Chiu HH, Chou HH, Jean WD, Shieh WY. 2007. Isolation and characterization of marine luminous bacteria from shallow coastal waters of Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40: 14–23.
- Cruscanti M, Sbrilli G, Bacci E, Bucci M, Gaggi C. 1997. I batteri luminescenti: Variazioni stagionali ed effetti di uno scarico termico sull'abbondanza e composizione in specie in acque costiere temperate. *Biologi Italiani* 27: 40–45.
- De Donno A, Bagordo F, Lugoli F, Leopizzi MI, Fanizzi F. 2008. Dynamics of microbial autochthon populations and human impact on the harbour of Otranto (Lecce, Italy). *J. Coast. Res.* 24: 103–109.
- Dunlap PV, Kita-Tsukamoto K. 2006. Luminous bacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd ed. (Ecophysiology and Biochemistry). Academic Press, New York, pp. 863–892.
- 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 scopthalmi* strains associated with turbot cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 86: 796–804.
- Frischer ME, Danforth JM, Foy TF, Juraske R. 2005. Bioluminescent bacteria as indicators of chemical contamination of coastal waters. *J. Environ. Qual.* 34: 1328–1336.
- Kato C, Nogi Y. 2001. Correlation between phylogenetic structure and function: Examples from deep-sea *Shewanella*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 223–230.
- Lee BS, Lee JG, Shin DH, Kim EK. 2001. Statistical optimization of bioluminescence of *Photobacterium phosphoreum* KCTC2852. *J. Biosci. Bioeng.* 1: 72–76.
- Liu PC, Lee KK, Yii KC, Kou GH, Chen SN. 1996. Isolation of *Vibrio harveji* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 33: 129–132.
- Liu PC, Lee KK, Yii KC, Kou GH, Chen SN. 2004. Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Panaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 5: 129–132.
- 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.
- Lunder T, Sorum H, Holstad G, Steigerwalt AG, Mowinckel P, Brenner DJ. 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.
- tanto, se supone que las actividades humanas en el área de estudio tienen un efecto en la abundancia relativa de las BL pero no en la selección de especies individuales.
- En resumen, este estudio confirma que las bacterias luminosas distribuidas en las aguas costeras templadas están compuestas principalmente por *V. harveyi*, *V. fischeri* y *P. leiognathi*, la primera siendo la especie predominante. Es posible aislar unas cuantas otras especies pero con menor frecuencia.

Traducido al español por Christine Harris.

- Maeda T, Matsuo Y, Furushita M, Shiba T. 2003. Seasonal dynamics in a coastal *Vibrio* community examined by a rapid clustering method based on 16S rDNA. *Fish Sci.* 69: 385–394.
- 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.
- Narracci M, Cavallo RA, Acquaviva MI, Prato E, Biantolino F. 2008. A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, southern Italy). *Environ. Monit. Assess.* 148: 307–314.
- Nealson KH, Hastings JW. 1979. Bacterial Bioluminescence: Its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 12: 496–518.
- Nealson KH, Hastings JW. 1992. The luminous bacteria. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds.), *The Prokaryotes*. 2nd ed. Springer-Verlag, New York, 14 pp.
- Nishiguchi MK. 2000. Temperature affects species distribution in symbiotic populations of *Vibrio* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3550–3555.
- Nocciolini S, Spadafina L, Vacri MR, Bacci E. 2000. A simple bacterial index for relative water quality: Preliminary application in the Orbetello Lagoon (Tuscany, Italy). *Chemosphere* 41: 1065–1069.
- Nogi Y, Masui N, Kato C. 1998. *Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extremophiles* 2: 1–7.
- Nyholm SV, Stewart JJ, Ruby EG, McFall-Ngai MJ. 2009. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environ. Microbiol.* 11: 483–493.
- Orndorff SA, Colwell RR. 1980. Distribution and identification of luminous bacteria from the Sargasso Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 983–987.
- Ortigosa M, Garay E, Pujalte MJ. 1994. Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle. *Syst. Appl. Microbiol.* 17: 216–225.
- Pedersen K, Verdonck L, Austin B, Austin D, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Tiainen T, Vigneulle M, Swings J. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes *et al.* 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 749–758.
- Perego P, Fanara L, Zilli M, Del Borghi M. 2002. Applications of luminous bacteria on environmental monitoring. *Chem. Biochem. Eng.* 16: 87–92.
- Ramaiah N, Chandramohan D. 1993. Ecological and laboratory studies on the role of luminous bacteria and their luminescence in coastal pollution surveillance. *Mar. Pollut. Bull.* 4: 190–201.

- Ramesh AB, Loganathan G, Venkateswaran K. 1990. Ecological dynamics of marine luminous bacteria. *J. Basic Microbiol.* 30: 686–703.
- Reichelt JL, Baumann P. 1973. Taxonomy of the marine, luminous bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 94: 283–330.
- Ruby EG, Nealson KH. 1978. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore seawater. *Limnol. Oceanogr.* 23: 530–533.
- Satomi M, Oikawa H, Yano Y. 2003. *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 491–499.
- Sbrilli G, Cruscanti M. 1999. I batteri marini planctonici, componente fondamentale dell'ecosistema pelagico e sensibili indicatori della qualità delle acque costiere. *Biologi Italiani* 4: 46–53.
- Sbrilli G, Cruscanti M, Bucci M, Gaggi C, Bacci E. 1997. Marine heterotrophic bacteria as indicators in the quality assessment of coastal waters: Introducing the “at bacterial concentration” approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 2: 135–139.
- Stabili L, Gravili C, Tredici M, Piraino S, Talà A, Boero F, Alifano P. 2008. Epibiotic *Vibrio* luminous bacteria isolated from some Hydrozoa and Bryozoa species. *Microb. Ecol.* 56: 625–636.
- Venkateswaran K, Moser DP, Dollhopf ME, Lies DP, Saffarini DA, MacGregor BJ, Ringelberg DB, White DC, Nishijima M, Sano H, Burghardt J, Stackebrandt E, Nealson KH. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 705–724.
- Wang W, Lampi MA, Huang X, Gerhardt K, Dixon DG, Greenberg BM. 2009. Assessment of mixture toxicity of copper, cadmium, and phenanthrenequinone to the marine bacterium *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol.* 24: 166–177.
- Yang Y, Yeh L, Cao Y, Baumann L, Baumann P, Tang JS, Beaman B. 1983. Characterization of marine luminous bacteria isolated off the coast of China and description of *Vibrio orientalis* sp. nov. *Curr. Microbiol.* 8: 95–100.
- Yetinson T, Shilo M. 1979. Seasonal and geographic distribution of luminous bacteria in the eastern Mediterranean Sea and the Gulf of Elat. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1230–1238.

Received February 2012,
received in revised form May 2012,
accepted June 2012.