

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN ECOTOXICOLOGÍA TROPICAL

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BACTERIAS MARINAS LUMINISCENTES
COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR GENES DE RESISTENCIA
A ANTIMICROBIANOS EN ÁREAS MARINAS PROTEGIDAS

Luis Vega Corrales

CAMPUS OMAR DENGO
HEREDIA, COSTA RICA

2025

Trabajo presentado para optar al grado de *Magister Scientae* en
Ecotoxicología Tropical, énfasis acuático

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE BACTERIAS MARINAS LUMINISCENTES
COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN POR GENES DE RESISTENCIA
A ANTIMICROBIANOS EN ÁREAS MARINAS PROTEGIDAS

Luis Vega Corrales

Trabajo presentado para optar al grado de

Magister Scientae en Ecotoxicología Tropical, énfasis acuático.

Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la

Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

PhD. Greivin Rodríguez Calderón

Representante del Consejo Central de Posgrado

M.Sc. Margaret Pinnock Branfrod

Coordinadora a.i. Programa Maestría en Ecotoxicología Tropical

PhD. Kinndle Blanco Peña

Tutora de Tesis

PhD. Junior Pérez Molina

Miembro del Comité Asesor

PhD. Susana Segura Muñoz

Miembro del Comité Asesor

Luis Vega Corrales

Sustentante

Resumen

La contaminación marina ha aumentado a nivel global debido a diversas presiones antropogénicas, y la resistencia antimicrobiana se reconoce como uno de los contaminantes emergentes de mayor relevancia para la salud ambiental y pública. Ante esta problemática, se requieren bioindicadores innovadores que permitan evaluar la presencia y los efectos de estos compuestos en los ecosistemas marinos. En este estudio se evaluó el potencial de bacterias marinas luminiscentes nativas como bioindicadores para el monitoreo ambiental de la resistencia antimicrobiana en áreas marinas protegidas. Se analizaron 13 cepas aisladas del Parque Nacional Isla del Coco y Parque Nacional Marino Las Baulas, Costa Rica. La clasificación taxonómica se realizó mediante PCR de los genes 16S rRNA y *luxA*, identificándose cepas de *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi* y *V. harveyi/V. campbellii*. La resistencia a 12 antimicrobianos se determinó por el método de difusión en disco y la presencia de nueve genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs), mediante PCR cuantitativa. Este es el primer reporte de resistencia antimicrobiana en *P. leiognathi* luminiscente nativa. La mayoría de las cepas mostró resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, siendo la amoxicilina el antimicrobiano más utilizado en salud humana en el país. Las cepas del Parque Nacional Marino Las Baulas presentaron resistencia a más antimicrobianos, lo que podría reflejar mayor influencia antropogénica. No se detectaron los ARGs analizados, lo que sugiere susceptibilidad fenotípica o la presencia de mecanismos de resistencia no evaluados. Los resultados obtenidos abren una nueva línea de investigación orientada al uso de bacterias marinas luminiscentes nativas como especies centinela para la vigilancia ambiental de la resistencia antimicrobiana en áreas marinas protegidas.

Palabras clave: *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi*, Bacteria bioluminiscente, Resistencia amoxicilina/ácido clavulánico, Áreas marinas protegidas, Bioindicadores, Ecotoxicología marina.

Agradecimientos

Agradezco al Laboratorio de Estudios Marino Costeros (LEMACO) de la Universidad Nacional, Costa Rica, por su colaboración en la recolección de las muestras de agua en el Parque Nacional Isla del Coco. Asimismo, agradezco a la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) y al Sistema de Áreas de Conservación (SINAC) del Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica, en particular al Área de Conservación Tempisque (ACT) y al Área de Conservación Marina Coco (ACMC), por autorizar el aislamiento y el acceso al material genético y bioquímico de las bacterias marinas luminiscentes (ACT-OR-DR-025-18, ACT-OR-DR-046-18, R-CM-UNA-017-2021-OT-CONAGEBIO y R-CM-UNA-011-2024-OT-CONAGEBIO).

Dedicatoria

A quienes aman lo que hacen, y a Mar y Victoria, por ceder tiempo de familia y ser mi motivación para concretar este logro.

Índice

Resumen.....	iv
Palabras clave.....	v
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Fuentes de financiamiento.....	2
3. Referencias.....	3

1. Introducción

La contaminación marina ha aumentado a nivel global como consecuencia de múltiples presiones antropogénicas, lo que representa una amenaza significativa para la biodiversidad marina y la salud humana (Halpern et al., 2025; Thiagarajan y Devarajan, 2025). Una de las problemáticas emergentes de mayor importancia, asociada a la contaminación marina, es la resistencia antimicrobiana (Larsson et al., 2022). Estudios recientes han demostrado que los océanos actúan como reservorios de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs), con evidencias de que más del 90% de los ARGs de alto riesgo están siendo expresados en estos ecosistemas (Xu et al., 2023). Ante este desafío, se requiere investigación e innovación tecnológica para el desarrollo de nuevas herramientas que permitan la evaluación de los cambios espaciales y temporales de la contaminación en ambientes marino-costeros (Liu et al., 2023).

Las investigaciones sobre contaminantes químicos y ecotoxicología enfatizan que se requieren análisis basados en organismos para evaluar los efectos biológicos y ecológicos de los xenobióticos. En este contexto, el uso de bacterias luminiscentes en ensayos de toxicidad y evaluaciones ecológicas ha experimentado un rápido avance, debido a sus ventajas únicas de simplicidad, sensibilidad y relevancia ecológica (Bhomkar and Naik, 2025). Actualmente, las bacterias marinas luminiscentes se utilizan ampliamente como bioindicadores para evaluar la toxicidad de contaminantes individuales, mezclas químicas y muestras ambientales (Gallardo et al., 2024; Kassim et al., 2020). No obstante, a pesar de un amplio potencial, aún no se han desarrollado estudios que empleen bacterias marinas luminiscentes nativas como especies centinelas para la detección y el monitoreo de la resistencia a antimicrobianos en áreas marinas protegidas.

Análisis metagenómicos recientes han demostrado la difusión de ARGs desde zonas urbanas hacia áreas marinas protegidas (Alonso-Vásquez et al., 2025), lo que pone de manifiesto un riesgo ecológico significativo incluso en ecosistemas considerados de baja presión antropogénica. En este sentido, el monitoreo de la resistencia antimicrobiana en estos ecosistemas es fundamental para comprender su dinámica ambiental y sus posibles implicaciones ecológicas (Orlic et al., 2025). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial de bacterias marinas luminiscentes nativas aisladas del Parque Nacional Isla del Coco y del Parque Nacional Marino Las Baulas, Costa Rica, reconocidos internacionalmente como santuarios de biodiversidad marina, como bioindicadores innovadores para el monitoreo ambiental de la resistencia antimicrobiana y de ARGs en áreas marinas protegidas.

Fuentes de financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Regional en Sustancias Tóxicas (IRET), el Laboratorio de Microbiología Marina (LaMMar, SIA 0025-20) de la Estación de Biología Marina de la Escuela de Ciencias Biológicas, la Vicerrectoría de Investigación y el Fondo Especial para la Educación Superior (FEES) de la Universidad Nacional, Costa Rica.

Referencias

- Adedipe, D. T., Chen, C., Lai, R. W. S., Xu, S., Luo, Q., Zhou, G. J., ... & Leung, K. M. Y. (2024). Occurrence and potential risks of pharmaceutical contamination in global Estuaries: A critical review and analysis. *Environment International*, 192, 109031. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.109031>
- Alonso-Vásquez, T., Fagorzi, C., Mengoni, A., Oliva, M., Cavalieri, D., Pretti, C., ... & Ugolini, A. (2025). Metagenomic surveys show a widespread diffusion of antibiotic resistance genes in a transect from urbanized to marine protected area. *Marine Pollution Bulletin*, 213, 117640. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2025.117640>
- Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N., & Mackie, R. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal

protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 22-32. <https://doi.org/10.1128/aem.67.1.22-32.2001>

- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129-137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Astorga, A., Montero-Cordero, A., Golfín-Duarte, G., García-Rojas, A., Vega-Bolaños, H., Arias-Zumbado, F., ... & Ulate, K. (2022). Microplastics found in the World Heritage Site Cocos Island National Park, Costa Rica. *Marine & Fishery Sciences (MAFIS)*, 35(3), 403-420. <https://doi.org/10.47193/mafis.3532022010907>
- Astorga-Pérez, A., Ulate-Naranjo, K., & Abarca-Guerrero, L. (2022). Presencia de microplásticos en especies marinas del Parque Nacional Marino las Baulas. *Revista Tecnología en Marcha*, 35(2), 27-38. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i2.5466>
- Bhomkar, S. U., & Naik, S. M. (2025). Unveiling the potential of microbial bioluminescence for marine pollution monitoring: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 32, 8679-8697. <https://doi.org/10.1007/s11356-025-36208-7>
- Blanco-Peña, K., Esperón, F., Torres-Mejía, A. M., De la Torre, A., de la Cruz, E., & Jiménez-Soto, M. (2017). Antimicrobial resistance genes in pigeons from public parks in Costa Rica. *Zoonoses and Public Health*, 64(7), e23-e30. <https://doi.org/10.1111/zph.12340>
- Blanco-Peña, K., Quesada-Alvarado, F., Salas-González, D., Estrada-König, S., Salom-Pérez, R., Arroyo-Arce, S., ... & Chaverri-Fonseca, F. (2024). A multidisciplinary approach to analyze the antimicrobial resistance in natural ecosystems. *Environmental Research*, 251, 118549. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118549>
- Börjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P. Å., Olsen, B., Matussek, A., & Lindgren, P. E. (2009). Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, β -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *International Journal of Environmental Health Research*, 19(3), 219-230. <https://doi.org/10.1080/09603120802449593>
- Burtseva, O., Kublanovskaya, A., Baulina, O., Fedorenko, T., Lobakova, E., & Chekanov, K. (2020). The strains of bioluminescent bacteria isolated from the White Sea finfishes: genera *Photobacterium*, *Aliivibrio*, *Vibrio*, *Shewanella*, and first luminous *Kosakonia*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 208, 111895. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111895>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Calogero, R., Rizzo, C., Arcadi, E., Stipa, M. G., Consoli, P., Romeo, T., & Battaglia, P. (2022). Isolation and identification of luminescent bacteria in deep sea marine organisms from Sicilian waters (Mediterranean Sea). *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(8), 1113. <https://doi.org/10.3390/jmse10081113>
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Chatragadda, R., & Raju, M. (2020). Predominance of Harveyi clade luminous bacteria in coastal waters of South Andaman, India. *Marine Pollution Bulletin*, 158, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111416>
- Chaturvedi, A., Singh, M., & Jaiswal, R. P. (2025). Quantitative Toxicity Assessment of Dye Wastewater Treated via Ozonation-Biodegradation Integration: Phyto-and Bioluminescence Studies. *Water, Air, & Soil Pollution*, 236(9), 542. <https://doi.org/10.1007/s11270-025-08213-6>
- CLSI. (2015) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- CONARE (Consejo Nacional de Rectores, Costa Rica) (2024). Programa Estado de la Nación. Estado de la Nación 2024. San José, C.R. : CONARE - PEN.
- De Jesus, R., Iqbal, S., Mundra, S., & AlKendi, R. (2024). Heterogenous bioluminescence patterns, cell viability, and biofilm formation of *Photobacterium leiognathi* strains exposed to ground microplastics. *Frontiers in Toxicology*, 6, 1479549. <https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1479549>
- Defoirdt, T., Verstraete, W., & Bossier, P. (2008). Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1480-1487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03672.x>
- Deng, Y., Xu, L., Chen, H., Liu, S., Guo, Z., Cheng, C., ... & Feng, J. (2020). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China. *Scientific Reports*, 10(1), 14329. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71288-0>
- Díaz-Madriz, J. P., Rojas-Chinchilla, C., Zavaleta-Monestel, E., Ching-Fung, S. M., Marin-Piva, H., Marin, G. H., & Giangreco, L. (2024). Assessing antimicrobial consumption in public and private sectors within the Costa Rican health system: current status and future directions. *BMC Public Health*, 24(1), 3205. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-20670-y>
- Dos Santos, C. R., e Silva, G. O. R., de Figueiredo Valias, C., de Souza Santos, L. V., & Amaral, M. C. S. (2024). Ecotoxicological study of seven pharmaceutically active compounds: Mixture effects and environmental risk assessment. *Aquatic Toxicology*, 275, 107068. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.107068>
- Dunlap, P. (2014). Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence. In: Thouand, G., Marks, R. (eds) *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 144. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43385-0_2
- Dunlap, P.V., Urbanczyk, H. (2013). Luminous Bacteria. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_75
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Gallardo, G. M. L., Rodríguez, M. V. I., Oduardo, A. P., Guilarte, E. O., Moreira, R. N., Almaguer, T. R. C., & Valcárcel, C. Á. (2024). Influencia de xenobióticos sobre la luminiscencia de cepas de *Vibrio harveyi* aisladas de aguas marinas cubanas. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 16(2), 29-50. <http://dx.doi.org/10.15359/revmar.16-2.2>
- Gentile, G., De Luca, M., Denaro, R., La Cono, V., Smedile, F., Scarfi, S., ... & Yakimov, M. M. (2009). PCR-based detection of bioluminescent microbial populations in Tyrrhenian Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(11-12), 763-767. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.07.023>
- Goswami, P. S., Gyles, C. L., Friendship, R. M., Poppe, C., Kozak, G. K., & Boerlin, P. (2008). Effect of plasmid pTENT2 on severity of porcine post-weaning diarrhoea induced by an O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 131(3-4), 400-405. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.007>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Guizado-Batista, A., Porres-Camacho, A., Vargas-Villalobos, S., Cortez-Martínez, M., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C., ... & Blanco-Peña, K. (2024). Antimicrobial-resistant genes in feces from otters (*Lontra longicaudis*) within the Peñas Blancas river basin, Costa Rica. *Heliyon*, 10(24). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40927>

- Hajji, A. L., & Lucas, K. N. (2024). Anthropogenic stressors and the marine environment: From sources and impacts to solutions and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 205, 116557. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116557>
- Halpern, B. S., Frazier, M., O'Hara, C. C., Vargas-Fonseca, O. A., & Lombard, A. T. (2025). Cumulative impacts to global marine ecosystems projected to more than double by mid-century. *Science*, 389(6766), 1216-1219. <https://doi.org/10.1126/science.adv2906>
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., D'agrosa, C., ... & Fujita, R. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, 319(5865), 948-952. <https://doi.org/10.1126/science.1149345>
- Hassan, H., Eltarahony, M., Abu-Elreesh, G., Abd-Elnaby, H. M., Sabry, S., & Ghozlan, H. (2023). Isolation, characterization, mathematical modeling and assessment of a novel *Photobacterium* sp. EAH3, as toxicity biosensor. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 49(2), 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2023.03.005>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kassim, A., Halmi, M. I. E., Abd Gani, S. S., Zaidan, U. H., Othman, R., Mahmud, K., & Abd Shukor, M. Y. (2020). Bioluminescent method for the rapid screening of toxic heavy metals in environmental samples using *Photobacterium leiognathi* strain AK-MIE. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110527. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110527>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kolesnik, O. V., Rozhko, T. V., & Kudryasheva, N. S. (2022). Marine bacteria under low-intensity radioactive exposure: model experiments. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 410. <https://doi.org/10.3390/ijms24010410>
- Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., & Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (*bla*_{TEM}) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 203-211. <https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>
- Larsson, D. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78-W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac268>
- Liu, C., Zhou, X., Li, Y., Hittinger, C. T., Pan, R., Huang, J., ... & Shen, X. X. (2024). The influence of the number of tree searches on maximum likelihood inference in phylogenomics. *Systematic Biology*, 73(5), 807-822. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syae031>
- Liu, Y., Lu, H., & Cui, Y. (2023). A review of marine in situ sensors and biosensors. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(7), 1469. <https://doi.org/10.3390/jmse11071469>
- Luo, Y. I., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & JJ Alvarez, P. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science & Technology*, 44(19), 7220-7225. <https://doi.org/10.1021/es100233w>

- Ma, X. Y., Wang, X. C., Hao, H., Guo, W., Wu, M. N., & Wang, N. (2014). Bioassay based luminescent bacteria: interferences, improvements, and applications. *Science of the Total Environment*, 468-469, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.028>
- Marti, E., & Balcázar, J. L. (2013). Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1743-1745. <https://doi.org/10.1128/AEM.03409-12>
- Marti, E., Jofre, J., & Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PloS ONE*, 8(10), e78906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrepf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Nurhafizah, W. W. I., Lee, K. L., Nadirah, M., Danish-Daniel, M., Zainathan, S. C., & Najiah, M. (2021). Virulence properties and pathogenicity of multidrug-resistant *Vibrio harveyi* associated with luminescent vibriosis in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107594. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107594>
- Orlić, K., Kapetanović, D., Kazazić, S., Smrzlić, I. V., Barac, F., Nerlović, V., ... & Perić, L. (2025). Diversity, virulence and antibiotic resistance of *Vibrio* Harveyi clade species associated with bivalve aquaculture within marine protected areas. *Aquaculture*, 594, 741392. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741392>
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Ramírez-Morales, D., Gutiérrez-Quirós, J. A., Rodríguez-Saravia, S., & Villegas-Solano, D. (2024). Occurrence of pharmaceuticals in Latin America: case study on hazard assessment and prioritization in Costa Rica. *Environmental Monitoring and Assessment*, 196(8), 739. <https://doi.org/10.1007/s10661-024-12872-z>
- Rojas-Alfaro, R., Umaña-Castro, R., Rojas-Campos, N., & Vargas-Montero, M. (2020). Primer reporte de bacterias y dinoflagelados marinos luminiscentes del Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68, 213-224. <https://doi.org/10.15517/rbt.v68iS1.41182>
- Santos, J., Cifrian, E., Rodriguez-Romero, A., Yoris-Nobile, A. I., Blanco-Fernandez, E., Castro-Fresno, D., & Andres, A. (2023). Assessment of the environmental acceptability of potential artificial reef materials using two ecotoxicity tests: Luminescent bacteria and sea urchin embryogenesis. *Chemosphere*, 310, 136773. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136773>
- Sultan, M. B., Anik, A. H., & Rahman, M. M. (2024). Emerging contaminants and their potential impacts on estuarine ecosystems: are we aware of it?. *Marine Pollution Bulletin*, 199, 115982. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115982>
- Sun, X., Wang, X., Han, Q., Yu, Q., Wanyan, R., & Li, H. (2024). Bibliometric analysis of papers on antibiotic resistance genes in aquatic environments on a global scale from 2012 to 2022: Evidence from universality, development and harmfulness. *Science of The Total Environment*, 909, 168597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168597>
- Tanveer, R., Neale, P. A., Melvin, S. D., & Leusch, F. D. (2025). Application of an extended bacterial toxicity assay to differentiate antibiotics from other contaminants in environmental mixtures. *Environmental Research*, 285, 122310. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122310>
- Thiagarajan, C., & Devarajan, Y. (2025). The urgent challenge of ocean pollution: Impacts on marine biodiversity and human health. *Regional Studies in Marine Science*, 81, 103995. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.103995>
- Triga, A., Issa, Z. A., Smyrli, M., Fenske, L., & Katharios, P. (2024). Virulence and pangenome analysis of *Vibrio harveyi* strains from Greek and Red Sea marine aquaculture. *Aquaculture*, 587, 740839. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740839>

- van der Grinten, E., Pikkemaat, M. G., van den Brandhof, E. J., Stroomberg, G. J., & Kraak, M. H. (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*, 80(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.011>
- Vannier, T., Hingamp, P., Turrel, F., Tanet, L., Lescot, M., & Timsit, Y. (2020). Diversity and evolution of bacterial bioluminescence genes in the global ocean. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(2). <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa018>
- Vargas-Villalobos, S., Hernández, F., Fabregat-Safont, D., Salas-González, D., Quesada-Alvarado, F., Botero-Coy, A. M., ... & Blanco-Peña, K. (2024). A case study on pharmaceutical residues and antimicrobial resistance genes in Costa Rican rivers: A possible route of contamination for feline and other species. *Environmental Research*, 242, 117665. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117665>
- Vega-Corrales, L., & Marín-Vindas, C. (2021). Effect of metal concentration on growth and luminescence of luminous bacteria strains isolated from golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 13(1), 27-38. <https://doi.org/10.15359/revmar.13-1.2>
- Vurm, R.; Tajnaiová, L.; Kofroňová, J. (2021). The influence of herbicides to marine organisms *Aliivibrio fischeri* and *Artemia salina*. *Toxics*, 9(11), 275. <https://doi.org/10.3390/toxics9110275>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Xu, N., Qiu, D., Zhang, Z., Wang, Y., Chen, B., Zhang, Q., ... & Qian, H. (2023). A global atlas of marine antibiotic resistance genes and their expression. *Water Research*, 244, 120488. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120488>
- Xue, J., Lei, D., Zhao, X., Hu, Y., Yao, S., Lin, K., ... & Cui, C. (2022). Antibiotic residue and toxicity assessment of wastewater during the pharmaceutical production processes. *Chemosphere*, 291, 132837. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132837>
- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., & Aue-Umneoy, D. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food control*, 38, 30-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.019>
- Yoo, M. H., Huh, M. D., Kim, E. H., Lee, H. H., & Do Jeong, H. (2003). Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. *Aquaculture*, 217(1-4), 11-21. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00169-2)
- Yuan, Y., Zhang, Y., Qi, G., Ren, H., Gao, G., Jin, X., & Fang, H. (2021). Isolation, identification, and resistance gene detection of *Vibrio harveyi* from *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture International*, 29(5), 2357-2368. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00752-z>
- Zagui, G. S., Moreira, N. C., Santos, D. V., Darini, A. L. C., Domingo, J. L., Segura-Muñoz, S. I., & Andrade, L. N. (2021). High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: a new concern?. *Environmental Research*, 196, 110352. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110352>
- Zenkov, A. V., Sushko, E. S., Mogilnaya, O. A., Volochaev, M. N., Shabanov, A. V., Kamnev, A. A., ... & Kudryasheva, N. S. (2025). Application of the luminous bacterium *Photobacterium phosphoreum* for toxicity monitoring of selenite and its reduction to selenium(0) nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 325, 125078. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125078>
- Zhang, T., Fan, L., & Zhang, Y. N. (2025). Antibiotic resistance genes in aquatic systems: Sources, transmission, and risks. *Aquatic Toxicology*, 284, 107392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107392>
- Zhou, Q., Chen, H., Liu, G., & Wang, X. (2024). Occurrence, sustainable treatment technologies, potential sources, and future prospects of emerging pollutants in aquatic environments: a review. *Frontiers in Environmental Science*, 12, 1455377. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1455377>

Zupčić, I. G., Oraić, D., Križanović, K., & Zrnčić, S. (2024). Whole genome sequencing of *Vibrio harveyi* from different sites in the Mediterranean Sea providing data on virulence and antimicrobial resistance genes. *Aquaculture*, 581, 740439. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740439>