

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL

BELIZE RODRIGUES LEITE

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES DE
ANIMAIS E DE AMBIENTES NATURAIS MARINHOS DE IMBÉ E TRAMANDAÍ,
LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

IMBÉ
2011

BELIZE RODRIGUES LEITE

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES DE
ANIMAIS E DE AMBIENTES NATURAIS MARINHOS DE IMBÉ E TRAMANDAÍ,
LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Ciências Biológicas com
ênfase em Biologia Marinha e Costeira nas
Universidades Federal e Estadual do Rio
Grande do Sul.

Orientadora: Patricia Valente

Co-orientadora: Melissa Landell

IMBÉ

2011

L533i Leite, Belize Rodrigues

Isolamento e identificação de bactérias bioluminescentes de animais e de ambientes naturais marinhos de Imbé e Tramandaí, Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil / Belize Rodrigues Leite – Imbé, 2011.

83 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências / Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha, Imbé / Cidreira, 2011.

Orientação: Profa. Dra. Patricia Valente.

Co-orientação: Dra. Melissa Fontes Landell.

1. Bactérias marinhas. 2. Bioluminescência. 3. *Vibrio*. 4. Potencial biotecnológico 5. Litoral Norte do Rio Grande do Sul. I. Silva, Patricia Valente da, orient. II. Landell, Melissa Fontes, coorient. III. Título.

BELIZE RODRIGUES LEITE

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES DE ANIMAIS E DE AMBIENTES NATURAIS MARINHOS DO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira nas Universidades Federal e Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: /..... /.....

BANCA EXAMINADORA:

Me. Sandra Mendes/UFSC

Dr. Leonardo Broetto/UFRGS

Prof. Dr. Eduardo Barboza/UFRGS

Dedico aos meus avôs (*in memoriam*) Lourdes, Nair, Afonso e Benoni, e aos meus pais Miguel e Beatriz: sem vocês, eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público, gratuito e de excelente qualidade de que tive o privilégio de desfrutar. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio ao projeto (MCT/CNPq/CT-Petro Nº 39/2009), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, pela bolsa de iniciação científica que me concedeu.

Às orientadoras Patricia Valente e Melissa Landell, pelas quais tenho uma admiração imensurável: pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança que foi depositada em mim, pela orientação, por toda a atenção que me foi dada e pelos valiosos conhecimentos que me transmitiram.

A mestre Sandra Mendes e ao doutor Leonardo Broetto, por aceitarem compor a banca avaliadora deste trabalho. Considero vocês profissionais exemplares.

Às equipes do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (especialmente à Vanessa Barcellos), do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (Centro de Biotecnologia - CBiot, UFRGS) e do Laboratório de Micologia (Instituto de Ciências Básicas e da Saúde - ICBS, UFRGS) por compreenderem minha transiência “intermunicipal” e “interlaboratorial”, por sempre estarem dispostas a me ajudar e por todos os momentos divertidos que me proporcionaram. Também registro aqui minha gratidão a Helier Balbinotti, pelos ensinamentos prévios a este trabalho, mas que me foram fundamentais.

Ao colega de curso Daniel Ortega, por me “aguentar” seguindo os seus passos durante a graduação, por me passar a experiência adquirida com bactérias bioluminescentes, pela alegria e disposição no trabalho e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Qualidade de Água, Sedimentos e Biologia do Pescado (Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos - CECLIMAR, UFRGS). Às estagiárias e colegas Luciana Menezes, Ludimila Pinheiro e Thamara Salvagni, por me dar toda a assistência laboratorial possível, pelas conversas animadas e por alegrar minha rotina de trabalho. À química responsável Cacinele Rocha, pela ajuda e pela atenção que sempre me deu, por me tolerar trabalhando no laboratório até o último minuto permitido, por todos os saberes divididos e papos-cabeça durante o trabalho. À colega Danielle Pagani, pela companhia e pelo interesse que tem demonstrado em dar continuidade a este trabalho.

Ao mestre de operações marítimas da Transpetro de Imbé, Wanderlen Castanheira, por mediar minhas coletas de água do mar e de invertebrados, sem as quais este trabalho não poderia ter sido realizado, e por sempre me receber tão bem e tão disposto. A todos os funcionários do Terminal Almirante Soares Dutra (TEDUT), por toda a atenção que me foi dada e pela preocupação com o meu bem-estar durante os embarques que realizei. À colega Vanessa Ochi Agostini por me acompanhar nestas coletas, por contribuir com amostras de invertebrados e por dividir as angústias desta etapa.

Aos colegas Pedro Carvalho Neto e Natália Wingert, e ao biólogo Rodrigo Machado, por contribuírem com a obtenção dos peixes analisados neste trabalho.

A todos os meus queridos colegas pela amizade e companheirismo, por muitas vezes, mesmo sem saber, tornarem meus dias tão melhores... Especialmente a Federico Sucunza, Felipe Dutra, Carlos Vinícius Weiss, Ana Carolina Pereira, Luciana Medeiros, Flávia Reckziegel, Samanta da Costa, Juliana Tisca, Daniela Hoss, Gisele Musskopf, Rita Gabriela e Karine Steigleder.

Aos bibliotecários do CECLIMAR, Ângelo e *Stella Maris* (ela tem o nome de estrela-do-mar!), pela amizade e confiança, pelo apoio ímpar, pelas palavras sábias e pelo interesse em revisar este trabalho. À secretária Márcia Nogueira, por não medir esforços para ajudar a enfrentar as dificuldades da jornada acadêmica de todos os alunos do CECLIMAR. Durante estes quatro anos, junto aos meus colegas, eles foram a minha família no Litoral.

Aos meus amigos, os irmãos que a vida me deu, por estarem torcendo por mim e me apoiando, não importando a distância física ou temporal entre a gente. A Martin Sucunza, pelo carinho e companheirismo de sempre.

Aos meus avôs (*in memoriam*), tios e primos, meus referenciais de dignidade, fé e força para transpor quaisquer obstáculos a serem enfrentados.

Aos meus pais... Por sempre me encorajarem: graças a eles jamais tive medo do escuro, fator crítico para passar silenciosas horas de trabalho observando as bactérias bioluminescentes no cantinho mais sombrio do laboratório... Pelos valores que me conduziram, pela confiança, por todo o amor e carinho que me deram. Nada do que eu pudesse dizer traduziria o quanto eu sou grata a eles!

“Natura nusquam magis est tota quam in minimis.”

(Em lugar algum encontramos a natureza na sua totalidade como nas suas menores criaturas.)

Plínio, naturalista † 79 d. C.

RESUMO

Durante o período de julho de 2010 a abril de 2011 foram coletadas 33 amostras de água e 23 amostras de animais marinhos das adjacências da zona de estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil, com o objetivo de isolar e identificar bactérias bioluminescentes, relacionar a carga microbiana total e bioluminescente das amostras de água com suas características físico-químicas e selecionar os isolados com potencial para atuar como fontes doadoras de genes de bioluminescência. Obtiveram-se amostras de água superficial do estuário, em um ponto de Imbé, e do mar, em três pontos de Tramandaí: zona de pós-arrebentação, zona intermediária entre o estuário e as monobóias, e zona das monobóias do Terminal Marítimo Almirante Soares Dutra (TEDUT). Potencial hidrogeniônico, oxigênio dissolvido, temperatura e salinidade foram parâmetros aferidos nas amostras de água. Alíquotas de 0,1 e 1 mL foram inoculadas nos meios Ágar Marinho e TCBS. Após 24h de incubação, a carga microbiana das amostras foi determinada em Unidades Formadoras de Colônia por mL de água. Bactérias bioluminescentes foram constatadas nos quatro pontos amostrados. Das 33 amostras de água, 27 apresentaram bactérias bioluminescentes (81%). Os parâmetros que mais aparentaram influenciar a carga microbiana bioluminescente das amostras foram temperatura e salinidade. Bactérias bioluminescentes não foram observadas em amostras com temperatura inferior a 18°C. A maior carga microbiana bioluminescente (690 UFC/mL) foi observada em fevereiro na amostra da zona de pós-arrebentação, sob a temperatura de 23°C e a salinidade de 38,44 ‰, o maior valor constatado para este parâmetro. Apesar de terem sido feitas três amostragens com invertebrados marinhos, foram observadas colônias bioluminescentes somente nas amostras do mês de fevereiro, no qual também foram constatadas as maiores cargas microbianas bioluminescentes nas amostras de água. A coleta do muco superficial da anêmona, da craca e do briozoário, com o auxílio de suábes, permitiu a observação de bactérias bioluminescentes agregadas na superfície destes animais na forma de biofilme. Os 14 peixes analisados também representaram fontes de bactérias bioluminescentes nas águas costeiras de Imbé e Tramandaí, mesmo quando estas bactérias não foram abundantes na coluna d'água. Após diferentes ciclos de purificação, um total de 44 isolados bioluminescentes foi obtido. Até o presente momento, apenas 15 isolados obtidos a partir das amostras de água ainda expressam bioluminescência. Os

isolados caracterizados como BL 15, BL 16, BL 20a e BL 21 representaram ideais fontes doadoras de genes da bioluminescência, pois demonstraram a capacidade de expressar luminescência após 144h de incubação. Amostras de DNA de dez isolados foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S rDNA, mas o produto obtido apresentou má qualidade e não permitiu a análise confiável dos nucleotídeos de forma a identificar os isolados em nível de espécie. O perfil genotípico de 14 isolados foi agrupado pela técnica de DNA *fingerprinting* *Microsatellite*-Primed (MSP-PCR) e revelou que estes provavelmente pertençam à mesma espécie. Amostras de DNA dos isolados BL 11a, BL 12, BL 16 e BL 34, escolhidos como representantes do grupo, serão novamente sequenciadas.

Palavras-chave: Bactérias Marinhas. Bioluminescência. *Vibrio*. Potencial Biotecnológico.

ABSTRACT

From July 2010 until April 2011, 33 samples of water and 23 samples of marine animals were collected in adjacencies of River Tramandaí Watershed estuarine zone with the objective of isolating and identifying bioluminescent bacteria, correlating the presence of these bacteria with physical-chemical characteristics of the water samples and selecting isolates with potential for acting as donor sources of bioluminescent genes. Samples were collected from surface water of the estuary at a point in Imbé, and the sea on three points in Tramandaí: post-surf zone, intermediate zone between the estuary and the single point mooring and the Maritime Terminal Almirante Soares Dutra Area single point mooring zone. Hydrogenionic potential, dissolved oxygen, temperature and salinity parameters were measured in water samples. Aliquots of 0.1 and 1 mL were inoculated in Marine Agar and TCBS. After 24 hours of incubation, the microbial load of the samples was determined in colony forming units per mL of water. Bioluminescent bacteria were detected in four sampling sites. Of the 33 samples of water, 27 showed bioluminescent bacteria (81%). The parameters that seemed to influence the bioluminescent microbial load of the samples were temperature and salinity. Bioluminescent bacteria were not observed in samples with temperature below 18°C. The major bioluminescent microbial load (690 CFU/mL) was observed in February in the sample of post-surf zone, the temperature under 23°C and salinity of 38.44 ‰, the highest value found for this parameter. Although there were made three samplings with marine invertebrates, bioluminescent colonies were observed only in samples of February, in which the largest bioluminescent microbial loads in water samples were found. The sampling of surficial mucus of the anemone, of the barnacle and of the bryozoan, with the aid of swabs, allowed the observation of bioluminescent bacteria aggregated on the surface of these animals in the form of biofilm. The 14 fishes analyzed also were sources of bioluminescent bacteria in coastal waters of Imbé/Tramandaí, even when these bacteria were not abundant in the water column. After several cycles of purification, were obtained a total of 44 isolated bioluminescent. To date, only 15 isolates obtained from the samples of water still express bioluminescence. Isolates characterized as BL 15, BL 16, BL 21 and BL 20a represent ideal donor sources of bioluminescence genes, as they demonstrated the ability to express luminescence after 144h of incubation. DNA samples from ten

isolates were subjected to sequencing of the 16S rDNA, but the product showed poor quality and did not allow reliable analysis of nucleotides in order to identify the isolates at species level. The genotypic profile of 14 isolates was grouped by the technique of DNA fingerprinting Microsatellite-primed (MSP-PCR) and showed that they probably belong to the same species. DNA samples isolates from the BL 11a, BL 12, BL 16 and BL 34 were chosen as representatives of the group, and will be sequenced again.

Key-words: Marine Bacteria. Bioluminescence. *Vibrio*. Biotechnological Potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Divisões do Litoral do Rio Grande do Sul.....	34
Figura 2 - Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí e seus limites.....	35
Figura 3A - Molhes da barra do estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí.....	36
Figura 3B - Terminal de operação da Transpetro, em Imbé.....	36
Figura 4 - Área de estudo.....	37
Figura 5 - Pontos de coleta de água.....	39
Figura 6A - Monobóias do TEDUT.....	41
Figura 6B - Detalhe dos mangotes das monobóias.....	41
Figura 6C - Exemplares de anêmonas coletados em fevereiro.....	41
Figura 6D - Agitação magnética dos fragmentos de anêmona.....	41
Figura 7A - Captura dos peixes por rede de arraste.....	42
Figura 7B - Alguns espécimes de Peixe-rei capturados na rede de arraste.....	42
Figura 7C - Suábe estéril sendo friccionado na superfície de um Linguado.....	42
Figura 7D - Suábe sendo estriado em Placa de Petri com Ágar marinho.....	42
Figura 8 - Fluxogramas das etapas de caracterização e da análise molecular dos isolados de bactérias bioluminescentes.....	46
Figura 9 - Gráfico da variação da temperatura das amostras de água (°C) dos diferentes pontos e meses de coleta.....	52
Figura 10 - Gráfico da variação da salinidade das amostras de água (em ‰) dos diferentes pontos e meses amostrados.....	53
Figura 11 - Gráfico da variação do oxigênio dissolvido presente nas amostras de água (em mg/L) dos diferentes pontos e meses amostrados.....	55
Figura 12 - Gráfico da variação do pH das amostras de água dos diferentes pontos e meses amostrados.....	57
Figura 13 - Gráfico da variação da carga microbiana total das amostras de água (em UFC totais/mL) dos diferentes pontos e meses amostrados.....	59
Figura 14 - Gráfico da variação da carga microbiana bioluminescente das amostras de água (em UFC luminescentes/mL) nos diferentes pontos e meses amostrados.....	61
Figura 15 - Células dos isolados BL 11b (A) e BL 12 (B) visualizadas ao microscópio óptico (aproximação de 1000 vezes à objetiva de 10 vezes) após coloração de Gram..	67
Figura 16 - Fotografia de uma placa de Petri contendo o isolado BL 26 expressando	

luminescência. As setas indicam as colônias em vermelho, que expressam uma luminescência mais intensa.....	69
Figura 17 - Fotografia de uma placa de Petri contendo o isolado BL 34 expressando luminescência. As setas indicam as colônias em vermelho, que expressam uma luminescência mais intensa.....	69
Figura 18 - Perfil de bandas de 12 amostras de DNA amplificadas por MSP-PCR com o oligonucleotídeo iniciador (GTG) ₅ . M: marcador de peso molecular (1 kb plus, Invitrogen).....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição dos meios utilizados para crescimento e isolamento das bactérias bioluminescentes.....	43
Quadro 2 - Códigos dos isolados bioluminescentes, zona da amostra da qual o isolado foi obtido e o respectivo mês de coleta da amostra.....	66
Quadro 3 - Intensidade da luminescência dos isolados quando cultivados em Ágar Marinho e TCBS, ao longo do tempo (em horas). Legenda: - (luminescência ausente), + (baixa intensidade); ++ (intensidade moderada); +++ (alta intensidade).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 16S rDNA: Subunidade 16S do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) ribossômico
- 16S rRNA: Subunidade 16S do Ácido Ribonucléico (RNA) ribossômico
- BLI: *Bioluminescence Imaging*
- dATP: Deoxiadenosina Trifosfato
- dCTP: Deoxicitosina Trifosfato
- dGTP: Deoxiguanidina Trifosfato
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP: Desoxinucleotídeo Trifosfato
- dTTP: Deoxitimidina Trifosfato
- EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetracético
- LB: Meio de cultura *Luria-Bertani*
- Milli-Q: água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q fornecido pela *Millipore Corporation*©.
- MSP-PCR: PCR de Metilação Específica, do inglês *Methylation Specific PCR*
- PCR: Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- RNA: Ácido ribonucléico
- RNase: ribonuclease
- SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
- TAQ: *Thermus aquaticus*
- TCBS: Meio de cultura Ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose
- TE: Tampão Tris-EDTA
- TEDUT: Terminal Marítimo Almirante Soares Dutra
- Transpetro: Petrobras Transporte S/A
- TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano
- tRNA: RNA transportador
- UFC: Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

nm: nanômetro (nanômetros)

%: porcentagem

cm: centímetro (centímetros)

m: metro (metros)

°C: graus Celsius

mL: mililitro (mililitros)

ppm: partes por milhão

min: minuto (minutos)

h: hora (horas)

km: quilômetro (quilômetros)

ka: kilo ano ou mil anos

pH: logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio em uma solução

g: grama (gramas)

μL: microlitro (microlitros)

RPM: rotações por minuto

mm: milímetro (milímetros)

pb: pares de bases

pmol: picomol

kb: kilobase

V: volts

‰: permilagem

mg: miligrama (miligramas)

L: litro (litros)

s: segundo (segundos)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 GENÉTICA E BIOQUÍMICA DA BIOLUMINESCÊNCIA	22
2.2 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES.....	24
2.3 DISTRIBUIÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES. 26	
2.4 IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E ECONÔMICA.....	28
2.5 BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES E SUAS APLICAÇÕES.....	29
2.5.1 Área Ambiental	30
2.5.2 Área Clínica	31
2.6 ÁREA DE ESTUDO.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 LOCAL.....	37
3.2 AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	38
3.2.1 Água estuarina e do mar	38
3.2.2 Invertebrados marinhos	39
3.2.3 Peixes	41
3.3 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA.....	42
3.3.1 Carga microbiana	44
3.3.2 Seleção e isolamento de linhagens bioluminescentes	44
3.3.3 Coleção	45
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS.....	45
3.5 IDENTIFICAÇÃO.....	45
3.5.1 Extração e purificação do DNA genômico	46
3.5.2 Amplificação do gene DNAr 16S das bactérias bioluminescentes por PCR	47
3.5.3 Purificação dos produtos da amplificação	48
3.5.4 Sequenciamento do gene 16S rDNA	48
3.5.5 Análise das sequências de DNA	49
3.5.6 Determinação de polimorfismo de regiões de microsatélite	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 AMOSTRAS DE ÁGUA.....	51

4.1.1 Temperatura.....	51
4.1.2 Salinidade.....	53
4.1.3 Oxigênio dissolvido.....	54
4.1.4 Potencial hidrogeniônico.....	56
4.1.5 Carga microbiana.....	58
4.2 AMOSTRAS DE INVERTEBRADOS.....	64
4.3 AMOSTRAS DE PEIXES.....	64
4.4 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BIOLUMINESCENTES.....	65
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BIOLUMINESCENTES.....	67
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BIOLUMINESCENTES.....	70
5 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O artifício de emitir luz via processos químicos, que é utilizado por muitos organismos como uma ferramenta de comunicação biológica, é denominado de bioluminescência. Dentre os mais diversos grupos que apresentam tal propriedade, um dos mais bem estudados é o das bactérias. São conhecidas bactérias bioluminescentes isoladas de diversas fontes, desde água doce a nematódeos terrestres, mas é em ambientes marinhos que elas ocorrem com maior frequência.

A expressão da bioluminescência bacteriana é ativada por um mecanismo chamado *quorum sensing* (percepção da densidade celular suficiente para gerar uma resposta celular conjunta de efeito) e é regulada essencialmente por cinco genes organizados no *operon lux*. Sabe-se que muitas espécies conhecidas como bioluminescentes apresentam linhagens não-bioluminescentes, e que outras espécies podem apresentar o *operon lux* sem, no entanto, expressarem bioluminescência.

Certas espécies de importância sanitária e econômica possuem linhagens bioluminescentes, como por exemplo, *Vibrio cholerae*, agente da cólera, e *Vibrio harveyi*, causadora da síndrome do camarão bioluminescente. Além disso, pesquisas vêm utilizando estes microrganismos em testes toxicológicos e na produção de marcadores de bioluminescência para o monitoramento *in vivo* de processos infecciosos. Os estudos com bactérias bioluminescentes estão quase sempre atrelados às doenças que estas podem causar ou às aplicações que as mesmas têm demonstrado nas áreas ambiental e clínica. Recentemente, novas espécies de bactérias bioluminescentes estão sendo descritas (AST *et al.*, 2007; BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2009; YOSHIZAWA *et al.*, 2009; YOSHIZAWA *et al.*, 2010 a, b). No entanto, no Brasil são escassos estudos que investigam a presença e as condições ideais de ocorrência destas bactérias em ambientes naturais.

Tais observações enfatizam a importância do estudo de bactérias bioluminescentes, em especial as de origem marinha, já que elas são mais abundantes nesse ambiente. À exceção do trabalho realizado por Ortega (2010), pouco se conhece sobre as espécies de bactérias bioluminescentes e sua distribuição em ambientes naturais no sul do oceano Atlântico, em especial na costa sul do país. O presente estudo teve como objetivo geral o isolamento e a identificação de bactérias bioluminescentes

de ambientes naturais e de animais marinhos do entorno da zona de estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Os objetivos específicos deste trabalho foram: determinar a carga microbiana total e bioluminescente presente nas amostras de água; relacionar a presença de bactérias bioluminescentes com as características físico-químicas da água (temperatura, salinidade, potencial hidrogeniônico e oxigênio dissolvido); selecionar os isolados com emissão de luz intensa, ideais fontes doadoras de genes de bioluminescência; e identificar por métodos moleculares as espécies de bactérias bioluminescentes selecionadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

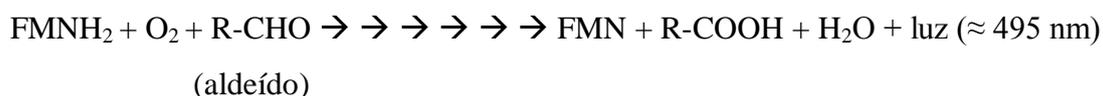
Muitos são os organismos capazes de expressar bioluminescência, aplicando-a nos mais diversos fins: captura de alimento, mimetização no ambiente, atração de parceiros sexuais, por exemplo. A maioria dos animais que apresentam tal característica pertence ao hábitat marinho. Os sistemas de bioluminescência das bactérias e dos vagalumes são os mais estudados .

2.1 GENÉTICA E BIOQUÍMICA DA BIOLUMINESCÊNCIA

Bioluminescência é a capacidade natural que muitos organismos têm de emitir luz. O processo é decorrente de reações exotérmicas catalisadas por enzimas de alta energia (luciferases) que utilizam oxigênio e moléculas específicas (luciferinas) como substrato. A oxidação da luciferina libera energia na forma de luz visível (SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992). Tal característica é comum a muitos organismos: bactérias, fungos, dinoflagelados, anelídeos, insetos, cnidários, crustáceos, equinodermas e moluscos, entre outros, aparentando ter mais de 30 origens evolutivas independentes (GREER III; SZALAY, 2002).

Apesar da existência disseminada da bioluminescência, ela foi estudada sistematicamente apenas em alguns organismos. Um dos sistemas de luciferase mais bem conhecidos é o das bactérias bioluminescentes. A reação de luminescência das bactérias ocorre como segue (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003):

Luciferase



A luciferina bacteriana, uma molécula reduzida de riboflavina fosfato (FMNH₂), reage com o oxigênio molecular originando uma oxiluciferina não reativa. A luciferase catalisa esta oxidação, atuando associada a um aldeído de cadeia longa (R-CHO). A reação é altamente específica por FMNH₂, molécula que é protegida contra a auto-oxidação no momento em que se liga à luciferase. A luz total produzida na reação

é proporcional à quantidade de cada um dos substratos (O_2 , $FMNH_2$ e $R-CHO$). A emissão luminosa se dá de maneira contínua, em um pico de aproximadamente 495 nm, e tem coloração azul-esverdeada (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003; WILSON; HASTINGS, 1998).

Diferentemente de outros organismos, em bactérias a bioluminescência é regulada por um mecanismo nomeado de auto-indução ou *quorum sensing*. Consiste em um sistema de comunicação intercelular que vincula a expressão gênica à densidade celular bacteriana. O *quorum sensing* envolve a produção autônoma de um feromônio (por exemplo, N-acilhomoserina lactona) que é chamado de auto-indutor (ZHANG, 1993). O auto-indutor atua como uma molécula-sinal: difunde-se no meio extracelular e se liga a proteínas específicas de membrana de outras bactérias, até atingir um número de ligações suficiente para evocar uma resposta bacteriana conjunta de efeito (MADIGAN *et al.*, 2010). Quando a população bacteriana cresce, há um aumento na secreção de auto-indutores e também no número de ligações com as proteínas de superfície das bactérias, o que leva à ativação da expressão de genes específicos, como aqueles ligados à bioluminescência.

Diferentes espécies de bactérias possuem diferentes genes responsáveis pela bioluminescência, mas apenas cinco deles são essenciais, estando localizados no *operon lux*: *luxA* e *luxB* codificam as subunidades α e β da luciferase; e *luxCDE* codificam enzimas que convertem ácidos graxos em um aldeído de cadeia longa requerido para a reação. Bactérias transformadas com os genes *luxA* e *luxB* emitem luz própria quando um aldeído passível de ser utilizado pela luciferase é administrado. Já espécies transformadas com o *operon lux* completo (*luxABCDE*) tornam-se bioluminescentes sem a necessidade de um fator externo adicional (MEIGHEN, 1991).

A síntese das enzimas envolvidas no processo é energeticamente dispendiosa ao metabolismo, por isso a percepção da concentração de auto-indutores e da densidade bacteriana presente no meio é uma ferramenta tão importante que garante que o produto luminescente será suficiente para causar um impacto no ambiente, tornando o processo rentável (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003). Haverá produção de luciferase (expressão dos genes *luxA* e *luxB*) somente quando for atingido um determinado limiar celular. Ocorre que, na maioria dos casos, dispersas na coluna d'água tais bactérias não atingem densidades tão significativas quanto em órgãos simbiotes de determinados animais, nos quais só então elas têm sua atividade luminescente expressa.

Um estudo realizado por Ramaiah e colaboradores (2000) utilizou um fragmento do gene lux A de *V. harveyi* como sonda para detectar bactérias cultiváveis que continham o gene da bioluminescência na Baía de Chesapeake. O estudo revelou que uma fração de 0 a 6% da comunidade de bactérias heterotróficas da Baía apresentou o gene lux A. Todas as 7800 colônias de bactérias avaliadas no estudo não apresentaram bioluminescência visível. Isso é um indicativo de que a aplicação de técnicas de biologia molecular em estudos de bactérias bioluminescentes pode contribuir para um melhor entendimento da distribuição dos genes da bioluminescência na natureza.

2.2 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES

Bactérias luminescentes são ubíquas nos oceanos, com representantes dos mais variados nichos: planctônico de vida livre, habitando inclusive águas costeiras a densidades entre 10^2 e 10^4 células por litro; parasítico; saprofítico, associadas a lesões superficiais de animais marinhos; comensalístico entérico; e mutualístico, simbiontes de espécies que possuem órgãos de luminescência (MEIGHEN, 1991; CHIU *et al.*, 2007).

Treze espécies dos gêneros *Shewanella*, *Photobacterium*, *Aliivibrio*, e *Vibrio* são mais comumente relatadas como bactérias bioluminescentes marinhas. Com base em filogenias do gene 16S rRNA, tais espécies podem ser divididas em quatro grupos: *Shewanella* (espécies *S. hanedai* e *S. woodyi*); *Photobacterium* (espécies *P. leiognathi* e *P. phosphoreum*); *Aliivibrio* (espécies *A. fischeri*, *A. logei*, *A. salmonicida*, e *A. wodanis*); e grupo *Vibrio harveyi* (espécies *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. orientalis* e *V. cholerae*) (CHIU *et al.*, 2007; URBANCZYK *et al.*, 2007).

O grupo *Shewanella* destaca-se pela ausência de capacidade fermentativa, apresentando metabolismo exclusivamente respiratório, já as demais espécies de bactérias bioluminescentes obtêm energia de ambas as formas (CHIU *et al.*, 2007). *S. hanedai*, anteriormente descrita sob o gênero *Alteromonas*, tem sido isolada a partir de sedimentos do Ártico, e desde águas subsuperficiais (30 a 60 cm) da Antártida e Sannich Inlet, a águas profundas (100 e 200 m) da Columbia Britânica (JENSEN *et al.*, 1980; BOWMAN *et al.*, 1997). Makenson e colaboradores (1997), a partir de amostras do mar de Alboran, propuseram a descrição de *S. woodyi* como uma nova espécie,

muito semelhante a *S. hanedai*, mas taxonomicamente distinta dela.

Muitos isolados a partir de órgãos luminescentes de peixes têm revelado a presença do gênero *Photobacterium*, evidenciando um hábito mutualístico das espécies deste gênero. *P. phosphoreum* é mais encontrada como simbiote de peixes de profundidade, enquanto *P. leiognathi* é isolada de peixes com hábito mais costeiro (MEIGHEN, 1991).

Aliivibrio fischeri e *A. logei* ocorrem em simbiose com peixes e lulas, principalmente nos órgãos luminosos, e na água do mar, enquanto *A. salmonicida* e *A. wodanis* foram inicialmente descritas como patógenos de peixes. A análise de isolados de *Aliivibrio spp.* por meio de sequenciamento de vários genes mostrou que existem outras espécies de *Aliivibrio* bioluminescentes ainda não descritas (AST; URBANCZYK; DUNLAP, 2009).

O grupo *Vibrio harveyi* tem importância sanitária e econômica, pois a maioria de suas espécies é potencialmente patogênica. *V. harveyi* está presente disperso em águas oceânicas ou associado a alguns animais marinhos, sendo responsável pela síndrome do camarão luminescente (GOMEZ-GIL *et al.*, 2004). *V. cholerae*, apesar de possuir inúmeras cepas inofensivas, pode causar coléra, doença disseminada em países sem tratamento adequado de esgoto que é transmitida por água e alimentos contaminados (COSTA, 2006). *V. vulnificus* e *V. splendidus* ocorrem naturalmente em águas estuarinas, mas podem se tornar prejudiciais: o primeiro ocasiona septicemia em humanos imunodeprimidos contaminados via feridas expostas ou via consumo de alimentos de origem marinha; o segundo provoca necrose em larvas de ostras, danificando cultivos destes animais (SUGUMAR, 1998; COSTA, 2006). *V. orientalis* foi isolado de amostras de água do mar Amarelo, na China (YANG *et al.*, 1983).

Novas espécies de bactérias marinhas bioluminescentes têm sido descritas, como *Photobacterium kishitanii*, isolada da pele e dos órgãos de luminescência de peixes de profundidade do Japão, Havaí, África do Sul, Cabo Verde e Flórida (AST *et al.*, 2007); *Vibrio azureus*, *Photobacterium aquimaris*, *Aliivibrio sifiae* e *Vibrio sagamiensis*, isolados de água do mar no Japão (YOSHIZAWA *et al.*, 2009; YOSHIZAWA *et al.*, 2010) e *Aliivibrio finisterrensis*, encontrado em mariscos (BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2009).

2.3 DISTRIBUIÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES

Os oceanos de todo o mundo têm sido alvo de estudos que visam ao entendimento dos hábitos, distribuição, ecologia, dentre outros aspectos, das bactérias bioluminescentes marinhas. Tais microrganismos têm sido encontrados em todas as áreas já estudadas, de regiões tropicais a polares e de águas obtidas da superfície até grandes profundidades.

Ruby, Greenberg e Hastings (1980) compararam bactérias bioluminescentes isoladas de amostras de água em mar aberto no Atlântico Norte e na costa de Porto Rico, sob diferentes profundidades e temperaturas. Acima dos 150 m de profundidade predominaram as espécies do gênero *Vibrio*, enquanto entre 250 a 1000 m a espécie *P. phosphoreum* foi a mais abundante. *A. fischeri* e *P. leiognathi* foram isoladas de amostras entre 200 e 600 m, mas apresentaram baixas densidades celulares. Os víbrios encontrados demonstraram o valor mais alto de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por litro. Obtiveram-se isolados bioluminescentes entre 13 e 21°C, cujas densidades celulares não aparentaram ter relação direta com a temperatura. Atentou-se para que as flutuações entre as densidades celulares das bactérias bioluminescentes devam também ser relacionadas em estudos posteriores com outros fatores, como por exemplo, salinidade e concentração de nutrientes dissolvidos.

No mar de Sargasso, entre 160 e 320 m de profundidade, *A. fischeri* e *V. harveyi*, constituíram mais de 90% das bactérias luminescentes encontradas (ORNDORFF; COLWELL, 1980), e nas águas superficiais costeiras da Califórnia estas mesmas espécies representaram 99% dos isolados luminescentes obtidos (RUBY; NEALSON, 1978). Praticamente todos os isolados de águas costeiras no mar Tirreno (Sicília) foram identificados como *V. harveyi* (CACCAMO *et al.*, 1999).

Chiu *et al.* (2007) isolaram e caracterizaram bactérias luminescentes marinhas em águas costeiras rasas de Taiwan, tendo encontrado *V. harveyi/campbellii* e *P. leiognathi*. Bactérias bioluminescentes foram encontradas em todas as amostras de água analisadas, com uma contagem de 7 UFC/mL (a 23°C) a 500 UFC/mL (a 30°C).

Víbrios luminescentes, *A. fischeri* e *P. phosphoreum* foram reportados como parasitas entéricos de 22 espécies de peixes do México e da Califórnia (desde os superficiais até aqueles que alcançam profundidades médias). Tais bactérias

bioluminescentes ocorreram a concentrações entre 10^5 e 10^7 UFC/mL de trato intestinal. Visto que as mesmas sobreviviam após os processos de digestão, observou-se grande proliferação destas espécies nas fezes dos peixes, com posterior disseminação na água do mar. Considerou-se que o trato entérico dos peixes funciona como uma via de enriquecimento de bactérias bioluminescentes no ambiente marinho (RUBY; MORIN, 1979). Mais tarde, Nunes-Halldorson e Duran (2003) sugeriram que esta amplificação de bactérias bioluminescentes teria o significado ecológico de atrair consumidores de detritos fecais.

No Hawaii, Wollenberg e Ruby (2009) estudaram a estrutura populacional de *A. fischeri* nos órgãos luminosos de lulas. Concluíram que a população bacteriana simbiote em cada órgão luminoso de lulas adultas é policlonal, dominada por uma a três populações geneticamente distintas.

Stabili e colaboradores (2008) estudaram bactérias luminescentes isoladas de briozoários e hidrozoários e concluíram que os víbrios luminescentes representam os principais constituintes da comunidade microbiana que habita a superfície de alguns desses animais. Sugeriu-se que tal associação ocorra porque os microrganismos se alimentam das estruturas quitinosas dos animais. Os briozoários e hidrozoários poderiam atuar como portadores dessas bactérias nos oceanos, tornando-se um reservatório de espécies potencialmente patogênicas.

Normalmente, há uma tendência à perda da característica de bioluminescência em isolados mantidos em laboratório. Entretanto, Dunlap e colaboradores (1995) descreveram o aparecimento de uma variante de uma linhagem de *A. fischeri* que emitia luminosidade visível após estocagem prolongada, sendo que a cultura original, obtida de água do mar, já não era mais visivelmente bioluminescente.

Coleções de bactérias bioluminescentes, como a do Instituto de Biofísica da Academia de Ciências da Rússia (<http://bl.ibp.ru>; <http://lux.ibp.ru>) (GITELSON *et al.*, 2000) e bancos de dados sobre bactérias bioluminescentes, como o Biolumbase (MEDVEDEVA *et al.*, 2005), são importantes tanto para estudos básicos de bioluminescência e *quorum sensing*, quanto para aplicações biotecnológicas, utilizando as próprias bactérias como biosensores ou as utilizando como fonte de genes de bioluminescência. Esta coleção é composta por culturas provenientes de várias regiões oceânicas do mundo.

2.4 IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E ECONÔMICA

A maioria das bactérias bioluminescentes pertencentes ao gênero *Vibrio* é de relevância epidemiológica, pois pode vir a desenvolver linhagens patogênicas tanto para o homem quanto para os animais, principalmente os de origem marinha. *V. harveyi*, por exemplo, é considerado microbiota normal de camarões saudáveis, mas pode tornar-se virulento e causar altas taxas de mortalidade em fazendas de cultivo de camarão em todo o mundo, além de causar doenças em ostras, dentre outros animais (CHRISOLITE *et al.*, 2008).

O homem pode se infectar ao consumir pescados e moluscos crus ou parcialmente submetidos à cocção. Dentre as principais doenças causadas por estes patógenos, podem-se destacar as manifestações gastrintestinais e extra-intestinais, caracterizadas por infecção cutânea e otites, especialmente em manipuladores de alimentos, profissionais do ramo da pesca e mergulhadores (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004).

Muitos estudos têm se dedicado a investigar a presença destes microrganismos em cultivares de aquacultura e a avaliar as formas de tratamento deste tipo de infecção. Karunasagar e Otta (1995) pesquisaram a resistência de biofilmes de *V. harveyi* a sanitizadores. Os isolados foram obtidos de cultivos de camarão na Índia e as superfícies testadas foram: concreto, plástico e aço. As densidades celulares foram maiores no plástico, seguido pelo concreto e, por último, pelo aço. Quanto à sensibilidade ao cloro, os biofilmes de *V. harveyi* que apresentaram maior sensibilidade foram aqueles formados no concreto, seguidos por aqueles formados no plástico e no aço. As células planctônicas, dispersas na água, foram mais sensíveis às menores concentrações de cloro. Com relação a antibióticos, mesmo a concentrações de 50 ppm de cloranfenicol e tetraciclina não houve a formação de biofilmes. Estudos como estes ganham cada vez mais importância no campo da aquacultura.

Cultivares do camarão *Litopenaeus vannamei* no estado de Pernambuco foram tema dos trabalhos de Silva (2007), que identificou os principais fatores de interferência da vibriose nestes locais; e de Dantas (2008), que verificou os efeitos do uso de probióticos em indivíduos submetidos à infecção por *V. harveyi*. Mourino e

colaboradores (2008) observaram alta carga de *Vibrio* nas águas do Laboratório de Camarões Marinhos, da Universidade Federal de Santa Catarina. Costa (2006) estudou os víbrios associados ao cultivo de camarão *L. vannamei* em fazendas do Ceará. Foram isoladas 14 diferentes espécies, 5 delas bioluminescentes: *A. fischeri*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* e *V. splendidus*.

Outros estudos se dedicam a constatar a contaminação de alimentos de origem marinha por espécies de bactérias patogênicas que apresentam bioluminescência relatada na literatura. No entanto, tal característica não é mencionada nestes trabalhos, que tem como foco a patogenicidade destas bactérias. Pereira, Viana e Rodrigues (2007) investigaram a presença de víbrios em 40 amostras de ostras (*Crassostrea rhizophoreae*) servidas em 15 restaurantes da Cidade do Rio de Janeiro. Foi obtido um total de 178 isolados, correspondendo a 8 espécies do gênero *Vibrio*. Dentre elas, as espécies potencialmente bioluminescentes *V. vulnificus* e *V. orientalis*. Pereira e colaboradores (2007) avaliou os víbrios associados a mexilhões (*Perna perna*) de uma estação experimental de cultivo, também no Rio de Janeiro. Nos mexilhões, foram encontradas 12 espécies de víbrios, entre elas *V. vulnificus*, *V. orientalis*, e *V. cholerae* da linhagem não O1 (não patogênicas).

Os víbrios são componentes naturais dos oceanos, estuários e corpos dulciaquícolas, apresentando variantes não patogênicas; mas comumente causam prejuízos à saúde humana e a fazendas de aquacultura. Os estudos com bactérias bioluminescentes no Brasil estão notadamente direcionados a estas espécies, tendo como objetos principais a patogenicidade que são capazes de desenvolver, pouco atentando às aplicações acerca de sua propriedade luminescente.

Entretanto, Ortega (2010) realizou um estudo pioneiro avaliando o potencial bioluminescente de bactérias marinhas isoladas de amostras de água da mesma região contemplada neste trabalho. Obtiveram-se 5 isolados bioluminescentes, identificados por métodos bioquímicos como *V. harveyi*.

2.5 BACTÉRIAS BIOLUMINESCENTES E SUAS APLICAÇÕES

No começo do século 17, o cientista alemão Robert Boyle descobriu que o

oxigênio molecular estava envolvido com o processo da bioluminescência, que naquela época era caracterizada como “o brilho incerto que alguns peixes exibiam” (DUNLAP; KITA-TSUKAMOTO, 2006). Mais tarde, provou-se que muitas bactérias poderiam apresentar luminescência. Desde então muitos estudos têm se voltado à pesquisa da luminescência bacteriana e suas potenciais aplicações. O uso desta ferramenta para aplicações analíticas vem se tornando mais popular desde a última década. Diferentes abordagens e testes com bactérias luminescentes ou com a manipulação de genes isolados do *operon lux* vêm sendo desenvolvidos para aplicação nas áreas ambiental e clínica (ULITZUR, 1997).

2.5.1 Área Ambiental

Bactérias são capazes de degradar rapidamente os compostos orgânicos dissolvidos no meio aquático, de forma que estes possam ser reassimilados por outros organismos presentes na cadeia trófica, como produtores primários e filtradores. A presença de um poluente no ambiente é rapidamente detectada pelas bactérias, evocando uma rápida resposta da comunidade microbiana. Por este motivo, as bactérias são consideradas bons indicadores da qualidade ambiental (RUBINGER, 2009).

A emissão de luz pelas bactérias bioluminescentes é dependente de funções metabólicas, e, conseqüentemente, agentes tóxicos ao interferir no metabolismo destes microrganismos também comprometem sua emissão luminosa. Esta redução na atividade de luminescência é proporcional à toxicidade da amostra (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003). E é baseando-se nesta propriedade, que vêm se desenvolvendo testes toxicológicos com estas bactérias.

O ensaio biológico de inibição de bioluminescência de bactérias é um teste de inibição metabólica que utiliza uma suspensão padronizada de bactérias luminescentes como organismo-teste sob condições padronizadas. O ensaio com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* é baseado na diferença de luminosidade que a bactéria emite no início do ensaio e após o tempo de contato com a amostra.

O ensaio de toxicidade crônico foi desenvolvido pela empresa alemã Dr. Lange, e pela empresa Microtox. A Dr. Lange atualmente não comercializa este ensaio.

O teste é considerado uma forma rápida, confiável e conveniente de determinar a toxicidade causada por algum composto presente na amostra (RUBINGER, 2009). O método do ensaio consiste na exposição de linhagens bioluminescentes de *Vibrio fischeri* viáveis a uma amostra teste por um período de 15 min a 2h. O efeito tóxico é caracterizado pela medição comparativa de emissão de luz de bactérias reidratadas e liofilizadas depois da exposição a uma série de diluições específicas de uma amostra e compara-se com a luz emitida de um controle branco (células não expostas às substâncias que se quer testar a resposta) (RUBINGER, 2009).

O teste de bioluminescência bacteriana tem sido validado para uma variedade de aplicações ambientais incluindo-se monitoramento de efluentes, teste de águas subterrâneas, teste de sedimentos, teste de resíduos perigosos e avaliação de eficiência de procedimentos de bioremediação e em processos de biomonitoramento em geral (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003).

2.5.2 Área Clínica

Os genes da bioluminescência, principalmente bacterianos, vêm sendo utilizados como marcadores para o monitoramento *in vivo* de células cancerígenas e de processos infecciosos em cobaias, por intermédio de uma técnica de diagnóstico por imagem denominada *Bioluminescence Imaging* (BLI). Trata-se de uma ferramenta versátil e sensível que se baseia na detecção da emissão da luminescência de células, tecidos ou órgãos-alvo.

Os genes bacterianos do *operon lux* têm sido isolados, amplificados e empregados na produção de cassetes de expressão da bioluminescência através de técnicas de biologia molecular. Os cassetes são inseridos no alvo que se pretende estudar, por exemplo, um microrganismo patogênico. O patógeno já transformado com os genes da bioluminescência é implantado em cobaias para ser monitorado. O monitoramento *in vivo* é comumente feito em equipamentos com câmara CCD (do inglês *Charge Couple Device*), capaz de captar os focos de bioluminescência nas cobaias, permitindo que a evolução da infecção por este microrganismo seja estudada.

Neste sentido, a BLI tem permitido avanços importantes no acompanhamento

da proliferação de tumores, no estudo da interação patógeno-hospedeiro *in vivo*, no monitoramento da distribuição do patógeno revelando a localização e extensão da infecção, na distinção entre linhagens mais e menos virulentas, na avaliação de diferentes linhagens de cobaias em relação à suscetibilidade à infecção e no monitoramento em tempo real da terapia com antimicrobianos (SATO; KLAUNBERG; TOLWANI, 2004). Muitos grupos de pesquisa vêm investigando a aplicação da BLI a diversos microrganismos.

Contag e colaboradores (1995) provaram que a técnica de BLI era factível ao monitorar *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium bioluminescente em um modelo de infecção gastrointestinal. Francis e colaboradores (2000) monitoraram a eficácia do tratamento de uma infecção induzida em cobaias causada por *Staphylococcus aureus* bioluminescente. A equipe de Francis teve que superar o problema de expressão dos genes de bioluminescência, tipicamente oriundos de bactérias Gram negativas (bactérias bioluminescentes), em bactérias Gram positivas (*S. aureus*). Isso foi conseguido com a introdução, em cada gene do *operon*, de um sítio de ligação ao ribossomo Gram positivo.

Inicialmente, os modelos desenvolvidos inseriam os genes de bioluminescência na linhagem de bactéria patogênica por meio de plasmídeos. Porém, mecanismos de inserção por transposons e integração ao cromossoma já foram desenvolvidos. Além de *S. enterica* sorovar Thyphimurium e *S. aureus*, a técnica de BLI já foi aplicada no monitoramento *in vivo* de *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. e *Listeria monocytogenes*, entre outras (JAWHARA; MORDON, 2004, CONTAG; BACHMANN, 2002; HARDY *et al.*, 2004).

Estudos de Bioluminescence Imaging (BLI) para o monitoramento de infecções virais também já foram realizados, como as causadas pelo vírus herpes simplex tipo 1 e vírus *Sindbis* (COOK; GRIFFIN, 2003; LUKER *et al.*, 2002). Entre os parasitas, a técnica já foi aplicada em *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium berghei*, permitindo o estudo de estágios específicos no ciclo de vida desses parasitas (FRANKE-FAYARD *et al.*, 2005; LANG *et al.*, 2005; SAEIJ *et al.*, 2005).

O desenvolvimento e uso de fungos bioluminescentes para monitorar infecções fúngicas *in vivo* está menos avançado do que para outros patógenos, devido aos desafios técnicos para a obtenção de fungos patogênicos bioluminescentes (HUTCHENS;

LUKER, 2007). O monitoramento de infecções de mucosas e sistêmicas por *Candida albicans* bioluminescentes já foi proposto, porém os autores empregaram a luciferase de vagalume para a construção do biorepórter (DOYLE *et al.*, 2006 a,b). A infecção em mucosa foi monitorada com sucesso, porém na infecção sistêmica houve emissão fraca de luz, que foi atribuída, entre outros motivos, à baixa permeabilidade da parede celular da forma filamentosa de *C. albicans*. Apesar de objetivarem outras aplicações que não o estudo da interação patógeno-hospedeiro, existem relatos de transformação de *Saccharomyces cerevisiae* com genes de bioluminescência, tanto provenientes de vagalume quanto de bactérias, inclusive com a inserção do *operon lux* completo (GUPTA *et al.*, 2003; HOLLIS *et al.*, 2000; SANSEVERINO *et al.*, 2005). Mais especificamente, GUPTA *et al.* (2003) resolveram o problema de expressão do *operon lux* de procariontes em *S. cerevisiae* com a utilização de vetores de expressão e sítios de reconhecimento de ribossomos de leveduras, provando que a estratégia é viável para estes microrganismos.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul vem desenvolvendo um projeto de monitoramento *in vivo* de cobaias infectadas por *Cryptococcus neoformans* transformados com o *operon lux*, através de BLI. Para gerar os mutantes bioluminescentes de *C. neoformans*, a equipe executora do projeto deseja utilizar as linhagens de bactérias obtidas neste trabalho como fonte doadora de genes da bioluminescência.

2.6 ÁREA DE ESTUDO

O Rio Grande do Sul possui uma vasta e estreita planície costeira, que se alarga em direção ao sul, é banhada pelo Oceano Atlântico e coberta por dezenas de lagoas e lagunas. Tem cerca de 610 km de comprimento e atinge até 120 km de largura, estendendo-se desde Torres, ao norte, até o Arroio Chuí, ao sul (VILLWOCK, 1994).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul formou-se durante o Período Quaternário por intermédio da justaposição lateral de quatro sistemas deposicionais da classe laguna-barreira. Os sistemas barreira-laguna I, II e III desenvolveram-se no Pleistoceno e o sistema barreira-laguna IV iniciou sua formação há cerca de 7 ka. A

sobreposição destes sistemas foi controlada pelas variações do nível do mar características do Período, razão pela qual o ambiente é composto por sucessões entre depósitos marinhos e lagunares (VILLWOCK, 1994).

A linha de costa da Planície Costeira do estado tem orientação geral Nordeste-Sudoeste e possui praias arenosas e retilíneas, dominadas por ondas (CALLIARI *et al.*, 2005). A Figura 1 mostra como o Litoral do Rio Grande do Sul está dividido.



Figura 1. Divisões do Litoral do Rio Grande do Sul.

Fonte: FEPAM (2007).

O Litoral Norte do Rio Grande do Sul integra 19 municípios e apresenta uma linha de costa com cerca de 136 km de extensão. Limita-se ao Sul pelo Balneário Pinhal, ao norte pelo Rio Mampituba, a leste pela porção Sul do oceano Atlântico e a oeste delimita-se em função de sua formação geológica, relevo, bacia hidrográfica, e demarcações políticas, estendendo-se até o município de São Francisco de Paula. Situada nesta porção do litoral, encontra-se a Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí,

importante unidade geográfica que abriga diversificados ambientes naturais: desde rios, lagoas, zona de estuário até áreas de banhado e campos de dunas. A Figura 2 expõe a localização desta Bacia.

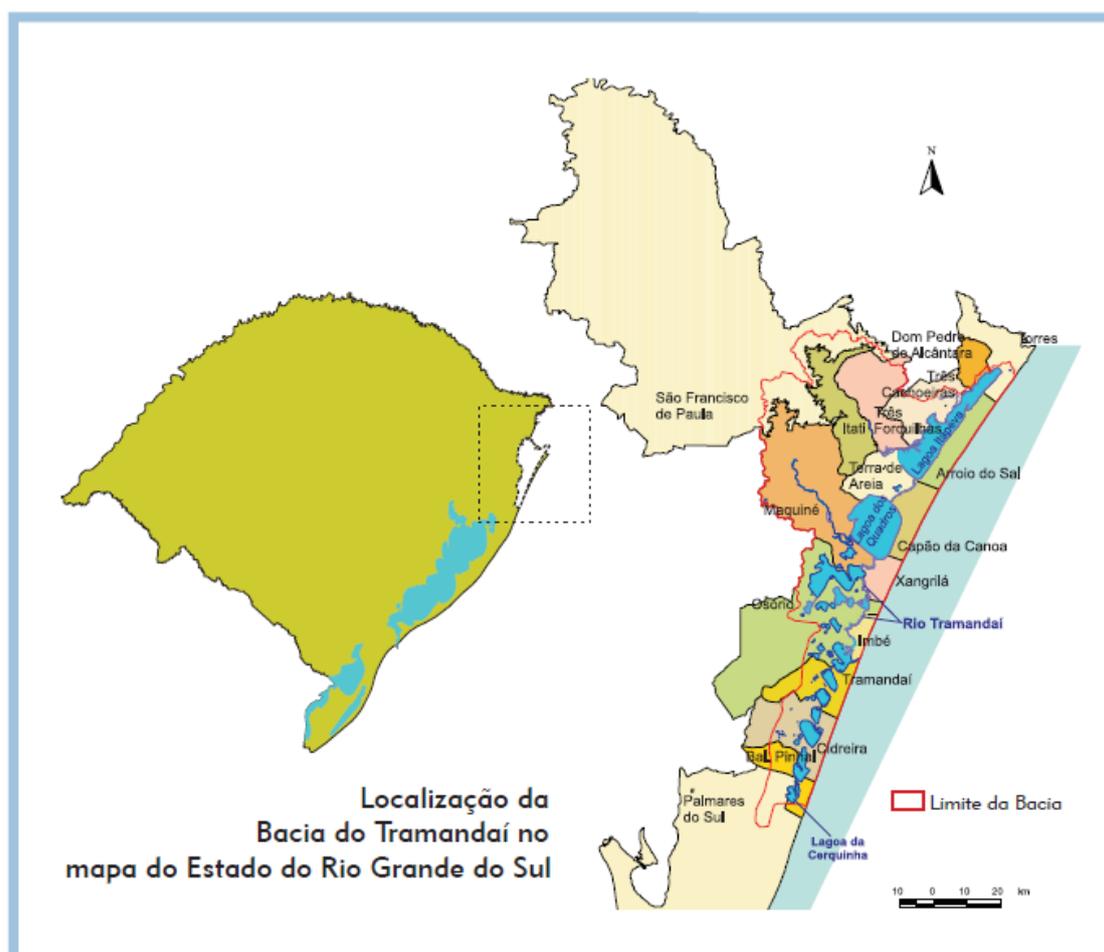


Figura 2. Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí e seus limites.

Fonte: COMITÊ DE GERENCIAMENTO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ (2008).

Imbé e Tramandaí, municípios vizinhos ao estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, têm como principais atividades econômicas o turismo e a pesca. A região conta com um terminal de descarregamento, transporte e armazenamento de petróleo bruto, nafta e diesel - Terminal Almirante Soares Dutra (TEDUT) - que movimentam o trânsito diário de lanchas operantes do Terminal através do estuário (Figura 3, A e B). Schwarzbold e Würdig (1992) declararam este ambiente como vulnerável a derramamentos de petróleo.



Figura 3. Molhes da barra do estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí. (A). Terminal de operação da Transpetro, em Imbé, à direita (B). Fotografadas do município de Imbé.

Fonte: Autor (2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas analisadas neste trabalho foram realizadas no período entre julho de 2010 e abril de 2011. As amostras foram obtidas nas adjacências da zona de estuário da Bacia do Rio Tramandaí, Litoral Norte do Rio Grande do Sul.

3.1 LOCAL

O presente estudo realizou-se nas imediações da zona de estuário da Bacia do Rio Tramandaí (Figura 4), entre os municípios de Imbé e Tramandaí. A formação geológica desta zona está associada aos eventos holocênicos de transgressão e regressão do nível do mar, atuantes no desenvolvimento do sistema deposicional barreira-laguna IV (DILLENBURG, 1994 *apud* TABAJARA; DILLENBURG, 1997). Trata-se de um canal localizado na porção média do Litoral Norte, com cerca de 1,5 km de extensão, 100 m de largura e 3 m de profundidade média, que conecta o sistema de lagoas costeiras da região com o oceano (TOMAZZELLI; VILLWOCK, 1991).

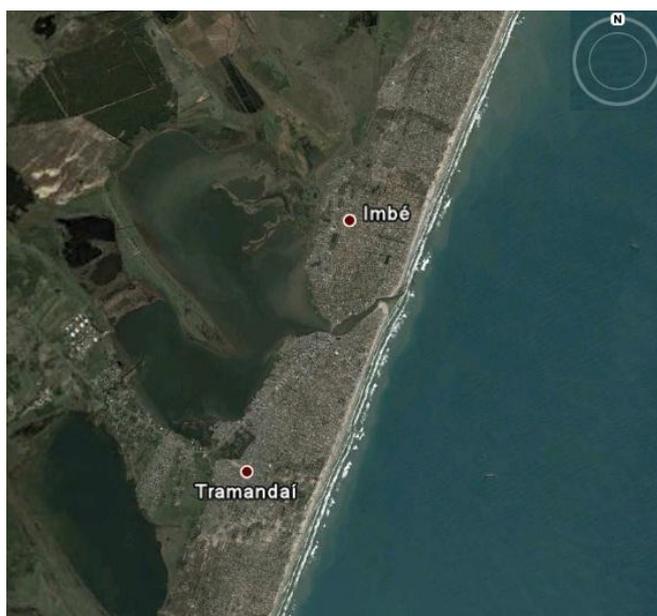


Figura 4. Área de estudo. Canal estuarino que conecta a Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí com o oceano e adjacências.

Fonte: Google Earth (2011).

3.2 AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostras de água do mar foram coletadas nas zonas de estuário, de pós-arrebentação, de transição e das monobóias do TEDUT, da Transpetro em Tramandaí, com uma distância de cerca de duas milhas da costa (deste último local também se obtiveram invertebrados marinhos incrustantes). Coletaram-se também amostras de muco superficial de peixes de águas rasas de Tramandaí e de mar aberto em Imbé.

3.2.1 Água estuarina e do mar

Foram coletadas amostras de água superficial do estuário e do mar, respectivamente em um ponto costeiro de Imbé e em três pontos de Tramandaí. Coletas mensais foram efetuadas em cada ponto no período entre julho de 2010 e abril de 2011 (à exceção do mês de julho, quando houve coleta somente no ponto estuarino, e do mês de agosto, quando não houve coleta).

Os pontos de Tramandaí foram alcançados a bordo de uma lancha de manutenção das monobóias e mangotes transportadores de derivados de petróleo da Transpetro, e foram determinados a fim de representar três possíveis microhabitats: o Ponto 1, denominado de zona de pós-arrebentação, distante o bastante da zona de mistura do estuário, que sofre mínima influência das águas continentais, local onde as ondas começam a se formar e portanto têm menor intensidade; o Ponto 2, nomeado de zona intermediária, situado entre o Ponto 1 e o Ponto 3; o Ponto 3, próximo às monobóias do TEDUT, a cerca de duas milhas da costa, designado como zona das monobóias.

Na Figura 5 pode-se visualizar a localização dos pontos determinados para as coletas de água no estuário e no mar.

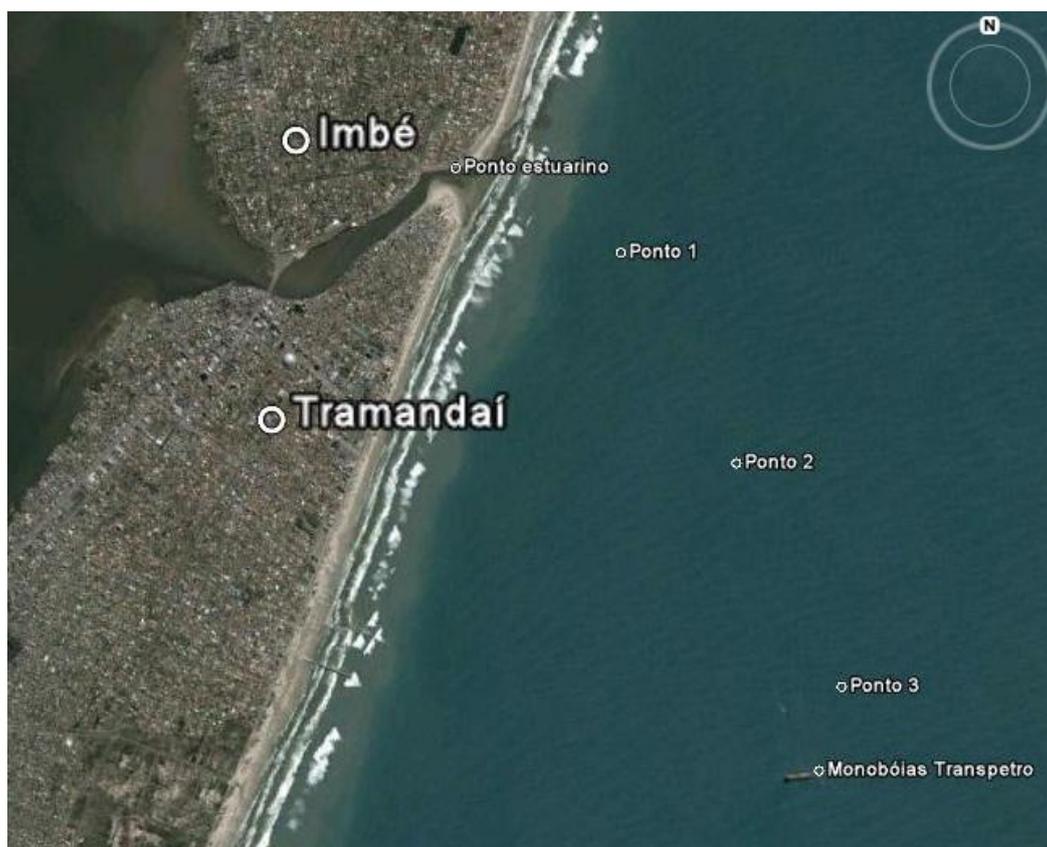


Figura 5. Pontos de coleta de água. Ponto estuarino, em Imbé. Pontos no mar, em Tramandaí. O Ponto 1, logo após a zona de arrebatção; o Ponto 2, intermediário entre o estuário e as monobóias; e o Ponto 3, junto às monobóias da Transpetro, a cerca de 2 milhas da costa.

Fonte: Google Earth (2011).

Recipientes de vidro estéreis foram lançados superficialmente na lâmina d'água para coleta das amostras, que tiveram a temperatura aferida com um termômetro simples de mercúrio. Os recipientes foram mantidos em isopor com gelo e transportados ao laboratório, local no qual também se aferiu o potencial hidrogeniônico (pH-metro Homis PH-016), o oxigênio dissolvido (Oxygen meter Instrutherm MO-890) e a salinidade das amostras, sendo esta última determinada através do Método indireto por volumetria de precipitação (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005; BAUMGARTEN; ROCHA; NIENCHESKI, 1996).

3.2.2 Invertebrados marinhos

Invertebrados marinhos incrustados na porção submersa das monobóias do TEDUT, em Tramandaí (Figura 6, A e B), foram coletados por mergulhadores profissionais empregados da Transpetro. A coleta destes animais não teve frequência previamente determinada, pois dependeu da disponibilidade dos mergulhadores e das condições marítimas vigentes no local.

Obtiveram-se amostras de invertebrados marinhos nos meses de novembro e dezembro de 2010 e fevereiro de 2011. Os indivíduos foram coletados através de raspagem do substrato metálico dos mangotes com faca, acondicionados em potes plásticos com água do mar (Figura 6, C) e transportados desta maneira até o laboratório.

Foram selecionados nove indivíduos para análise: em novembro três exemplares de mexilhão (*Mytilus* sp., Família Mytilidae, Ordem Mytiloidea, Classe Bivalvia, Filo Mollusca); em dezembro um exemplar de mexilhão, um exemplar de craca (Sub-ordem Sessilia, Ordem Thoracica, Classe Cirripedia, Subfilo Crustacea, Filo Arthropoda) e um exemplar de esponja (Classe Desmospongiae, Subfilo Celullaria, Filo Porifera); e em fevereiro um exemplar de craca, um exemplar de anêmona (Ordem Actiniaria, Sub-classe Hexacorallia, Classe Anthozoa, Filo Cnidaria) e um exemplar de gastrópode (Classe Gastropoda, Filo Mollusca) com briozoário incrustado (Filo Bryozoa).

O método utilizado para o isolamento de bactérias bioluminescentes oriundas das amostras de invertebrados foi adaptado de *Food and Drug Administration* (FDA, 1992). Os animais foram lavados com água destilada estéril, e posteriormente dissecados com o auxílio de um bisturi, a fim de obter-se 25 g do corpo do animal.

Os fragmentos dos animais foram depositados separadamente em vidros do tipo Béquer contendo 250 mL de água peptonada 1% (pH 7,8), e então receberam agitação magnética (Biomixer 78 HW-1) por um período entre 12 e 18 horas (Figura 6, D). A disponibilidade de apenas três agitadores magnéticos limitou o número de amostras a serem analisadas. Também se coletou o muco superficial dos exemplares obtidos em fevereiro, através da técnica de suábes.

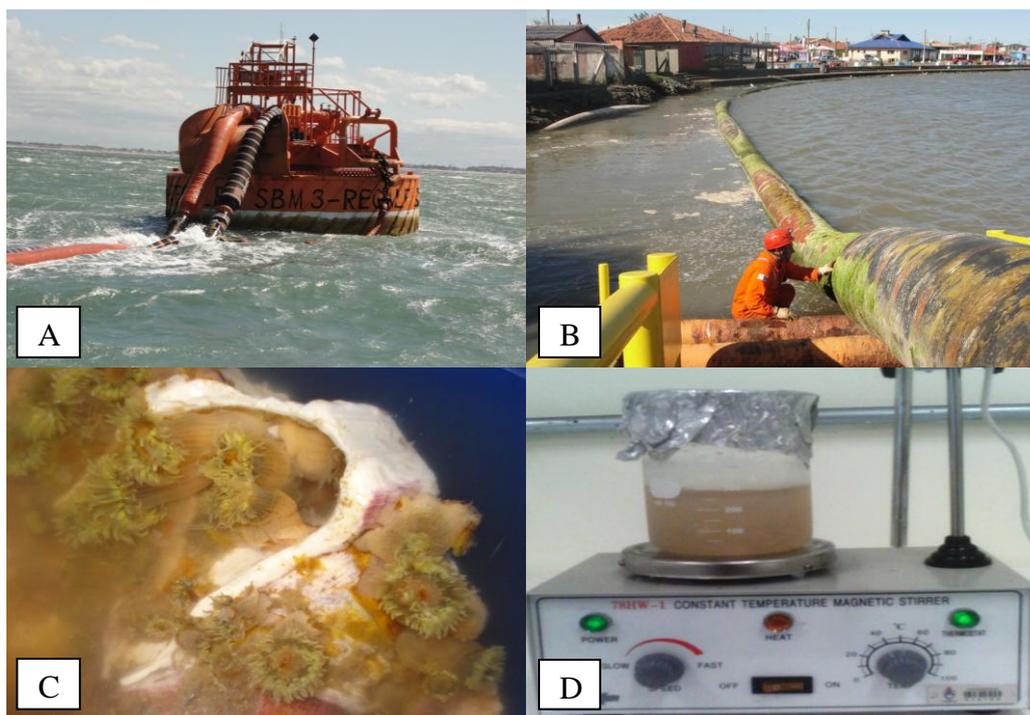


Figura 6. Monobóias do TEDUT, Transpetro, a cerca de duas milhas da costa (A). Detalhe dos mangotes das monobóias expostos na zona de estuário em uma operação de limpeza (B) Exemplares de anêmonas coletados em fevereiro (C). Agitação magnética dos fragmentos de anêmona em água peptonada tamponada 1% estéril (D).

Fontes: Imagens A e B cedidas por Vanessa Agostini. Imagem C cedida por Daniela Hoss. Autor (2011) (imagem D).

3.2.3 Peixes

Peixes marinhos foram capturados junto à desembocadura do estuário, em águas costeiras da praia de Tramandaí, com rede de arraste com malha de 5 mm entre nós opostos (Figura 7, A e B).

Foram analisados três exemplares de Savelha (*Brevoortia aurea*, Família Clupeidae, Ordem Clupeiformes) e três de Peixe-rei (Família Atherinopsidae, Ordem Atheriniformes) em setembro; e também três exemplares de Peixe-rei e dois de Linguado (Família Bothidae, Ordem Pleuronectiformes) em outubro. Em abril, foram doados para este estudo três exemplares de peixes capturados por barcos pesqueiros de Imbé em rede de espera: um de Cangoa (*Stellifer* sp., Família Scianidae, Ordem

Perciformes) e dois de Pescada-olhuda (*Cynoscion* sp., Família Scianidae, Ordem Perciformes).

Suábes estéreis foram friccionados em toda a superfície dos peixes, e estriados em Placas de Petri contendo o meio Ágar marinho (Figura 7, C e D), cuja composição se encontra descrita no Quadro 1.

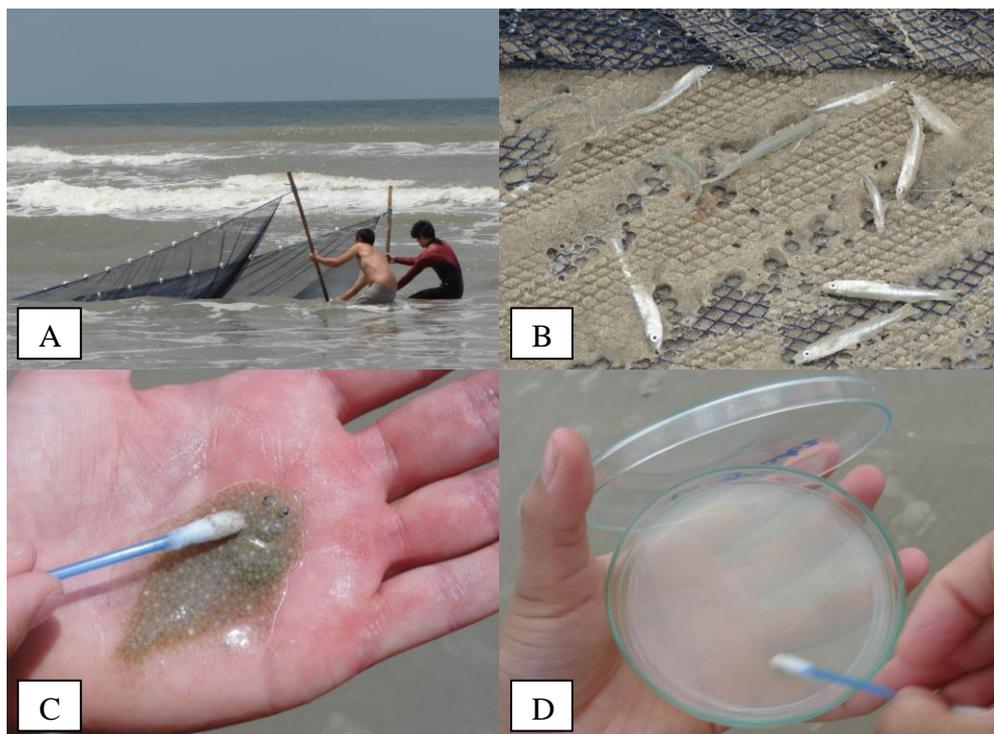


Figura 7. Captura dos peixes por rede de arraste em águas costeiras da praia de Tramandaí (A). Alguns espécimes de Peixe-rei (Atherinopsidae: Atheriniformes) capturados na rede de arraste (B). Suábe estéril sendo friccionado na superfície de um Linguado (Bothidae: Pleuronectiformes) coletado (C). Suábe sendo estriado em Placa de Petri com Ágar marinho (D).

Fonte: Fotos cedidas por Natália Wingert.

3.3 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

A composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento dos microrganismos, isolamento e manutenção dos isolados bioluminescentes é apontada no Quadro 1.

Meio de enriquecimento	1,25% de Tris-HCl (pH 7,5); 0,025% de cloreto de amônio; 0,0019% de fosfato de potássio; 0,0007% de sulfato férrico; 0,025% de glicose
Água do mar artificial	2,338% de cloreto de sódio; 2,465% de sulfato de magnésio; 0,149% de cloreto de potássio; 0,294% de cloreto de cálcio
Meio Basal	1,58% de Tris-HCl 0,1M (pH 7,5); 0,1% de cloreto de amônio; 0,0057% de fosfato de potássio; 0,0028% de sulfato de ferro; 50 mL de água; 50 mL de água do mar artificial
Meio Ágar luminescência	0,79% de Tris-HCl 0,05M (pH 7,5); 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de triptona; 0,1% de carbonato de cálcio; 0,3% de glicerol; 2% Ágar; 100 mL de Meio Basal
Meio Ágar marinho	0,5% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 0,00812% de cloreto férrico; 0,1% de citrato de sódio; 1,5% de cloreto de sódio; 2% Ágar
Tiosulfato-Citrato-Sais biliares-Sacarose	8,9% TCBS
Luria-Bertani	2% LB, 2% Ágar

Quadro 1. Composição dos meios utilizados para crescimento e isolamento das bactérias bioluminescentes.

Alíquotas de 0,1 mL e 1 mL de cada amostra de água foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios Ágar marinho, eficiente para o crescimento de bactérias heterotróficas, e TCBS (tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose), seletivo para o gênero *Vibrio*. Uma alíquota de 25 mL foi estocada por até 5 dias em 75 mL de água do mar artificial para enriquecimento das bactérias. Realizou-se com a amostra enriquecida o mesmo procedimento do inóculo direto.

A solução resultante da agitação dos invertebrados recebeu diluições em Água do Mar Artificial estéril de 1:10 e de 1:100. Da mesma forma, como se procedeu com as amostras de água, alíquotas de 0,1 mL e de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar marinho e TCBS. Os suábes contendo o muco superficial da anêmona, do briozóario incrustado no gastrópode e dos cirros da craca, assim como aqueles contendo o muco dos peixes, foram friccionados em placas de Petri contendo Ágar marinho.

As culturas foram incubadas a temperatura ambiente (20-25°C) por 24 horas e observadas em câmara escura diariamente, por até cinco dias, para verificação da atividade de luminescência das bactérias.

3.3.1 Carga microbiana

O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado para as amostras de água. Para isso, parte de cada amostra obtida mensalmente em cada um dos pontos de coleta foi diluída em 1:10 e 1:100. Alíquotas foram inoculadas em placas de Petri com Ágar marinho. As culturas foram incubadas à temperatura ambiente (20-25°C). A contagem do número total de colônias e do número de colônias luminescentes se deu em um período de incubação entre 24 e 120 horas.

Como o enriquecimento é uma situação que favorece a proliferação bacteriana, pois acresce nutrientes à amostra, determinou-se a carga microbiana apenas das placas que receberam o inóculo direto da amostra, situação que reflete a comunidade microbiana presente no ambiente natural.

3.3.2 Seleção e isolamento de linhagens bioluminescentes

Ao serem visualizadas na câmara escura, as colônias positivas para bioluminescência foram marcadas na parte inferior da placa de Petri com caneta permanente. Para obtenção dos isolados em cultura pura, até três colônias

bioluminescentes de cada cultivo positivo foram esgotadas em placas de Petri contendo Ágar marinho. Quando muitas colônias bioluminescentes foram avistadas nas placas, selecionaram-se aquelas três visualmente mais isoladas das outras colônias não bioluminescentes presentes na placa.

3.3.3 Coleção

Os isolados bacterianos em cultura pura foram repicados para tubos contendo Ágar marinho inclinado e mantidos à temperatura ambiente (20-25°C). Quinzenalmente, as bactérias foram repicadas para novos tubos contendo Ágar marinho.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

As colônias bioluminescentes foram caracterizadas quanto à forma, elevação, margem, diâmetro, coloração, textura e consistência. Avaliaram-se também os isolados bacterianos quanto ao desenvolvimento em meio líquido e crescimento nos meios Ágar luminescência e TCBS.

A morfologia celular das bactérias foi visualizada em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), após coloração pelo método de Gram. O método de Gram consiste em: primeiramente, preparar um esfregaço celular em lâmina de vidro, e fixá-lo com fogo; adicionar cristal de violeta por um minuto sobre as células fixadas; lavar o esfregaço com água corrente; cobrir com lugol e deixar por um minuto; fazer outra lavagem com água corrente e álcool-acetona até não haver desprendimento de corante; adicionar fucsina básica por 30 segundos; lavar o esfregaço com água corrente e secar delicadamente com papel filtro.

3.5 IDENTIFICAÇÃO

Após uma caracterização morfológica preliminar dos isolados bacterianos bioluminescentes, uma abordagem molecular foi adotada para identificação dos mesmos. O gene escolhido para este fim foi o 16S rDNA. Este gene é amplamente utilizado para fins de identificação e filogenia de bactérias, pois se encontra universalmente distribuído dentro deste grupo e apresenta regiões variáveis de espécie para espécie (DRANCOURT *et al.*, 2000).

A Figura 8 apresenta as etapas de caracterização dos isolados bioluminescentes obtidos e das análises moleculares utilizadas para fins de identificação.

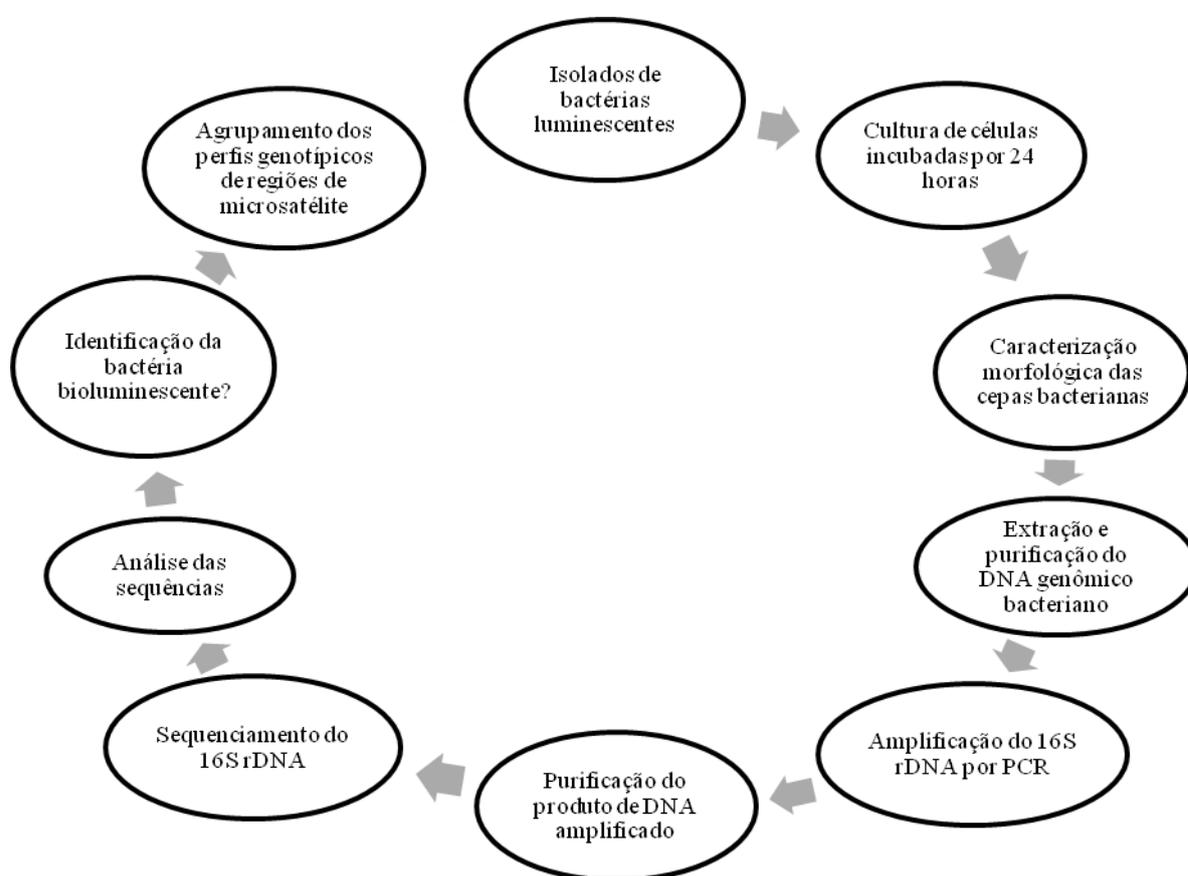


Figura 8. Fluxograma contendo as etapas de caracterização e da análise molecular dos isolados de bactérias bioluminescentes.

Fonte: Autor (2011).

3.5.1 Extração e purificação do DNA genômico

Para a extração de DNA utilizaram-se células cultivadas em placas de Petri com Ágar marinho, em um tempo de crescimento de 24 h. As células foram resgatadas do cultivo com auxílio de alça bacteriológica, ressuspendidas em 500 µL de água Milli-Q estéril e homogeneizadas em agitador tipo “vortex”. Após, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 13000 RPM e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi resuspenso em 450 µL de tampão TE (10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA) e tratado com lisozima (concentração final de 5 mg/mL), até o momento em que a mistura adquiriu maior viscosidade. Adicionou-se 100 µL de Tampão de lise (100 mM EDTA pH 8,0; 20% SDS; 50 mM Tris pH 8,0), agitou-se o tubo firmemente para homogeneização do conteúdo e incubou-se o material a 60°C por 15 minutos.

A etapa de purificação do DNA total das bactérias foi realizada com o uso de fenol-clorofórmio, seguida por duas lavagens somente com clorofórmio. O DNA foi precipitado por 1 hora a -20°C com a adição de um volume de etanol absoluto gelado. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 14500 RPM. Após a remoção do etanol absoluto, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% a temperatura ambiente e foi centrifugado por 5 minutos a 13000 RPM.

O etanol foi retirado o máximo possível da amostra, pois este reagente pode vir a interferir negativamente na reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Então, o sedimento foi incubado em estufa a 37°C até a remoção completa do etanol por evaporação e ressuspenso em 50 µL de tampão TE. A amostra foi tratada com RNase (1 µg/mL) a 37°C por 30 minutos.

O DNA extraído foi verificado por eletroforese horizontal, em gel de agarose 0,8%, corado com “Gel Red”, e visualizado sob transiluminação de luz ultravioleta (Bio-Rad UV Universal Hood II).

3.5.2 Amplificação do gene DNAr 16S das bactérias bioluminescentes por PCR

Para as reações de PCR, utilizou-se o par de oligonucleotídeos iniciadores F27 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e R1492 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991), que permitem a amplificação de um fragmento do gene 16S rDNA, com cerca de 1500 pares de bases.

A reação de PCR foi composta por: 0,1 μL da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 μL de tampão de reação para a enzima *Taq* DNA polimerase 10x (Invitrogen), 2,5 μL de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 1mM), 1,25 μL de cloreto de magnésio (50mM), 1 μL de cada primer (20 pmol/ μL), 1 μL do DNA bacteriano e água Milli-Q estéril para um volume de final de 25 μL .

Os passos de amplificação foram realizados em termociclador Techne TC 412. O programa de amplificação constituiu em um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 60 seg a 60°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 72°C durante 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1%, corado com “Gel Red”, observados em transiluminador e fotografados (Bio-Rad UV Universal Hood II).

3.5.3 Purificação e quantificação dos produtos da amplificação

Ao término da reação de PCR, os fragmentos amplificados de DNA foram purificados por precipitação com RNA transportador (tRNA), onde adicionou-se 2 μL de tRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 2,5 volumes de etanol absoluto (4°C). A incubação se deu a – 20°C, por cerca de 16 horas, e foi seguida por 30 minutos de centrifugação a 13000 RPM; o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% e centrifugado por 3 minutos. Deixou-se secar o precipitado e ressuspendeu-se em 30 μL de água Milli-Q estéril. A quantificação das amostras foi realizada em gel de agarose 1%, utilizando-se como padrão o marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

3.5.4 Sequenciamento do gene 16S rDNA

O sequenciamento de DNA foi realizado em placas de 96 poços utilizando o método cujo princípio foi descrito por SANGER *et al.* (1977). Foram utilizados dideoxinucleotídeos fluorescentes, separação em eletroforese capilar e detecção do fluoróforo após excitação com laser em seqüenciador automático MegaBACE 1000

(Amersham Life Science/Molecular Dynamics).

Para reação de sequenciamento foi utilizado um volume final de 10 μL , constituído por: 5 pmol/ μL de cada primer (F27 ou R1492), 3 μL da amostra de DNA e água Milli-Q estéril até completar o volume final de 5 μL . Foram adicionados 120 μL de água Milli-Q estéril a 410 μL de mix do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing (MegaBACE), para as reações de PCR.

Alíquotas de 5 μL do mix diluído foram pipetadas em cada poço da placa, na ausência de luz, para evitar que os componentes do mesmo se degradassem. As reações de PCR foram conduzidas utilizando-se o seguinte programa: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos, e 60°C por 1 minuto e 30 segundos.

3.5.5 Análise das sequências de DNA

As sequências foram obtidas e corrigidas através do programa STADEN PACKAGE (STADEN; BEAL; BONFIELD, 2000). As mesmas foram analisadas no programa BLAST Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (ALTSCHUN *et al.*, 1997), disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

3.5.6 Determinação de polimorfismo de regiões de microsatélite

A utilização da análise de polimorfismos de regiões de microsatélite (Microsatellite-primed-MSP-PCR) baseia-se na amplificação de regiões repetitivas que se organizam em tandem no DNA, empregando oligonucleotídeos específicos para esta finalidade. Após a reação de PCR, os amplicons são separados em gel de agarose, permitindo a análise dos resultados. Através desta pode-se diferenciar linhagens e até mesmo espécies, dependendo do tipo de iniciadores utilizados e das bandas analisadas (LANDELL, 2009).

Utilizou-se o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅ (5' GTGGTGGTGGTGGTG 3'). Para a reação de amplificação foi utilizado um volume final de 25 μL , contendo 1 μL

de DNA, 0,5 μL de *Taq* polimerase (Centro de Biotecnologia da UFRGS), 1 μL de (GTG)₅ (20 pmol/ μL), 2,5 μL de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 1mM), 1,25 μL de cloreto de magnésio (50mM) e 1,5 μL de acetato de magnésio (50mM). O programa de amplificação constituiu em um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 20 segundos, com uma extensão final de 72°C por 6 minutos. O padrão de bandas obtido foi examinado após eletroforese do DNA a 70V por 5 horas, em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio, e visualizado em transiluminador (Bio-Rad UV Universal Hood II). O padrão utilizado foi o marcador 1 kb Plus (Invitrogen).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bactérias bioluminescentes foram encontradas nas amostras de água do estuário e do mar, de invertebrados marinhos e de peixes. A carga microbiana das amostras de água (UFC totais/mL e UFC bioluminescentes/mL) foi comparada com as características físico-químicas das mesmas. Os resultados observados nas amostras de água foram comparados com aqueles das amostras de animais. Os poucos trabalhos que têm se dedicado à caracterização, isolamento e identificação de bactérias bioluminescentes em amostras de ambientes naturais foram utilizados para discutir os resultados apresentados.

4.1 AMOSTRAS DE ÁGUA

Das 33 amostras de água coletadas, 27 (81%) apresentaram bactérias bioluminescentes. As amostras de água foram semeadas em 224 placas (metade contendo o meio Ágar Marinho e a outra metade contendo o meio TCBS). Desse total, 40,62% (n= 91) das placas apresentaram colônias bioluminescentes (51 placas com o meio agar marinho e 40 com o meio TCBS). Três amostras de água só evidenciaram a presença de bactérias bioluminescentes após passarem pelo processo de enriquecimento.

4.1.1 Temperatura

Na Figura 9 observa-se a variação da temperatura da água em cada ponto de coleta durante o período de estudo.

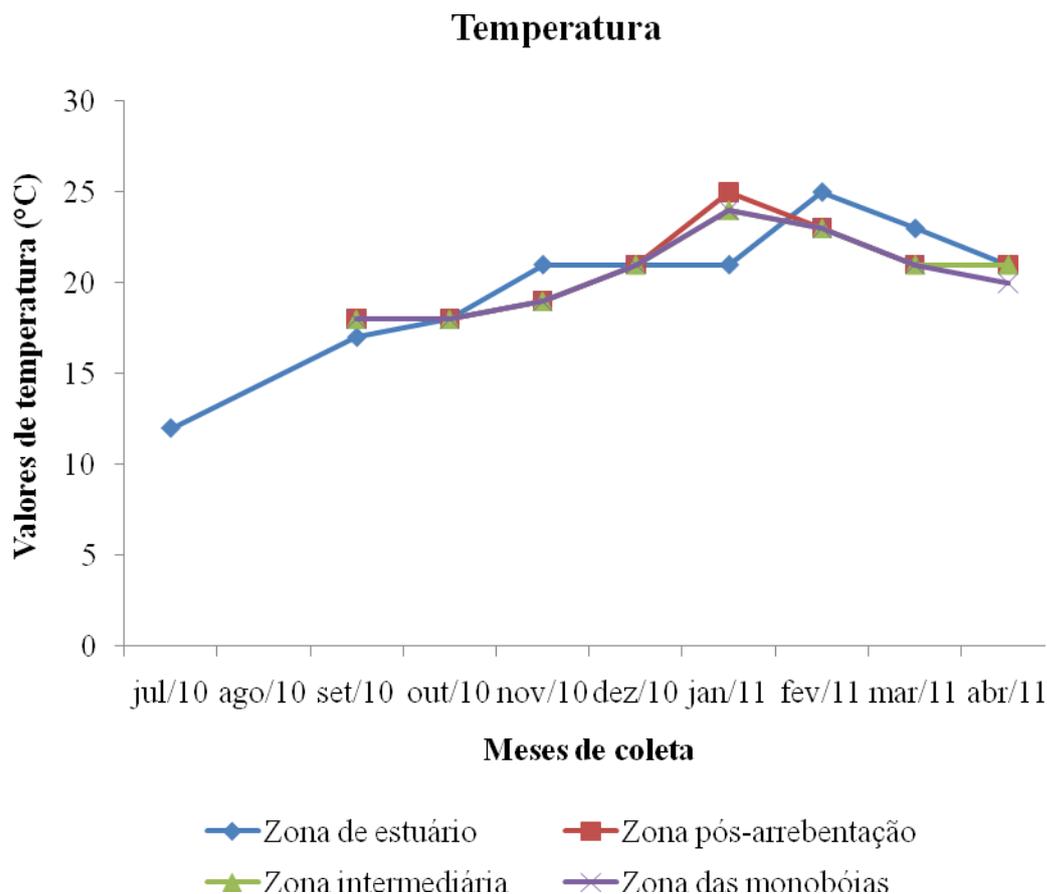


Figura 9. Gráfico da variação da temperatura das amostras de água (°C) dos diferentes pontos e meses de coleta.

Fonte: Autor (2011).

A temperatura das amostras de água variou entre 12°C, no mês de julho, e 25°C, nos meses de janeiro e fevereiro. A região de estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí sofre uma maior influência da corrente do Brasil nos meses de verão e a entrada de águas subantárticas na plataforma continental brasileira nos meses de inverno (transportada por um braço da corrente das Malvinas), o influencia diretamente este parâmetro, e pode levar a variações na estrutura da comunidade microbiana local ao longo do ano.

Na maioria dos meses a coleta no estuário não ocorreu no mesmo dia da coleta no mar, o que implicou em certas variações na temperatura das amostras. No mês de setembro, a temperatura da água no estuário foi de 17°C, enquanto nos demais pontos foi de 18°C. Todas as amostras apresentaram a mesma temperatura nos meses de outubro (18°C) e de dezembro (21°C). No mês de novembro a temperatura da água no estuário foi maior (21°C) do que a temperatura nos outros pontos (19°C). No mês de

janeiro a temperatura do estuário foi de 21°C, da zona de pós-arrebentação foi de 25°C e nos outros dois pontos mais distantes da costa foi de 23°C. No mês de fevereiro a temperatura no estuário foi de 25°C, enquanto nos demais pontos foi de 23°C. No mês de março a temperatura no estuário foi de 23°C, enquanto no restante dos pontos foi de 21°C. No mês de abril o ponto mais distante da costa apresentou 20°C, enquanto os pontos mais próximos apresentaram 21°C.

4.1.2 Salinidade

Na Figura 10 pode-se visualizar a variação da salinidade das amostras de água obtidas em cada ponto de coleta nos diferentes meses do estudo.

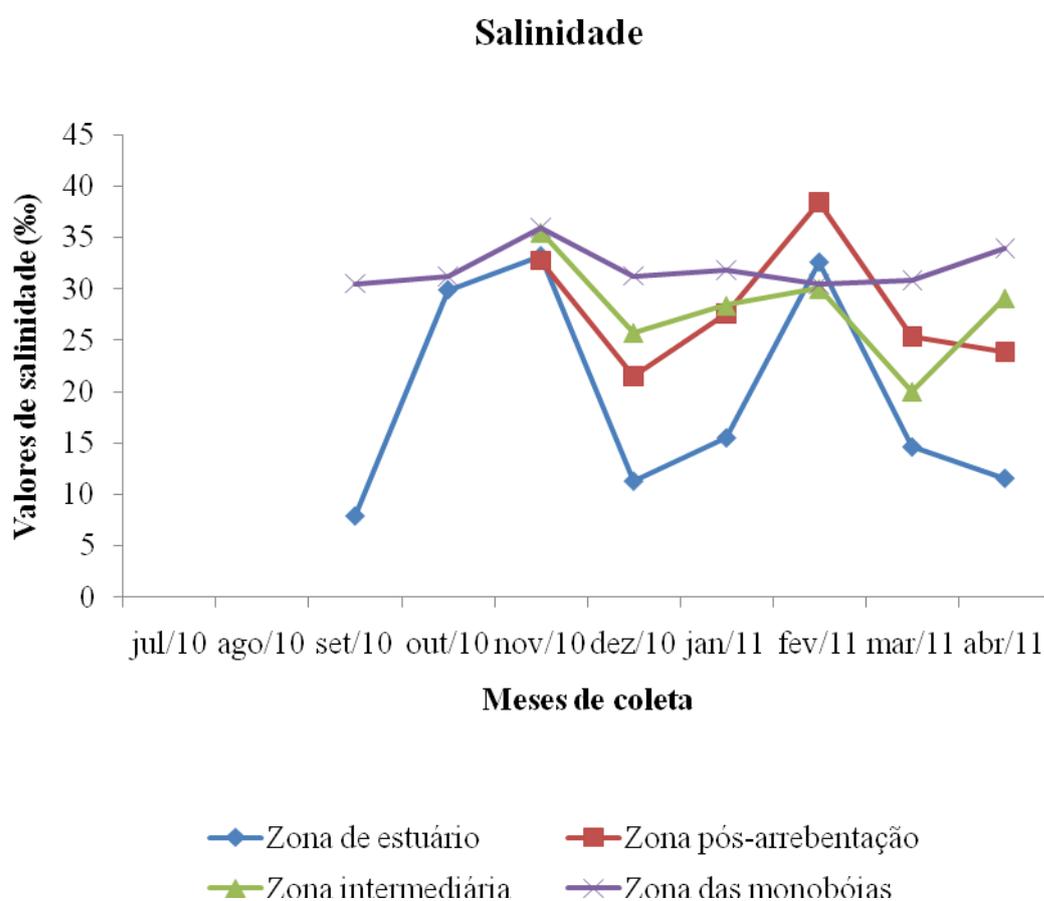


Figura 10. Gráfico da variação da salinidade das amostras de água (em ‰) dos diferentes pontos e meses amostrados.

Fonte: Autor (2011).

As amostras de água apresentaram valores de salinidade entre 7,9 ‰ (em setembro, na zona de estuário) e 38,44 ‰ (em fevereiro, na zona de pós-arrebentação). Um gradiente de aumento na salinidade era esperado no sentido estuário-monobóias, já que este último ponto situa-se a aproximadamente duas milhas da costa e, por isso, sofre menos influência das massas de água doce que fluem para o mar através do estuário.

No mês de julho o parâmetro não foi aferido. Nos meses de setembro e outubro, somente a salinidade das amostras de água das zonas de estuário e das monobóias foi aferido. Deste modo, o gradiente de salinidade pôde ser evidenciado nos meses dezembro, janeiro e abril.

Já no mês de novembro, a amostra de água obtida no estuário apresentou salinidade (33,17 ‰) maior do que aquela obtida na zona de pós-arrebentação (32,75 ‰). Nos meses de fevereiro e março, as amostras de água obtidas na zona de pós-arrebentação apresentaram uma salinidade maior do que a do ponto seguinte mais distante do estuário (intermediário).

Na zona de pós-arrebentação, a ação das ondas ocasiona uma ressuspensão dos sais presentes na água, o que pode influenciar a salinidade das amostras nela obtidas dependendo da influência da descarga de água doce, circulação das correntes ou dos ventos atuantes no local, por exemplo (MIRANDA, 1984 *apud* LIMA, 2004). Como os pontos de coleta não foram fixos, mas sim baseados na configuração do mar no dia da coleta, estes fatores podem ter influenciado o aumento da salinidade das amostras nestes meses. No mês de fevereiro a salinidade das amostras de água das zonas de estuário (32,55 ‰) e de pós-arrebentação (38,44 ‰) foi maior, inclusive, do que a da amostra da zona das monobóias (30,49 ‰). No mês de março, apesar do valor da salinidade da amostra de água da zona de pós-arrebentação (25,34 ‰) ter sido maior do que da zona intermediária (20,04 ‰), não ultrapassou o valor da amostra da zona das monobóias (30,83 ‰).

4.1.3 Oxigênio dissolvido

O oxigênio dissolvido nas amostras de água variou entre 5 mg/L (em

novembro, na zona de pós-arrebentação) e 13,6 mg/L (em fevereiro e março, na zona de estuário). Nas coletas dos meses de julho e de setembro de 2010 o parâmetro oxigênio dissolvido não foi aferido. No mês de outubro, somente se determinou o oxigênio dissolvido nas amostras das zonas de estuário (9,4 mg/L) e das monobóias (7,6 mg/L).

A Figura 11 apresenta a variação no teor de oxigênio dissolvido das amostras de água de cada ponto de coleta nos diferentes meses do estudo.

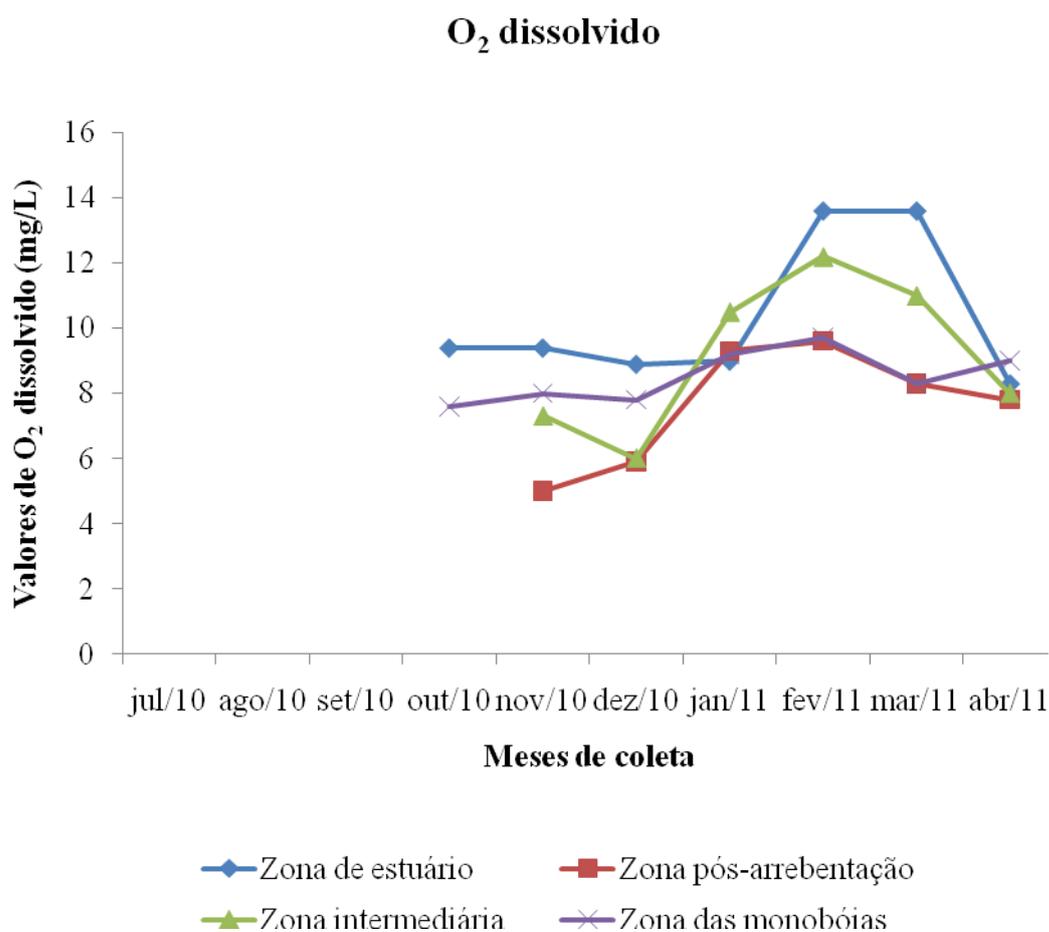


Figura 11. Gráfico da variação do oxigênio dissolvido presente nas amostras de água (em mg/L) dos diferentes pontos e meses amostrados.
Fonte: Autor (2011).

À exceção dos meses de janeiro e abril, verificou-se maiores valores de oxigênio dissolvido nas amostras de água provenientes do estuário. As amostras de água da zona das monobóias, até o mês de dezembro, estiveram colocadas em segundo lugar quanto ao teor de oxigênio. Já entre os meses de janeiro e março, as amostras com

segundo teor mais alto de oxigênio dissolvido foram as amostras de água provenientes da zona intermediária. Nestes mesmos meses, as amostras de água das zonas de pós-arrebentação e das monobóias apresentaram teores de oxigênio dissolvido similares.

A matéria orgânica consome em grande parte o oxigênio dissolvido na coluna d'água, e, por representar uma fonte de alimento, favorece o crescimento de microrganismos. Águas ricas em matéria orgânica que desaguam de lagoas costeiras para o mar através do estuário apresentam menores teores de oxigênio dissolvido e uma maior carga de microrganismos. Eventos meteorológicos, como tempestades, por exemplo, podem vir a interferir no revolvimento do sedimento de fundo e no conseqüente incremento de matéria orgânica na coluna d'água.

De acordo com Lima (2004), em virtude deste estuário situar-se em uma região sub-tropical, a sua baixa profundidade e as condições meteorológicas regionais propiciam uma maior ressuspensão dos sedimentos disponibilizando a matéria orgânica para a coluna d'água, onde esta seria rapidamente consumida. Por tratar-se de um ambiente geologicamente recente (não ter tido tempo geológico o suficiente para acumular grandes quantidades de matéria orgânica) e por apresentar granulometria grossa (areia), os sedimentos do Estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí tendem a ser fracamente oxidantes.

Os fatos supracitados, somados ao alto hidrodinamismo do ambiente, justificam os maiores valores de oxigênio dissolvido encontrados nas amostras de água do estuário. Os menores teores de oxigênio dissolvido foram aferidos nas amostras de água da zona de pós-arrebentação, que, por ainda sofrer influência da ação das ondas, recebe matéria orgânica de origem sedimentar. Ortega (2010) também verificou nas águas do estuário maior teor de oxigênio dissolvido do que na água do mar.

4.1.4 Potencial hidrogeniônico

O pH das amostras de água variou entre 7,63 (em abril, na zona de estuário) e 8,38 (em novembro, na zona de estuário, e em janeiro, na zona das monobóias). De acordo com Filho (2007), o pH da água do mar comumente varia entre 7,4 e 8,5; estando os valores aqui registrados dentro deste padrão.

A Figura 12 mostra a variação do potencial hidrogeniônico (pH) das amostras de água dos diferentes pontos e meses de coleta.

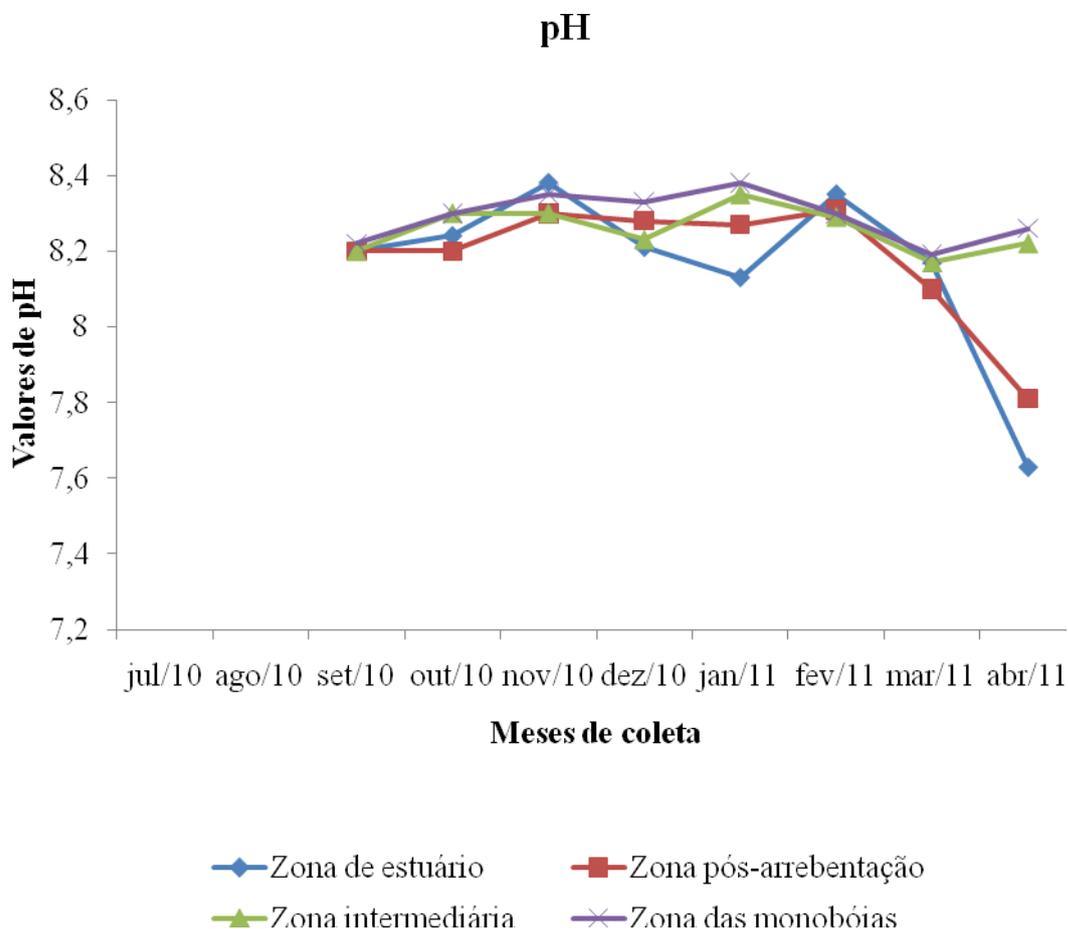


Figura 12. Gráfico da variação do pH das amostras de água dos diferentes pontos e meses amostrados.

Esteves (1988) afirmou que o pH é um dos parâmetros mais importantes de se avaliar em um ambiente aquático, porém, ao mesmo tempo é um dos mais difíceis de se interpretar pois são muitos os fatores que podem influenciá-lo. O pH da água do mar tende a ser mais alcalino, pois há uma maior predominância dos íons carbonatos e bicarbonatos no meio, em detrimento dos íons ácidos. Organismos heterotróficos como bactérias e animais aquáticos intervêm no pH do meio, via de regra, abaixando-o: intensos processos de decomposição e respiração acarretam na liberação de CO_2 e, conseqüentemente, na formação de ácido carbônico e de íons hidrogênio.

Observou-se um menor pH nas amostras de água do estuário, com relação às amostras dos outros pontos, em outubro e dezembro de 2010 e em janeiro e abril de

2011. Valores mais baixos de pH frequentemente correspondem a ambientes com maior teor de matéria orgânica e com baixa influência da cunha salina (zona de estuário), enquanto nos ambientes mais salinizados, nas zonas de maior energia e menor profundidade, ocorre o inverso (demais zonas amostradas) (LIMA, 2004).

4.1.5 Carga microbiana

A carga microbiana total das amostras de água variou entre 10 UFC/mL (em julho, na zona de estuário) até cerca de 3×10^5 UFC/mL (em janeiro, também na zona de estuário). À exceção das amostras de água do estuário, e da amostra de água da zona de pós-arrebentação em outubro, foi difícil determinar a quantidade de UFC/mL das amostras entre os meses de setembro a novembro, pois as colônias não estavam devidamente isoladas, e observaram-se grumos de células indistinguíveis. Ou seja, nestes meses houve crescimento celular das bactérias, mas em virtude do mau espalhamento das alíquotas de água sobre o meio de cultura, estas colônias de células não puderam ser precisamente contadas.

Na Figura 13 pode-se visualizar a variação da carga microbiana total presente nas amostras, nos diferentes pontos e meses de coleta.

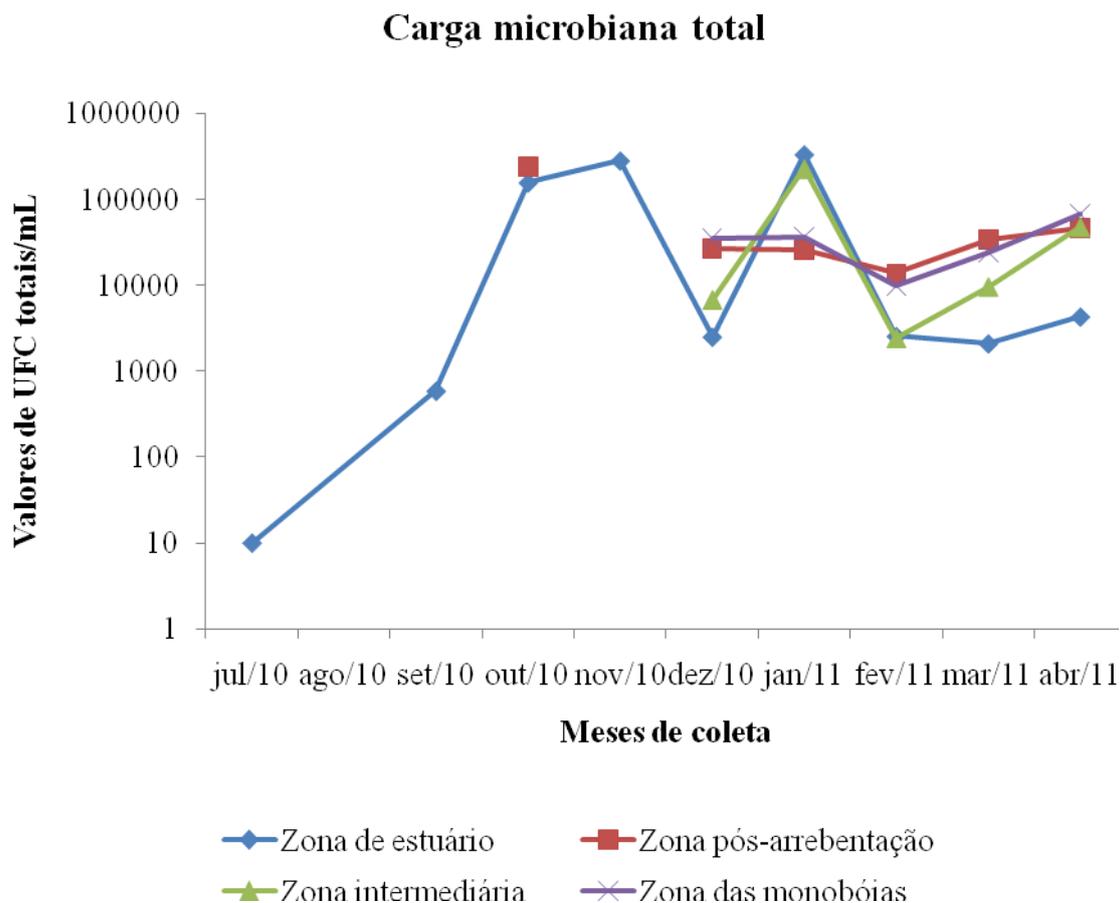


Figura 13. Gráfico da variação da carga microbiana total das amostras de água (em UFC totais/mL) dos diferentes pontos e meses amostrados.

A maior carga microbiana total foi verificada nos meses de dezembro e abril nas amostras da zona das monobóias; no mês de janeiro na amostra da zona de estuário (valor que representou a maior carga microbiana total dentre todas as amostras); e nos meses de fevereiro e março nas amostras da zona de pós-arrebentação. A amostra contendo a mais alta carga microbiana total, em janeiro, apresentava temperatura de 21°C, salinidade de 15,48 ‰, pH de 8,13 e 9 mg/L de oxigênio dissolvido. O pH e o oxigênio dissolvido da amostra estuarina foram os menores dentre as demais amostras obtidas em janeiro, indicando maior aporte de matéria orgânica disponível aos microrganismos no local, o que possivelmente impulsionou o aumento da atividade metabólica dos mesmos.

Sabe-se que as praias de Tramandaí e Imbé, adjacentes à zona de estuário em questão, podem ter suas populações aumentadas em até 5 e 9 vezes, respectivamente, durante os meses de veraneio (CPRM, 1995). O aumento da carga de matéria orgânica nos efluentes que entram direta ou indiretamente em contato com o estuário e as altas

temperaturas da água são os principais fatores responsáveis pelo aumento no número de microrganismos no local neste período.

Reduções na carga microbiana total foram observadas na zona de estuário em setembro, dezembro, março e abril; na zona de pós-arrebentação em janeiro; e na zona intermediária em fevereiro. As baixas percebidas na zona de estuário coincidiram com os menores valores de salinidade registrados para o local. Os menores valores de pH, também acompanhados dos menores valores de salinidade, concordaram com as baixas em UFC totais/mL apuradas nas amostras das zonas de estuário (dezembro e abril) e intermediária (fevereiro). Embora a baixa salinidade tenha se destacado em situações de menores cargas microbianas, um estudo mais amplo deveria ser aplicado para entender a existência de um padrão no local, pois a maior carga microbiana total (verificada em janeiro) também se deu a um valor de salinidade relativamente baixo (15,48 ‰) quando comparado à salinidade das amostras estuarinas obtidas em outros meses (29,86 ‰ em outubro, 33,17 ‰ em novembro e 32,55 ‰ em dezembro). Na zona de pós-arrebentação, em janeiro, não foi observada uma clara relação entre a redução na carga microbiana total e as características físico-químicas da amostra de água.

A carga de bactérias bioluminescentes das amostras de água variou entre ND (não detectada pelo método utilizado), de julho a novembro, e 690 UFC luminescentes/mL, em fevereiro. A carga microbiana bioluminescente não apresentou o mesmo padrão de variação da carga microbiana total, ou seja, nas amostras analisadas não houve uma relação direta entre o crescimento microbiano total e o crescimento de bactérias bioluminescentes.

Na Figura 14 pode-se observar a variação da carga microbiana bioluminescente presente nas amostras de água obtidas nos diferentes pontos e meses de coleta.

Carga microbiana bioluminescente

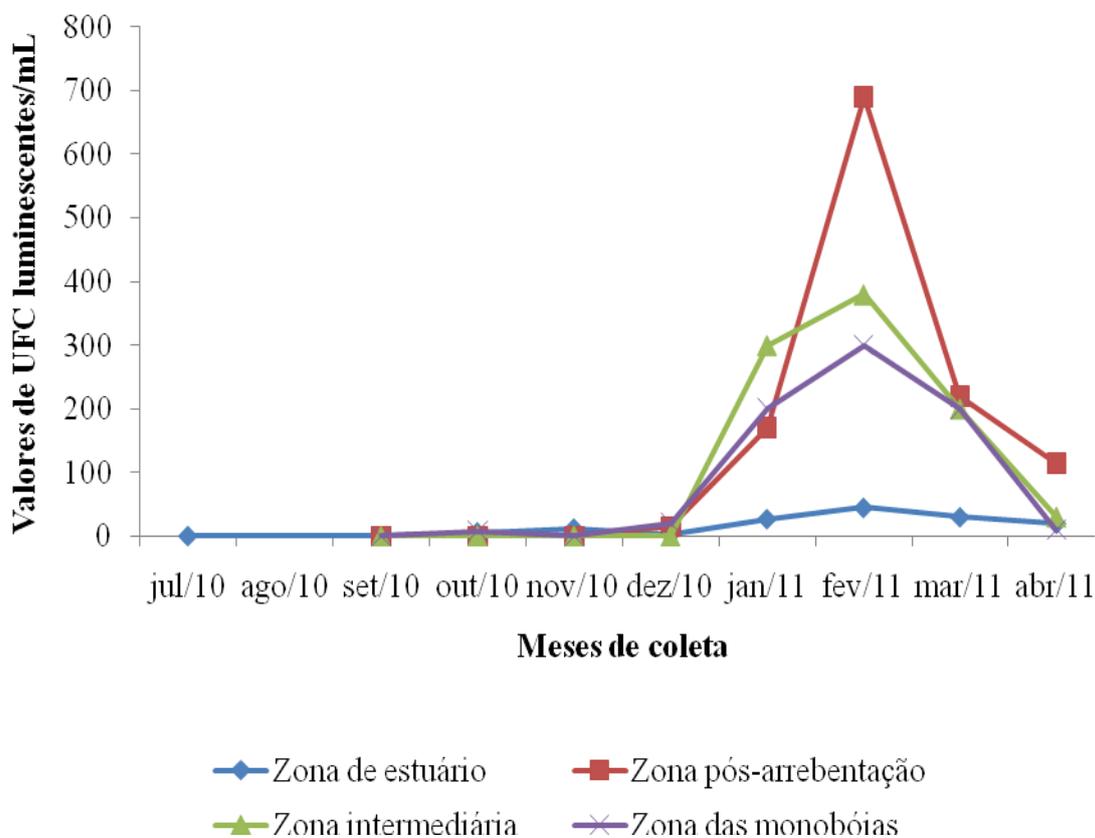


Figura 14. Gráfico da variação da carga microbiana bioluminescente das amostras de água (em UFC luminescentes/mL) nos diferentes pontos e meses amostrados.

O parâmetro que pode ter influenciado a presença de bactérias bioluminescentes nas amostras foi a temperatura, já que nenhuma colônia bioluminescente foi verificada a temperaturas inferiores a 18°C. Verificou-se que a carga microbiana bioluminescente das amostras passou a ser expressiva a partir do mês de dezembro, quando a temperatura da água atingiu 21°C, teve o seu pico máximo para todos os pontos amostrados em fevereiro, quando esta alcançou 25°C na zona estuarina e 23°C nas demais zonas, e apresentou um decréscimo em abril, quando a temperatura da água novamente retornou aos 20°C na zona das monobóias e aos 21°C nas demais zonas.

No mês de fevereiro, sob os maiores valores de temperatura da água, as máximas cargas microbianas luminescentes foram observadas: na zona de pós-arrebentação (690 UFC luminescentes/mL) em primeiro lugar, seguida pela zona

intermediária (380 UFC luminescentes/mL), pela zona das monobóias (200 UFC luminescentes/mL) e, em último lugar, pela zona de estuário (45 UFC luminescentes/mL). O'Brien e Sizemore (1979), ao estudar as águas do estuário de East Lagoon, no Texas, verificaram uma maior carga de bactérias bioluminescentes quanto maior foi a temperatura das amostras de água. Este fato também foi observado nos trabalhos de Chiu e colaboradores (2007) em Taiwan, de Orndorff e Colwell (1980) no mar de Sargasso, e de Ramaiah e Chandramohan (1992) no mar da Arábia.

O fato de locais de coleta tão próximos como as zonas de estuário e de pós-arrebentação terem apresentado valores de UFC luminescentes/mL tão distintos pode estar relacionado com a salinidade das amostras de água destes locais. Neste mês, a salinidade da amostra de água da zona de pós-arrebentação (38,44 ‰) foi superior a de todas as outras amostras, enquanto a salinidade da zona estuarina (32,55 ‰) foi um pouco menor.

O pH das amostras no ambiente natural não demonstrou um comportamento padrão relacionado à carga microbiana bioluminescente presente nas mesmas. Os valores de pH apresentaram-se na faixa dos valores comuns a ambientes marinhos (entre 7,63 e 8,38). A maior carga microbiana bioluminescente foi observada sob o pH de 8,31, sendo que em amostras com valores similares de pH também foram observadas reduzidas cargas microbianas bioluminescentes. Talvez um estudo mais amplo, analisando mais pontos de coleta, em um maior período de tempo, pudesse elucidar alguma relação entre este parâmetro e a ocorrência de bactérias bioluminescentes nestes ambientes.

Com relação ao oxigênio dissolvido, observou-se uma maior carga microbiana bioluminescente nos meses de janeiro, fevereiro e março, nos quais as amostras de água apresentaram valores mais altos para este parâmetro do que em outros meses (entre 8,3 mg/L e 13,6 mg/L). É sabida a necessidade de suprimento de oxigênio para o funcionamento do sistema de bioluminescência das bactérias, mas não foi encontrado trabalho algum que abordasse a influência da variação deste parâmetro na ocorrência destas bactérias em ambientes naturais.

As amostras de água coletadas entre os meses de julho e novembro, sob as menores temperaturas da água, não apresentaram colônias bioluminescentes quando cultivadas antes do processo de enriquecimento. Mas, quando inoculadas após o enriquecimento, as amostras de água coletadas na zona de pós-arrebentação (em

setembro) e nas zonas estuarina e das monobóias (em setembro e outubro) evidenciaram o crescimento de bactérias bioluminescentes. As bactérias bioluminescentes já estavam nas amostras, mas no meio inicial não possuíam condições fisiológicas adequadas e/ou crescimento suficiente para expressarem bioluminescência. Além de suprir a amostra natural com sais e nutrientes, o enriquecimento, que se estendeu por até 5 dias, permitiu também uma aclimatação da amostra a temperatura ambiente. Neste caso, este favorecimento ao crescimento de bactérias bioluminescentes foi atribuído à aclimatação das amostras, proporcionada pelo enriquecimento das mesmas.

Eley (1972) pesquisou as condições ambientais e nutricionais ideais à expressão da bioluminescência em *Photobacterium phosphoreum*. Verificou que a concentração de NaCl de 30g/l de meio de cultura, o uso do glicerol como fonte de carbono, incubação a 15°C e valores de pH entre 6 e 6,5 foram condições que possibilitaram uma bioluminescência de *P. phosphoreum* mais intensa.

Waters e Lloyd (1985) avaliaram, em laboratório, a dependência das condições de pH, sais e nutrientes no crescimento e na expressão da bioluminescência em *Photobacterium leiognathi*, *P. phosphoreum* e *Aliivibrio fischeri*. A bioluminescência foi observada em todas as temperaturas que suportaram o crescimento das bactérias (10°C, 15°C, 20°C e 25°C), mas sob 10°C a luminescência de *P. leiognathi* já era quase imperceptível após 72h de incubação. As duas espécies de bactérias caracterizadas como simbioses de animais, *P. leiognathi* e *Aliivibrio fischeri*, expressaram luminescência mesmo nos menores teores de NaCl. O estudo verificou que quanto mais alta a temperatura de crescimento, as bactérias requeriam maiores concentrações de sal no meio para brilharem. Valores baixos de pH (<7) e altas concentrações de NaCl favoreceram a expressão da bioluminescência. Após 48 horas de incubação verificou-se uma diminuição na bioluminescência das bactérias, acompanhadas da elevação do pH e da redução de NaCl no meio.

Estudos como o de Eley e de Waters e Lloyd (*op cit.*) mostram como as condições utilizadas para o crescimento e expressão da bioluminescência bacteriana em laboratório diferem das condições de ocorrência natural destas bactérias no ambiente. O pH não foi um parâmetro monitorado em laboratório neste trabalho, mas ele também pode ter influenciado no processo de enriquecimento, já que houve um aumento da expressão da bioluminescência após as amostras terem recebido este tratamento.

4.2 AMOSTRAS DE INVERTEBRADOS

Apesar de terem sido feitas três amostragens com invertebrados marinhos, foram observadas colônias bioluminescentes somente nas amostras do mês de fevereiro. Estas bactérias foram isoladas do muco superficial dos indivíduos, coletado com o auxílio de suábes.

Os cultivos oriundos das amostras que receberam agitação, embora tenham apresentado um elevado crescimento de microrganismos após a incubação, não revelaram a presença de colônias bioluminescentes. As bactérias não bioluminescentes associadas aos invertebrados analisados apresentaram um crescimento tão expressivo, que pode ter vindo a inibir o *quorum sensing* das bactérias bioluminescentes presentes na amostra, mecanismo decisivo para a expressão desta característica.

Stabili e colaboradores (2008) utilizaram um tempo de 90 segundos para agitar amostras de hidrozoários e briozoários, e deste modo obtiveram sucesso no isolamento de víbrios bioluminescentes a partir destes animais. Somado a este método, neste trabalho os pesquisadores também utilizaram microscopia eletrônica sob iluminação ultravioleta para observar os biofilmes de bactérias bioluminescentes presentes na superfície quitinosa destes animais.

A constatação destas bactérias nos invertebrados ocorreu no mesmo mês em que as maiores cargas de bactérias bioluminescentes foram verificadas nas amostras de água (fevereiro). A técnica do suábe aplicada aos invertebrados coletados neste mês (anêmona, craca e briozoário) permitiu a observação de bactérias bioluminescentes oriundas da superfície destes animais. Apesar de não termos avaliado a origem das bactérias isoladas dos invertebrados, há a possibilidade delas estarem na superfície dos animais na forma de biofilme, conforme já relatado na literatura.

4.3 AMOSTRAS DE PEIXES

O muco superficial de 14 espécimes de peixes foi analisado. Suábés estéreis foram friccionados nos animais e posteriormente estriados em Ágar Marinho a fim de se obter um cultivo para cada indivíduo. Colônias bioluminescentes foram visualizadas em todos os cultivos, ou seja, em todos os peixes analisados.

Mesmo no mês de outubro, quando as amostras de água demonstraram uma reduzida carga microbiana bioluminescente, bactérias com esta característica fenotípica foram avistadas facilmente nos 11 peixes avaliados. Isso mostra que em alguns meses, mesmo não sendo facilmente detectadas na coluna d'água, as bactérias bioluminescentes estão presentes no meio, mas agregadas em superfícies, como a pele dos peixes, por exemplo. Os três peixes amostrados no mês de abril também apresentaram colônias bioluminescentes.

A maioria dos trabalhos aborda a presença de bactérias bioluminescentes em órgãos de luminescência de peixes ou em peixes de profundidade (HAYGOOD; TEBO; NEALSON, 1984; HAYGOOD, 1990; HAYGOOD; DISTEL; HERRING, 1992; HAYGOOD, 1993; HAYGOOD; DISTEL, 1993). Ao contrário, no presente trabalho estas bactérias foram observadas associadas à superfície do corpo de animais extremamente costeiros, que ocorrem a reduzidas profundidades. Meighen (1991) apontou *Vibrio harveyi* como uma espécie de bactéria bioluminescente comumente isolada de peixes costeiros.

4.4 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BIOLUMINESCENTES

Como já foi descrito, a cada cultivo positivo para bioluminescência foram selecionadas até três colônias para serem isoladas, visando-se à obtenção de bactérias bioluminescentes em cultura pura.

Para as amostras de água, muitas vezes as colônias selecionadas no interior da câmara escura não correspondiam à exata colônia bioluminescente que era visualizada, e, portanto, a real colônia bioluminescente deixava de ser purificada. Já nas amostras de animais, o mais comum foi a visualização de colônias bioluminescentes misturadas com colônias de outras bactérias, fato que dificultou o isolamento das bactérias bioluminescentes a partir de amostras de invertebrados e de peixes.

Após diferentes ciclos de purificação, obteve-se um total de 44 isolados bioluminescentes. Até o presente momento, apenas 15 destes isolados, obtidos a partir das amostras de água, ainda expressam bioluminescência. O que ocorreu principalmente em virtude de eventuais episódios de contaminação dos cultivos por outros microrganismos não bioluminescentes e também por perda da viabilidade das células bacterianas.

A perda da capacidade de expressar tal característica pode ter ocorrido devido ao aparecimento de variantes mutantes não luminescentes à medida que estes isolados foram novamente cultivados, fato já abordado em trabalhos como os de Ortega (2010), O'Grady e Wimpee (2008) e Czyz, Wróbel e Wegrzyn (2000). Para evitar o surgimento destes mutantes, recomenda-se que o esgotamento em placas e a realização do repique sejam feitos a partir de uma única unidade formadora de colônia que esteja expressando a bioluminescência. A manutenção dos isolados deve ser periódica, com observação constante da cultura a fim de perceber alterações na intensidade e distribuição da luminescência (Ortega, 2010).

Os 15 isolados obtidos foram codificados como: BL 11a, BL 11b, BL 12, BL 13, BL 15, BL 16, BL 17, BL 19, BL 20a, BL 20b, BL 21, BL 26, BL 31, BL 34 e BL 35. O Quadro 2 apresenta o mês de coleta e a amostra da qual cada isolado foi obtido.

Código do isolado bioluminescente	Zona na qual o isolado foi obtido	Mês
BL 11a e BL 11b	Zona de estuário	Jan/2011
BL 12	Zona de pós-arrebentação	Jan/2011
BL 13	Zona das monobóias	Jan/2011
BL 15	Zona de pós-arrebentação	Fev/2011
BL 16	Zona intermediária	Fev/2011
BL 17	Zona intermediária	Fev/2011
BL 19	Zona das monobóias	Fev/2011
BL 20a e BL 20b	Zona de estuário	Fev/2011
BL 21	Zona de estuário	Fev/2011
BL 26	Zona de pós-arrebentação	Abr/2011
BL 31	Zona de estuário	Abr/2011
BL 32	Zona de estuário	Abr/2011
BL 34	Zona de estuário	Abr/2011

Quadro 2. Códigos dos isolados bioluminescentes, zona da amostra da qual o isolado foi obtido e o respectivo mês de coleta da amostra.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS BIOLUMINESCENTES

As colônias luminescentes apresentaram morfologia semelhante: forma puntiforme ou circular, elevação convexa, margem inteira, diâmetro de menos de 1 mm até 100 mm, coloração branco perolada ou creme restrita à colônia, textura lisa e lustrosa (translúcida) e consistência mucóide. O método de coloração Gram permitiu a visualização de bacilos Gram negativos, com tamanho avantajado e formato curvado (Figura 15, A e B).

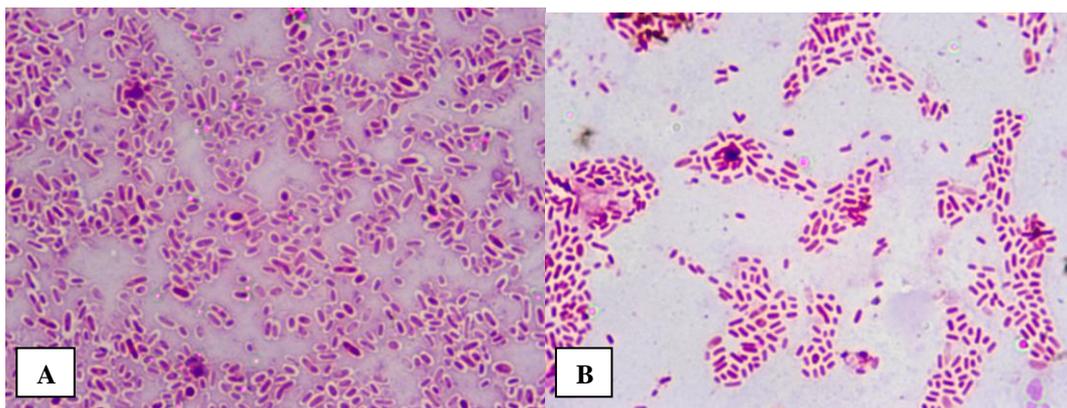


Figura 15. Células dos isolados BL 11b (A) e BL 12 (B) visualizadas ao microscópio óptico (aproximação de 1000 vezes à objetiva de 10 vezes) após coloração de Gram.
Fonte: Autor (2011).

Assim como os isolados da figura 15, todos os demais obtidos são bacilos curvados Gram negativos.

O Quadro 3 demonstra a variação da expressão na bioluminescência de alguns dos isolados obtidos nos meios Ágar Marinho e TCBS, por um período de incubação entre 24 e 144 horas.

Isolados	Ágar marinho						TCBS					
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
BL 11a	+++	+++	++	++	+	-	+++	++	+	-	-	-
BL 11b	+++	+++	++	+	-	-	+++	++	+	+	-	-
BL 12	+++	+++	++	+	-	-	+++	+++	++	+	-	-
BL 13	+++	+++	++	+	-	-	+++	++	++	+	-	-
BL 15	+++	+++	++	+	-	-	+++	++	++	++	+	+
BL 16	+++	+++	++	+	+	-	+++	++	++	++	+	+
BL 17	+++	+++	++	+	+	-	+++	++	++	+	-	-
BL 19	+++	+++	++	+	+	-	+++	++	+	-	-	-
BL 20a	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	+	-	-	-
BL 20b	+++	+++	++	++	+	-	+++	+++	++	+	-	-
BL 21	+++	+++	++	++	++	+	+++	++	++	++	+	-

Quadro 3. Intensidade da luminescência dos isolados quando cultivados em Ágar Marinho e TCBS, ao longo do tempo (em horas). Legenda: - (luminescência ausente), + (baixa intensidade); ++ (intensidade moderada); +++ (alta intensidade).

Todos os isolados se desenvolveram em meio líquido, em Ágar luminescência e em TCBS. O crescimento em meio TCBS indica que todos os isolados bioluminescentes pertencem ao gênero *Vibrio*, já que o meio é seletivo para espécies deste gênero.

De um modo geral, uma maior intensidade de luminescência foi demonstrada pelos isolados no período entre 24 e 96 horas. No meio TCBS os isolados BL 11a, BL 19 e BL 20a deixaram de expressar bioluminescência após 96 horas de incubação.

A intensidade da luminescência das bactérias se manteve maior por um período mais longo quando os isolados foram cultivados em meio Ágar Marinho. Neste meio, os isolados BL 20a e BL 21 expressaram luminescência mesmo após um período de incubação de 144 horas. Já no meio TCBS, os isolados que permaneceram luminescentes por este mesmo período de tempo foram a BL 15 e a BL 16. Estes isolados seriam ideais fontes doadoras de genes da bioluminescência, pois demonstraram a capacidade de expressar esta característica por um maior período de tempo.

Nas Figuras 16 e 17 são exibidas placas de Petri com os isolados BL 26 e BL

34, respectivamente, expressando bioluminescência (após incubação a 27°C, por cerca de 24h).

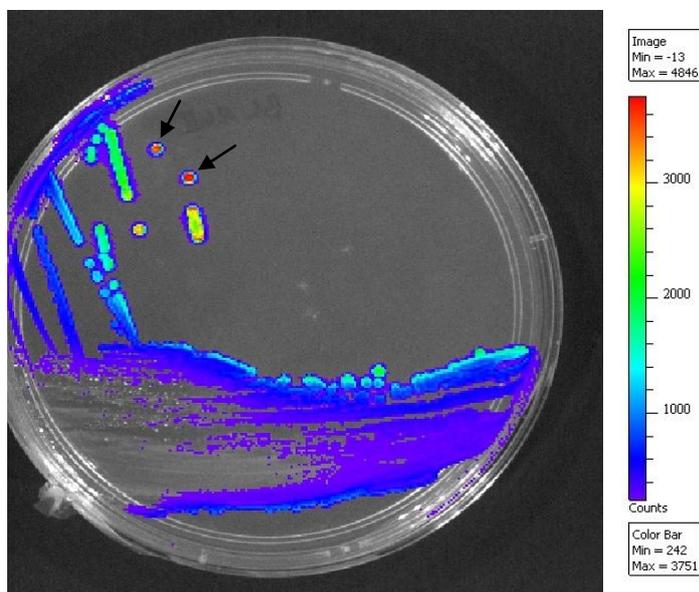


Figura 16. Fotografia das placas de Petri contendo isolados BL 26 expressando luminescência. As setas indicam as colônias em vermelho, que expressam uma luminescência mais intensa.

Fonte: Foto cedida por Vanessa Barcellos.

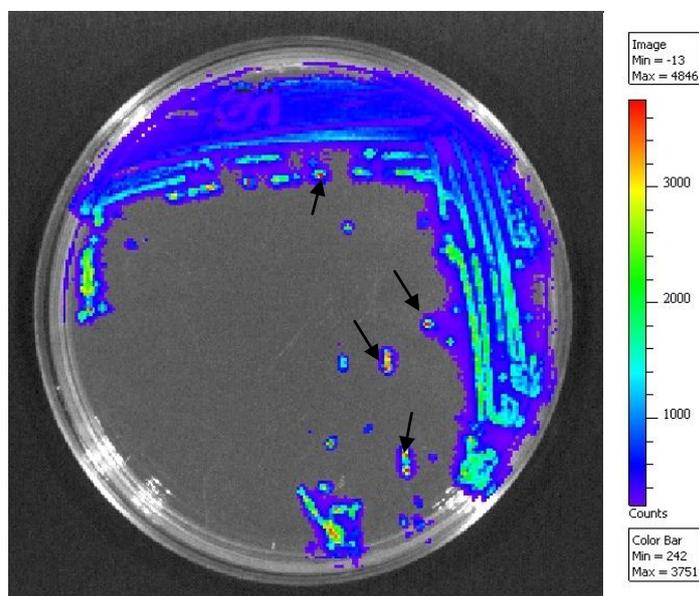


Figura 17. Fotografia das placas de Petri contendo isolados BL 34 expressando luminescência. As setas indicam as colônias em vermelho, que expressam uma luminescência mais intensa.

Fonte: Foto cedida por Vanessa Barcellos.

As fotografias foram obtidas pelo Sistema IVIS Lumina II, com o auxílio do software Living Image. O Sistema capta a luminescência emitida pelas colônias a um

comprimento de onda entre 450 e 500 nm. No gráfico, as colônias que expressam maior bioluminescência estão na cor vermelha.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BIOLUMINESCENTES

O protocolo de extração de DNA proporcionou resultado satisfatório para os 14 isolados de bactérias bioluminescentes que foram analisados. Obtiveram-se produtos de DNA amplificado das amostras que foram submetidas ao PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores F27 e R1492 para amplificação de um fragmento de cerca de 1500 pb, correspondente ao gene 16S rDNA.

Após a precipitação do DNA amplificado com o uso de tRNA, constatou-se a a concentração de 50 ng de DNA por μL do produto final obtido após a amplificação. Os mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no PCR de amplificação exponencial foram utilizados no PCR de sequenciamento, destinado à identificação das espécies de bactérias bioluminescentes que foram isoladas.

Para nenhum dos dez isolados de bactérias bioluminescentes submetidas ao sequenciamento foi obtida sequência de boa qualidade. Um teste foi realizado com as sequências do isolado BL11b. Quando estas foram avaliadas no programa BLAST Nucleotide-nucleotide, tiveram 89% de similaridade com sequências da espécie *Vibrio harveyi*, mas também apresentaram o mesmo valor de similaridade para sequências de outras espécies de bactérias não cultiváveis que também estavam depositadas no banco de dados.

Analisando-se preliminarmente as sequências nucleotídicas obtidas, com auxílio do programa Staden Package, verificou-se a baixa qualidade que estas apresentavam. A má qualidade do produto de sequenciamento não permitiu a análise confiável dos nucleotídeos de forma a identificar seguramente as espécies dos isolados de bactérias bioluminescentes.

Em virtude do alto custo envolvido no sequenciamento de amostras de DNA, os isolados de bactérias bioluminescentes antes de serem novamente submetidos ao sequenciamento, foram agrupados pela técnica de DNA *fingerprinting* *Microsatellite-Primed* (MSP-PCR). Nesta técnica, utilizam-se oligonucleotídeos específicos para

amplificar regiões de microssatélites e minissatélites no DNA, fragmentos que contém um variável número de repetições sequenciais de pares de bases em um mesmo *loci* cromossômico. O número e o padrão destas repetições são bastante particulares, o que possibilita a comparação entre perfis genotípicos. Quanto mais similares forem estes perfis, maiores as chances de eles pertencerem a uma mesma espécie.

Os perfis genotípicos dos dez isolados anteriormente sequenciados e de mais outros quatro isolados bioluminescentes (n total=14) foram obtidos através da amplificação com o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅. Ao serem agrupados por similaridade entre o padrão de bandas do DNA, verificou-se que todas os isolados têm um perfil semelhante, o que indica que estes pertençam a uma mesma espécie. Na Figura 18 pode ser observado o perfil genotípico dos isolados bioluminescentes analisados.

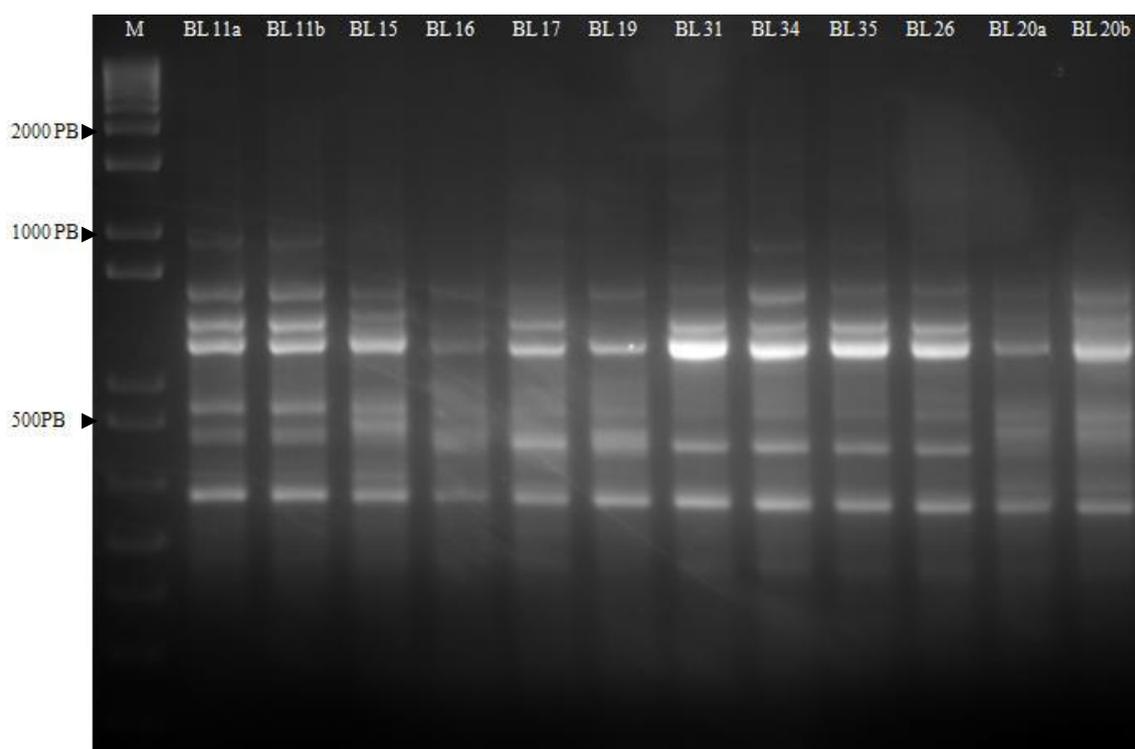


Figura 18. Perfil de bandas de 12 amostras de DNA amplificadas por MSP-PCR com o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅. M: marcador de peso molecular (1 kb plus, Invitrogen).

Fonte: Autor (2011).

Os isolados BL 11a, BL 12, BL 16 e BL 34 foram eleitos como representantes do grupo. Estes isolados serão novamente submetidos ao sequenciamento do 16S rDNA para fins de identificação.

7 CONCLUSÃO

Os parâmetros que possivelmente influenciam a carga microbiana bioluminescente das amostras de água obtidas nas adjacências do estuário da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí são a temperatura e a salinidade. Das quatro zonas onde se coletaram amostras de água, as zonas de estuário e de pós-arrebentação apresentaram as maiores cargas microbianas bioluminescentes. Para um melhor entendimento da relação entre as características físico-químicas das amostras e a carga microbiana bioluminescente presente nas mesmas seria necessário um estudo mais amplo, que acompanhasse a variação destes parâmetros por um considerável período de tempo e em um maior número de amostras do local.

Quanto ao isolamento de bactérias bioluminescentes provenientes dos invertebrados, adaptações à metodologia utilizada poderiam ser efetuadas, pois resultados positivos foram demonstrados somente após o uso de suábes. Por exemplo, um menor tempo de incubação por agitação das amostras poderia ser testado, para avaliar se a diminuição do crescimento de bactérias não bioluminescentes favoreceria a expressão da bioluminescência nas bactérias com esta capacidade. Contudo, as colônias bioluminescentes observadas nas amostras de fevereiro comprovaram a associação destas bactérias com os invertebrados incrustados nas monobóias do TEDUT, em Tramandaí.

Os peixes marinhos analisados também representaram fontes de bactérias bioluminescentes nas águas costeiras de Imbé e Tramandaí. Mesmo quando estas bactérias não foram abundantes nas amostras de água na forma planctônica, elas puderam ser detectadas sob a superfície destes peixes. É reconhecida a importância que o biofilme tem para estas bactérias.

Obtiveram-se quatro isolados de bactérias bioluminescentes com potencial para serem utilizados como fonte de genes de bioluminescência, já que estas apresentavam bioluminescência visível mesmo após um período de 144 horas de incubação. Os 14 isolados que mantiveram a expressão da bioluminescência até a conclusão deste estudo apresentaram um mesmo perfil genotípico, fato que sugere que estes pertençam à mesma espécie. Este fato só poderá ser comprovado após o sequenciamento e análise do gene 16S rDNA dos isolados BL 11a, BL 12, BL 16 e BL 34, escolhidos como

representantes do grupo. O aumento do número amostral, tanto de água quanto de animais, aumentaria as chances de isolar bactérias bioluminescentes de diferentes espécies.

Apesar de apresentarem similaridades entre si, ambientes marinhos costeiros dos diferentes oceanos são muito dinâmicos e altamente influenciados por características peculiares do local de estudo, como o tipo de sedimento, a variação das correntes, o clima, ou intensidade de atividades humanas de impacto, por exemplo. As comunidades microbianas são um reflexo deste ambiente, portanto estudos pontuais são interessantes para o entendimento de como determinadas espécies se distribuem e podem ser mais facilmente isoladas nos mesmos.

O único levantamento existente a respeito da ocorrência, isolamento e identificação de bactérias bioluminescentes marinhas em ambientes naturais do Litoral do Rio Grande do Sul foi realizado por Ortega (2010). Visto que este grupo de bactérias vem sendo aplicado nos mais diferentes ramos da ciência, faz-se necessário conhecer fontes acessíveis destes microrganismos e testar a viabilidade dos métodos de isolamento e identificação dos mesmos.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, Inglaterra, v. 25, p. 3389-3402, Sep. 1997.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (Canadá). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington, 2005.

AST, J. C. *et al.* *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Inglaterra, v. 57, n. 9, p. 2073-2078, Sep. 2007.

AST, J. C.; URBANCZYK, H.; DUNLAP, P. V. Multi-gene analysis reveals previously unrecognized phylogenetic diversity in *Aliivibrio*. **System. Appl. Microbiol.**, Alemanha, v. 32, n.6, p.379-386, Sep. 2009.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; ROCHA, J. M. B.; NIENCHESKI, L. F. H. Manual de Análises em Oceanografia Química. Editora da FURG. Rio Grande, 1996.

BOWMAN, *et al.* *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella fridimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eiosapentanoic acid and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1040–1047, Oct. 1997.

BEAZ-HIDALGO, Roxana *et al.* *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov., isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Inglaterra, v. 60, n.1, p. 223-228, Jan. 2010.

CACCAMO, D. *et al.* Polyphasic approach to the characterisation of marine luminous bacteria. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 150, n. 3, p. 221-230, Apr. 1999.

CALLIARI, *et al.* Variabilidade das dunas frontais do litoral norte e médio do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Revista Digital GRAVEL/UFRGS, ano 3, n. 1, p. 15-30. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ceco/gravel/3/CD/docs/Gravel_3_03.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2011.

CHIU, H. *et al.* Isolation and characterization of marine luminous bacteria from shallow coastal waters of Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, Taiwan, v. 40, n. 1, p. 14-23, Feb. 2007.

- CHRISOLITE, B. *et al.* Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. **Aquacult. Int.**, Amsterdã, v. 275, n. 1-4, p. 13-19. Mar. 2008.
- CONTAG, C. H.; BACHMANN, M. H. Advances in *in vivo* bioluminescence imaging of gene expression. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, Nova Iorque, v. 4 , p. 235-260, Aug. 2002.
- COOK, S.H.; GRIFFIN, D.E. Luciferase imaging of neurotropic viral infection in intact animals. **J. Virol.**, Washington, v. 77 , n. 9, p. 5333-5338, May. 2003.
- COSTA, Renata Albuquerque. **Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará.** 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Curso de Mestrado do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2006.
- CPRM - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (Brasil). **Diagnóstico da destinação final de resíduos sólidos urbanos do litoral médio e norte do estado do Rio Grande do Sul.** (Série Ordenamento Territorial – Porto Alegre, v.22) Informações Básicas para a Gestão Territorial do Litoral Norte do Rio Grande do Sul - Programa LINORS - 1 v. Porto Alegre, 1995.
- CZYZ, A.; WRÓBEL, B.; WEGRZYN G. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. **J. Gen. Microbiol.**, Londres, v. 146, n. 2, p. 283–288, Feb. 2000.
- DANTAS, D. M. de M. **Desempenho do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probióticos quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*.** 2008. 44 f. Plano de pesquisa (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- DILLENBURG, S. **A Laguna de Tramandaí: evolução geológica e aplicação do método geocronológico da Termoluminescência na datação de depósitos sedimentares lagunares.** 1994. 143 f. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Geociências, Área de Geologia Marinha) – Faculdade de Geologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DOYLE, T.C. *et al.* Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic *Candida albicans* strains transformed with the firefly luciferase gene.

Microb. Pathog., Londres, v. 40, n. 2, p. 82-90, Feb. 2006.

DRANCOURT, M. *et al.* 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3623–3630, Oct. 2000.

DUNLAP P. V. *et al.* Isolation and characterization of a visibly luminous variant of *Vibrio fischeri* strain ES114 from the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. **Arch. Microbiol.**, Berlim, v. 164, n. 3, p. 194–202, May. 1995.

DUNLAP, P.V., KITA-TSUKAMOTO, K. Luminous bacteria, p. 863-892. *In: The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria.* Dworkin, M. (Ed.), *et al.* 3. ed. Nova Iorque: Springer, 2006, vol. 6, p. 508–563.

ELEY, M. H. Optimal Environmental Conditions and Nutrient Concentrations for the Synthesis of Bacterial Luciferase in *Photobacterium phosphoreum*. **J. Gen. Microbiol.**, Londres, v. 72, n. 2, p. 415-417, Mai. 1972.

ESTEVEES, F. de A. Carbono inorgânico. *In: ____.* **Fundamentos de Limnologia.** Rio de Janeiro: Interciência: FINEP, 1988. p. 182-187.

FARMER, J. J. III.; HICKMAN-BRENNER, F. W. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *In: The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria.* Dworkin, M. (Ed.), *et al.* 3. ed. Nova Iorque: Springer, 2006, vol. 6, p. 508–563.

FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental, (2007). Web page. Disponível em: <www.fepam.rs.gov.br>. Arquivo acessado em 20 de maio de 2011.

FILHO, J. B. **Unidade 3 – Propriedades físico-químicas das águas oceânicas.** Florianópolis: UFSC, 2007. 22 f. (Apostila da disciplina de Oceanografia, Curso de Geografia, Universidade Federal de Santa Catarina). Disponível em: <<http://www.cfh.ufsc.br/~oceano/documents/ApostilaFISQUIM.pdf>>. Acesso em: 14 de mai. 2011.

FDA - Food and Drug Administration, 1992. **Bacteriological Analytical Manual.** 7^o ed.; 529 p.

FRANKE-FAYARD, B. *et al.* Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 102, n. , p. 11468-1147, Aug. 2005

GITELSON, J. I. Luminous bacteria culture collection IBSO: natural biodiversity and applied aspects. *In: BIOLUMINESCENCE AND CHEMILUMINESCENCE INTERNATIONAL SYMPOSIUM*, 11, 2000, Califórnia. **Proceedings...** Califórnia: Princeton University, Set-2000. p. 63-66.

GOMEZ-GIL, B. *et al.* Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. **J. Gen. Microbiol.**, Londres, v. 150, n. 6, p. 1769–1777, Jun. 2004.

GRADY, E. A. O.; WIMPEE, C. F. Mutations in the lux Operon of Natural Dark Mutants in the Genus *Vibrio*. **Appl. Envir. Microbiol.**, Washington, v. 74, n. 1, p. 61-66, Jan. 2008.

GREER III, L. F.; SZALAY, A. A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. **J. Lumin.**, Amsterdã, v. 17, n. 1, p. 43-74. Jan/Feb. 2002.

GUPTA, R.K. *et al.* Expression of *Photobacterium luminescens* lux genes (*luxA*, *B*, *C*, *D* and *E*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, Inglaterra, v. 4, p. 305–313, Sep. 2003.

HARDY, J. *et al.* Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. **Science**, Inglaterra, v. 303, n. 5659, p. 851-853, Feb. 2004.

HASTINGS, J. W. Bioluminescence. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** California, v. 14, p.197–230, Nov. 1998.

HAYGOOD, M. G.; TEBO, B. M.; NEALSON, K. H. Luminous bacteria of a monocentrid fish (*Monocentris japonicus*) and two anomalopid fishes (*Photoblepharon palpebratus* and *Kryptophaneron alfredi*): Population sizes and growth within the light organs, and rates of release into the seawater. **Mar. Biol.**, Berlim, v. 78, n. 3, p. 249-254, Feb. 1984.

HAYGOOD, M. G. Relationship of the luminous bacterial symbiont of the Caribbean flashlight fish, *Kryptophaneron alfredi* (family Anomalopidae) to other luminous bacteria based on bacterial luciferase (*luxA*) genes. **Arch. Microbiol.**, Berlim, v. 154, n. 5, p. 496-503, Oct. 1990.

HAYGOOD, M. G.; DISTEL, D. L.; HERRING, P. J. Polymerase chain reaction and

16S rRNA gene sequences from the luminous bacterial symbionts of two deepsea anglerfishes. **J. Marine Biol. Assoc. UK**, Inglaterra, v. 72, n. 1, p. 149-159, 1992.

HAYGOOD, M. G. Light organ symbioses in fishes. **Crit. Rev. Microbiol.**, Florida, v. 19, n. 4, p. 191-216, Jan. 1993.

HAYGOOD, M. G.; DISTEL, D. L. Bioluminescent symbionts of flashlight fishes and deep-sea anglerfishes form unique lineages related to the genus *Vibrio*. **Nature**, Londres, v. 363, p. 154-156, May. 1993.

HOLLIS, T. *et al.* DNA bending and a flip-out mechanism for base excision by the helix-hairpin-helix DNA glycosylase, *Escherichia coli* AlkA. **EMBO J.**, Oxford, Inglaterra, v. 19, n. 4, p. 758-766, Feb. 2000.

HUTCHENS, M.; LUKER, G. D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. **Cell. Microbiol.**, Oxford, Inglaterra, v. 9, n. 10, p. 2315-2322, Jun. 2007.

JAWHARA, S.; MORDON, S. Monitoring of bactericidal action of laser by in vivo imaging of bioluminescent *E. coli* in a cutaneous wound infection. **Lasers Med. Sci.**, Espanha, v. 21, n. 3, p. 153-159, Aug. 2006.

JENSEN, M. J. *et al.* 1980. Characterization of *Alteromonas hanedai* (sp. nov.), a non-fermentative luminous species of marine origin. **Curr. Microbiol.**, Nova Iorque, v. 3, n. 5, p. 311-315, Sep. 1980.

LANDELL, M. F. **Caracterização genética e avaliação da diversidade de leveduras associadas a bromélias no Parque de Itapuã-Viamão/RS**. 187 f. Tese (Doutorado em Microbiologia de Ambientes Naturais e Antropogênicos) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**: Nova Iorque (Wiley), p. 115-148, 1991.

LANG, T. *et al.* Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. **Cell Microbiol.**, Oxford, Inglaterra, v. 7, n. , p. 383-392, Mar. 2005.

LIMA, G. T. N. P. de. **Estudo dos hidrocarbonetos e metais pesados sistema lagunar e estuarino de Tramandaí – RS**. 2004. 162f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química, Física e Geológica) – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Química, Física e Geológica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2004.

LUKER, G. *et al.* Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. **J. Virol.**, Washington, v. 76, n. 23, p. 12149-12161, 2002.

MADINGAN, M. T. *et al.* Capítulo 9: Regulação da Expressão Gênica. *In:* ____ . **Microbiologia de Brock**. Tradução Andrea Queiroz Maranhão *et al.* 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAKENSON, J. C. *et al.* *Shewanella woodyi* sp. nov., an Exclusively Respiratory Luminous Bacterium Isolated from the Alboran Sea. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Inglaterra, v. 47, n. 4, p. 1034- 1039, Oct. 1997.

MEDVEDEVA, S. E. *et al.* BIOLUMBASE - the database of natural and transgenic bioluminescent organisms. **J. Lumin.**, Amsterdã, v. 20, p. 90–96, Jan. 2005.

MEIGHEN, E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. **Microbiol. Rev.**, Nova Iorque, v. 55, n. 1, p. 123-142, Mar. 1991.

MIRANDA, L.B. Cinemática e dinâmica de estuários. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Apostila do Curso de Pós-Graduação em Oceanografia Física, 1984, 360p.

MOURINO, J. L. P. *et al.* Avaliação bacteriológica aplicada à produção de pós larvas de *Penaeus vannamei*. **Atlantica**, Rio Grande, v. 30, n. 1, p. 9-16, 2008.

NUNES-HALLDORSON, V. da S.; DURAN, N. L. Bioluminescent bacteria: genes lux as environmental biosensors. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 91-96, Jun. 2003.

O'BRIEN, C. H.; SIZEMORE, R. K. Distribution of the luminous bacterium *Beneckea harveyi* in a semitropical estuarine environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 5, p. 928-933, Nov. 1979.

O'GRADY, E. A., WIMPEE, C. F. Mutations in the *lux* Operon of Natural Dark Mutants in the Genus *Vibrio*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 74, n. 1, p. 61-66, Jan. 2008.

ORNDORFF, S. A.; COLWELL, R. R. Distribution and Identification of Luminous Bacteria from the Sargasso Sea. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 5, p. 983-987, May. 1980.

ORTEGA, D. B. **Identificação de bactérias marinhas bioluminescentes isoladas na região estuarina da bacia do Rio Tramandaí e região costeira do município de Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil.** 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Imbé, 2010.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. dos P. *Vibrios* patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 3, p. 300-303, Mai./Jun. 2007.

PEREIRA, C. S. *et al.* *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 387-390, Abr./Jun. 2007.

PLANO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ. Rio Grande do Sul: Ministério Público. Disponível em: <http://www.mp.rs.gov.br/areas/paibh/arquivos/plano_bacia_hidrografica_rio_tramanda_i.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2011.

RAMAIAH, N.; CHANDRAMOHAN, D. 1992. Ecology and biology of luminous bacteria in the Arabian Sea. *In: Oceanography of the Indian Ocean*. Desai, B.N. (Ed.), p. 11-23. Oxford-IBH, New Dehli.

RAMAIAH, N. *et al.* Detection of luciferase gene sequences in nonluminescent bacteria from the Chesapeake Bay. **Microb. Ecol.**, Nova Iorque, v. 33, n. 1, p. 27-34, Jul. 2000.

RUBINGER, C. F. **Seleção de Métodos Biológicos para Avaliação Toxicologia de Efluentes Industriais.** 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Área de concentração: Meio Ambiente) – Programa de Pós - Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade

Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

RUBY, E. G.; GREENBERG, E. P.; HASTINGS, J. W. Planktonic Marine Luminous Bacteria: Species Distribution in the Water Column. **Appl. Envir. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 2, p. 302- 306, Feb. 1980.

RUBY, E. G.; MORIN, J. G. Luminous Enteric Bacteria of Marine Fishes: a Study of Their Distribution, Densities, and Dispersion. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 3, p. 406-411, Sep. 1979.

RUBY, E. G., NEALSON, K. H. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore seawater. **Limnol. Oceanogr.**, v. 23, n. 3, p. 530-533, 1978.

SAEIJ, J.P.J. *et al.* Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. **Infect. Immun.**, Washington, v.73, n. 2, p. 695-702, Feb. 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.

SANSEVERINO, J. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES Expressing Bacterial Bioluminescence for Rapid, Sensitive Detection of Estrogenic Compounds. **Appl. Envir. Microbiol.**, Washington, v.71, n. 21, p. 4455-4460, Aug. 2005.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F.; COSTA, M. de F. D. Artigo de Revisão. Quimioluminescência e Bioluminescência. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 16, n.3, Mai./Jun. 1993.

SATO, A.; KLAUNBERG, B.; TOLWANI, R. In Vivo Bioluminescence Imaging. **Comp. Med.**, Memphis, v. 54, n. 6, p. 631-634, Dec. 2004

SCHWARZBOLD, A.; WÜRDIG, N. L. Lagoas Costeiras do Rio Grande do Sul. In: PETROBRÁS, **Diagnóstico Ambiental Oceânico e costeiro das Regiões Sul e Sudeste do Brasil**, Rio de Janeiro: PETROBRÁS, v.1, p. 94-97, 1992.

SILVA, Roseli Pimentel Pinheiro e. **Fatores interferentes na frequência da vibriose em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) no litoral sul de Pernambuco**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e

Aquicultura) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2007.

SUGUMAR, G. *et al.* *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. **Dis. Aquat. Org.**, Alemanha, v. 33, n. 2, p. 111-118, Jun. 1998.

STABILI, L. *et al.* Epibiotic *Vibrio* luminous bacteria isolated from some hydrozoa and bryozoa species. **Microb. Ecol.**, Nova Iorque, v. 56, n. 4, p. 625-36, Apr. 2008.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The staden package, 1998. **Methods Mol. Biol.**, Nova Iorque, v.132, p. 115-130, 2000.

TABAJARA, L. L. C. A.; DILLENBURG, S. Batimetria e sedimentos de fundo da laguna de Tramandaí – RS. Porto Alegre. CECO/IG/UFRGS, Notas Técnicas, v. 10, p. 21-33, 1997.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Nova Iorque, v. 68, n. 3, p. 403-431, Sep. 2004.

TOMAZELLI, L. J.; VILLWOCK, J. A. Geologia do Sistema lagunar holocênico do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas* v. 18, p. 13-34, 1991.

ULITZUR, S. Established technologies and new approaches in applying luminous bacteria for analytical purposes. **J. Biolumin. Chemilumin.**, Amsterdã, v. 12, n. 4, p. 179-192, Jul./Aug. 1997.

URBANCZYK, H. *et al.* Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Inglaterra, v. 57, n. 12, p. 2823-2829, Dec. 2007.

VILLWOCK, J. A. A Costa Brasileira: Geologia e Evolução. **Notas Técnicas**, v. 7, p. 38-49, 1994.

ZHANG, L. *et al.* Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. **Nature**, Londres, v. 362, n. 6419, p 446–448, Apr. 1993.

WATERS, P.; LLOYD, D. Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates. **J. Gen. Microbiol.**, Londres, v. 131, p. 2865-2869, Jun 1985.

WOLLENBERG, M.S.; RUBY, E.G. Population structure of *Vibrio fischeri* within the light organs of *Euprymna scolopes* squid from Two Oahu (Hawaii) populations. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, n. 1, p. 193-202, Jan. 2009.

YANG, Y. K. *et al.* Characterization of marine luminous bacteria isolated off the coast of China and description of *Vibrio orientalis* sp. nov. **Curr. Microbiol.**, Nova Iorque, v. 8, n. 2, p. 95-100, Mar. 1983.

YOSHIZAWA, S. *et al.* *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Inglaterra, v. 59, n. 6, p. 1438-1442, Jun. 2009.

YOSHIZAWA, S. *et al.* *Aliivibrio sifiae* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from seawater. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, Tóquio, v. 56, n. 6, p. 509-518, Aug. 2010 a.

YOSHIZAWA, S. *et al.* *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, Tóquio, v. 56, n. 6, p. 509-518, Aug. 2010 b.