



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

ANA CECÍLIA PINHO COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES AMBIENTAIS COMO INDUTORES DE
LUMINESCÊNCIA EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO***

FORTALEZA

2013

ANA CECÍLIA PINHO COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES AMBIENTAIS COMO INDUTORES DE
LUMINESCÊNCIA EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO***

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA

2013

ANA CECÍLIA PINHO COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES AMBIENTAIS COMO INDUTORES DE
LUMINESCÊNCIA EM BACTÉRIAS DO GÊNERO *VIBRIO***

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Eliomar e Fátima.

Ao meu tio Antônio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela realização deste sonho.

Aos meus pais, Eliomar e Fátima, meus irmãos Matheus e Hilda, e também à Ivanilza, maiores incentivadores deste projeto e aos quais dedico toda a minha gratidão e amor.

Ao meu tio Antônio, cujos conselhos e orientação me levaram à oceanografia.

A todos meus familiares, que sempre torceram e me apoiaram.

À professora Oscarina Viana, pela orientação, confiança e paciência nestes anos de trabalho.

À professora Regine Vieira pela acolhida em sua equipe.

Ao Rafael Rocha, por sua dedicação e grande colaboração na execução deste projeto.

À Cristiane Teles, Edirsana Carvalho, Gleire Menezes e todos os demais colegas do Laboratório de Microbiologia.

Aos grandes amigos feitos nestes quatro anos, André Aquino, Beatrice Veras, Iliana Gomes, Jamile Ulisses, Nivia Maria e Thalita Oliveira.

Aos amigos de toda a vida, Ana Caroline, Felipe, Iago, Jéssica, Lillian, Luciana, Marcela, Priscilas, Rafaela, Rafaella, Thais e Vivianne.

Ao Denis Mourão, pelo apoio e compreensão sempre demonstrados.

Aos membros da banca examinadora pela contribuição.

RESUMO

Entre os organismos marinhos bioluminescentes, bactérias do gênero *Vibrio* se destacam, pois algumas espécies como *Vibrio harveyi* e *Vibrio cholerae*, tem suas capacidades luminescentes associadas à patogenicidade que acarreta surtos de doenças no setor da aquicultura em vários países. Também o gênero *Aliivibrio* figura com espécies de importância ecológica, como *Aliivibrio fischeri* e *Aliivibrio logei*. Apesar disso, a capacidade bioluminescente ainda é pouco entendida, ainda não estão claras quais condições ambientais favorecem ou inibem esta atividade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fatores abióticos sobre a bioluminescência de bactérias marinhas isoladas de hemolinfa de camarão marinho da espécie *Litopenaeus vannamei*, de água de tanque de cultivo experimental de camarões marinhos da mesma espécie e do ambiente estuarino dos rios Cocó e Pacoti. As cepas passaram por provas iniciais a fim de restringir o isolamento somente àquelas já sabidas como bioluminescentes e, posteriormente, foram submetidas aos testes simulando diferentes valores dos parâmetros testados. Também foram realizados testes para se observar a capacidade de indução de luminescência entre espécies diferentes de bactérias. Foi observado que, à exceção da temperatura, os valores que mais estimularam a bioluminescência foram aqueles semelhantes aos encontrados no ambiente natural de ocorrência das bactérias. O *quorum-sensing* não pareceu influenciar a luminescência inter-específica e sim, os fatores abióticos. Uma vez que comunidades bacterianas são reflexo das condições locais, estudos pontuais se fazem necessários para o entendimento de sua distribuição e identificação.

Palavras-chave: Vibrionaceae. *Quorum sensing*. Parâmetros ecológicos.

ABSTRACT

Among bioluminescent marine microorganisms, bacteria from genus *Vibrio* such as *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae* has luminescent capabilities associated with the pathogenicity that causes disease in aquacultured organisms in several countries. Also the genus *Aliivibrio* figure with species of ecological importance, particularly *Aliivibrio fischeri* and *Aliivibrio logei*. Nevertheless, the bioluminescence ability is still poorly understood and not yet clear which environmental conditions or inhibitory activity. The aim of this study was to evaluate the influence of abiotic factors on the bioluminescence of marine bacteria isolated from hemolymph of marine shrimp species *Litopenaeus vannamei*, from water from experimental cultivation tank of marine shrimp and from water of Cocó and Pacoti estuaries. Initially, strains were submitted to initial tests to restrict the isolation only to those already known as bioluminescent and then were subjected to tests simulating different values of abiotic parameters tested. Tests were also carried out to observe the influence of the *quorum-sensing* phenomenon, to observe the ability to induce luminescence among different species of bacteria. We observed that, with the exception of temperature, the values that most stimulated bioluminescence were similar to those found in the natural environment of occurrence of bacteria. The *quorum-sensing* does not seem to influence the inter-specific luminescence and the tests of abiotic factors. Since bacterial communities are reflective of local conditions, specific studies are necessary for understanding the distribution and identification.

Keywords: Vibrionaceae. *Quorum sensing*. Ecological Parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ponto de coleta no Rio Cocó.....	21
Figura 2 – Ponto de coleta no Rio Pacoti.....	21
Figura 3 – Fluxograma do processo de indução de de luminescência por estirpes de <i>Aliivibrio fischeri</i> em <i>Vibrio harveyi</i>	27
Figura 4 – Imagem demonstrativa da emissão de luminescência das colônias isoladas.....	28
Figura 5 – Imagem demonstrativa do resultado positivo (luminescente) nos testes de fatores abióticos.....	29
Gráfico 1– Número de cepas capazes de emitir luminescência às diferentes condições de temperatura.....	31
Gráfico 2– Número de cepas capazes de emitir luminescência às diferentes condições de salinidade.....	34
Gráfico 3– Número de cepas capazes de emitir luminescência às diferentes condições de pH.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Identificação e origem das estirpes bacterianas testadas.....	27
Tabela 2 –	Resultados quanto à emissão de luminescência sob incubação em três diferentes condições de temperatura, onde T ₁₀ – incubação a 10°C ; T ₂₀ – incubação a 20°C ; T ₃₀ – incubação 30°C.....	29
Tabela 3 –	Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a emissão de luminescência entre cepas de <i>Vibrio</i>	33
Tabela 4 –	Efeito do pH sobre a emissão de luminescência entre cepas de <i>Vibrio</i>	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Bioluminescência no ambiente marinho.....	13
1.2	Bactérias bioluminescentes da família Vibrionaceae	15
1.2.1	<i>Aliivibrio fischeri</i>	16
1.2.2	<i>Vibrio harveyi</i>	17
1.3	Fatores abióticos e sua influência sobre a capacidade bioluminescente	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Origem das cepas	21
3.2	Isolamento e Identificação das culturas	21
3.2.1	<i>Prova da Hidrólise de Arginina e Descarboxilação de Lisina e Ornitina</i>	22
3.2.2	<i>Prova de halofilismo</i>	22
3.2.3	<i>Teste de Voges-Proskauer (VP)</i>	22
3.2.4	<i>Teste de hidrólise do Orto-nitrofenil-β – D-Galacto-Piranosídeo (ONPG)</i>	22
3.2.5	<i>Prova da fermentação de carboidratos</i>	23
3.2.6	<i>Teste de produção do Indol</i>	23
3.2.7	<i>Análise morfológica</i>	23
3.2.8	<i>Análise morfotintorial</i>	24
3.3	Verificação da emissão de luminescência	24
3.4	Efeito dos fatores abióticos sobre a capacidade luminescente	24
3.4.1	<i>Preparo dos inóculos</i>	25
3.4.2	<i>Efeitos da temperatura</i>	25
3.4.3	<i>Efeitos da salinidade</i>	25
3.4.4	<i>Efeitos do pH</i>	25
3.5	Teste para a verificação de produção de indutores de luminescência por estirpes de <i>Aliivibrio fischeri</i> em <i>Vibrio harveyi</i> (adaptado de BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997)	26
3.5.1	<i>Preparo dos inóculos de Aliivibrio fischeri</i>	26

3.5.2	<i>Extração do líquido metabólico</i>	26
3.5.3	<i>Preparo dos inóculos de Vibrio harveyi</i>	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Verificação da capacidade luminescente	28
4.2	Efeitos dos fatores abióticos	28
4.3	Efeitos da temperatura	29
4.4	Efeitos da salinidade	33
4.5	Efeitos do pH	35
4.6	Verificação de produção de indutores de luminescência por estirpes de <i>Aliivibrio fischeri</i> em <i>Vibrio harveyi</i> (adaptado de BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997)	38
5	CONCLUSÃO / CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioluminescência no ambiente marinho

A grande maioria dos organismos bioluminescentes reside nos oceanos. Dos mais de 700 gêneros que contém espécies luminescentes, aproximadamente 80% são marinhos (SHIMOMURA, 2006). A importância ecológica da bioluminescência nesse ambiente é evidenciada pelo domínio dos emissores de luz em mar aberto: peixes e crustáceos são dominantes em termos de biomassa e bactérias e dinoflagelados são dominantes em termos de abundância (HERRING; WIDDER, 2001; WIDDER, 1999). Algumas das funções sugeridas por Widder (1999) para a emissão de luminescência são: facilitar a localização de alimento, atração de companheiros e defesa contra predadores.

Latz, Frank e Case (1988) e Haddock e Case (1999) relatam a grande variedade dos espectros de emissão no tocante à intensidade, cinética e às cores emitidas pelos organismos bioluminescentes, que se estendem ao longo de todo o intervalo visível. O espectro mais comum de emissão é o azul ($L_{\max} \sim 475\text{nm}$), que possui comprimento de onda próximo àquele que se propaga por maiores distâncias na água do mar (WIDDER, 1999). O segundo espectro mais comum é o verde e é mais frequentemente encontrado em espécies bentônicas e de águas rasas, a cor desta emissão está possivelmente relacionada à maior turbidez destas regiões (HERRING, 1983; JOHNSEN; WIDDER; MOBLEY, 2004).

Dunlap (2009) relata a distribuição das espécies bioluminescentes entre as bactérias; todas as espécies do gênero terrestre *Photorhabdus* são luminescentes, mas gêneros marinhos com espécies bioluminescentes (*Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella*, e *Vibrio*) incluem muitas espécies não luminescentes estreitamente relacionadas. No entanto, a genômica comparativa revelou que todas as bactérias bioluminescentes compartilham uma sequência de gene comum, o *operon lux*, que codifica a biossíntese da luciferase e os seus substratos (DUNLAP, 2009). Esta sequência altamente conservada aparece em bactérias provenientes de diferentes nichos ecológicos, o que sugere uma forte vantagem seletiva, apesar do alto custo energético da produção de luz (CZYZ; PLATA; WERGZYN, 2003).

O *quorum sensing* (ou auto-indução) também figura como uma importante aquisição evolutiva, pois permite uma economia de energia uma vez que assegura que a bactéria luminescente não sintetize seus produtos até que se tenha uma concentração de células microbianas suficiente para que a luminescência seja visível (HASTINGS;

GREENBERG, 1999). O auto-indutor atua como uma molécula-sinal e se difunde no meio ligando-se às proteínas das membranas de outras bactérias até que se tenha um número suficiente de ligações para desencadear a ativação da expressão de genes como os que atuam na bioluminescência (MADIGAN *et al.*, 2010). O processo de produção e emissão de luminescência é energeticamente dispendioso, por isso a grande importância da percepção da concentração de auto-indutores e da densidade bacteriana presente no meio, para garantir que a emissão da luminescência causará algum impacto significativo no ambiente (NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003).

A reação química envolvida na bioluminescência deve ser suficientemente energética para produzir uma molécula num estado excitado que irá gerar um fóton visível à medida que retorna ao seu estado basal (SHIMOMURA, 2006). Em bactérias, dois substratos simples [mononucleotídeo de flavina reduzida (FMNH₂) e um aldeído alifático de cadeia longa (RCHO)] são oxidados pelo oxigênio molecular e pela enzima luciferase. O aldeído é consumido durante a reação, mas é continuamente sintetizado pela bactéria, o que resulta num brilho persistente e contínuo (DUNLAP, 2009).

Os muitos exemplos de convergência evolutiva relacionados com a bioluminescência é uma prova do valor de sobrevivência da característica, ao passo que a sua abundância e ubiquidade no oceano atesta a sua importância em ecossistemas marinhos (WIDDER, 2010).

O estudo de bactérias luminescentes está geralmente relacionado ao entendimento de seus efeitos na patogenicidade, visto que algumas espécies reconhecidamente luminescentes como, por exemplo, *Vibrio harveyi*, são causadoras de doenças em organismos marinhos como os camarões (LEITE, 2011). Só recentemente a pesquisa tem se voltado para a luminescência e suas aplicações. Estão sendo desenvolvidas pesquisas com ênfase na utilização destas bactérias em testes toxicológicos e em marcadores bioluminescentes para o monitoramento *in vivo* de processos infecciosos. Diferentes técnicas têm sido aplicadas para a manutenção de genes isolados do *operon lux* especialmente nas áreas ambiental e clínica (ULITZER, 1997).

Chatterjee e Meighen (1995) já relatavam o uso dos genes *lux* para desenvolvimento de biossensores e para detecção de agentes patogênicos. Outros autores como Flemming *et al* (1994) também listaram suas aplicações para o monitoramento de bactérias geneticamente modificadas presentes no ambiente.

1.2 Bactérias bioluminescentes da família Vibrionaceae

A família Vibrionaceae compreende os gêneros: *Enterovibrio* (4 espécies), *Grimontia* (1 espécie), *Aliivibrio* (6 espécies), *Photobacterium* (25 espécies), *Salinivibrio* (7 espécies) e *Vibrio* (111 espécies) (DSMZ, 2013).

Vibriões são bactérias gram-negativas, geralmente móveis, mesófilas, quimiorganotróficas e têm um metabolismo fermentativo facultativo (FARMER *et al.*, 1992). Elas geralmente são capazes de crescer em Ágar Marine e em meio seletivo Agar Tiosulfato-Citrato Bile-Sacarose (TCBS) e são principalmente oxidase positiva. São muito abundantes em ambientes aquáticos, incluindo estuários (BARBIERI *et al.*, 1999), águas marinhas costeiras (HEIDELBERG; HEIDELBERG; COLWELL, 2002), sedimento (URAKAWA *et al.*, 2000 ; RAMESH; LOGANATHAN; VENUGOPALAN, 1989) e em áreas de cultivos de organismos aquáticos marinhos em todo o mundo (VANDENBERGHE *et al.*, 2003).

Vários estudos mostraram que os vibriões aparecem em densidades particularmente elevadas em organismos marinhos como corais (ROSENBERG; BEM-HAIM, 2002), peixes (GRISEZ *et al.*, 1997), moluscos (SAWABE *et al.*, 2003), camarões (GOMEZ-GIL *et al.*, 1998; VANDENBERGHE *et al.*, 1998) e no zooplâncton (HEIDELBERG; HEIDELBERG; COLWELL, 2002). Em algumas espécies de lulas, bactérias do gênero *Aliivibrio* (como *A. fischeri* e *A. logei*) colonizam os “órgãos de luz” dos hospedeiros e desempenham um papel (via emissão de luz) na comunicação, atração de presas e na proteção contra predadores (FIDOPIASTIS; VON BOLETZKY; RUBY, 1998; FUKAWASA; DUNLAP, 1986). Outro exemplo da associação entre vibriões e animais marinhos é o biofilme formado por *Vibrio* spp em exoesqueletos de crustáceos fitoplantônicos e outros organismos marinhos que podem, de fato, constituir uma estratégia de sobrevivência em períodos de escassez de alimento e/ou outros estresses ambientais (WAI; MIZUNOE; YOSHIDA, 1999). Também são relatados uso de cepas de *Vibrio* como probióticos para peixes e mariscos (VERSCHUERE *et al.*, 2000).

Embora sejam reconhecidamente patógenos humanos e de organismos marinhos, algumas espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes nos ambientes aquáticos através do transporte de matéria orgânica dissolvida (THOMPSON; IIDA; SWINGS, 2004). Ainda, outras espécies estão relacionadas à degradação de compostos aromáticos, tendo, portanto, grande interesse biotecnológico (HEDLUND; STALEY, 2001).

Algumas espécies são tipicamente relatadas como bioluminescentes marinhas, entre elas estão aquelas pertencentes ao grupo *Aliivibrio* (além de *A. fischeri*, *A. logei* e *A. salmonicida*) e do grupo *Vibrio harveyi* (*V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. orientalis* e *V. cholerae*). Certas espécies de importância sanitária e econômica possuem linhagens bioluminescentes, como *V. cholerae*, que é o agente causador da cólera, doença transmitida através de sua presença em água e alimentos contaminados (COSTA, 2006). *V. vulnificus* e *V. splendidus* são naturalmente encontrados em águas estuarinas, mas são também patógenos humanos (*V. vulnificus*) e de larvas de ostras (*V. splendidus*) (SUGUMAR *et al.*, 1998; COSTA, 2006). Já *V. orientalis* foi descrito como habitante de águas do mar Amarelo, na China (YANG *et al.*, 1983).

Estudos novos apontam para a existência de novas espécies luminescentes ainda não descritas na vizinhança filogenética de *Aliivibrio*, como as recém descobertas espécies *A. sifiae*, isolada da água do mar do Japão (YOSHIZAWA *et al.*, 2009; YOSHIZAWA *et al.*, 2010) e *A. finiterraensis*, isolada de mariscos (BEAZ-HIDALGO *et al.*, 2010). As espécies já descritas deste gênero são organismos marinhos de vida livre, habitantes de órgãos luminosos de invertebrados e patógenos de peixes (AST; URBANCZYK; DUNLAP, 2009).

Novas espécies do gênero *Vibrio* também vêm sendo descritas, como *V. azureus* e *V. sagamiensis*, isolados da água do mar do Japão (YOSHIZAWA *et al.*, 2009; YOSHIZAWA *et al.*, 2010).

1.2.1 *Aliivibrio fischeri*

O *Aliivibrio fischeri* é uma bactéria marinha bioluminescente que vive em simbiose com alguns peixes e lulas marinhas ou como um organismo de vida livre (DUNLAP; GREENBERG, 1991; MCFALL-NGAI; RUBY, 1991) e no trato digestório de animais marinhos (MEIGHEN, 1991). Quando na forma livre, *A. fischeri* existe em baixa densidade de células e aparece como não luminescente, quando em “órgãos de luz”, a bactéria se apresenta em altas densidades de células e é geralmente luminescente (RUBY; NEALSON, 1978; NEALSON; HASTINGS, 1979; RUBY; MCFALL-NGAI, 1992). No caso da bactéria luminescente que forma simbioses específicas com certos peixes e lulas, é claro o valor adaptativo da emissão de luz: a bactéria provê ao hospedeiro luz, que pode ser usada para atrair presas, por exemplo, enquanto o hospedeiro fornece à bactéria um ambiente ideal de crescimento (DUNLAP, 2009).

A expressão do *lux* em *A. fischeri*, assim como em *V.harveyi*, é dependente da densidade de células no meio, mas os sistemas de bioluminescência das espécies diferem substancialmente entre si de acordo com a natureza das substâncias auto-indutoras e com a organização dos genes *lux*. O auto-indutor em *A. fischeri*, N-(3-oxohexanoyl)-L-homo-serina lactona, é produzido apenas por esta espécie e somente nela desencadeia uma resposta. Já em *V. harveyi* a atividade auto-indutora é lábil, ademais, bactérias marinhas não luminescentes como *V. parahaemolyticus* podem produzir substâncias que estimulam a indução de luminescência em *V. harveyi* (GREENBERG; HASTINGS; ULITZER, 1979).

1.2.2 *Vibrio harveyi*

Por definição, *V. harveyi* é um organismo marinho luminescente, Gram-negativo, halófilo (FARMER *et al.*, 2005). É encontrado como um organismo de vida livre nos oceanos e também no trato digestório de animais marinhos, onde existe em altas densidades de células em associação com outras espécies de bactérias (MEIGHEN, 1991).

É tido como uma bactéria que utiliza *quorum sensing* envolvendo a comunicação célula-célula para expressar a sua luminescência (GREENBERG; HASTINGS; ULITZER, 1979). Durante a fase de crescimento de *V. harveyi*, a luminescência inicialmente está muito atrasada em relação ao crescimento e só posteriormente, aumenta a uma taxa significativamente mais rápida, o que se dá após os auto-indutores terem se acumulado no meio.

A luminescência em *V. harveyi* dá-se pela interação entre dois auto-indutores: N-(3-oxohexanoyl) homoserina lactona (chamada de VAI-1) e VAI-2. Ambos são produzidos a baixos níveis de constituição, difundem-se livremente através do envelope celular e se acumulam no ambiente circundante. Quando em uma elevada densidade de células, as concentrações de auto-indutores atingem um equilíbrio (externa e internamente à célula) que é suficiente para produzir um complexo LuxR/VAI-1 que resulta na indução do *operon lux* (genes que codificam as funções de luminescência) (KAPLAN; GREENBERG, 2005; HANZELKA; GREENBERG, 1995).

Estudos relacionam a capacidade bioluminescente desta espécie com a patogenicidade em organismos marinhos, como Lavilla-Pitogo *et al.* (1990), que concluíram em seu trabalho que isolados luminescentes de *V. harveyi* eram letais em concentrações próximas de 100 células.mL⁻¹ em água do mar, enquanto isolados não luminescentes não eram

capazes de causar mortalidade em concentrações menores do que 10^6 células.mL⁻¹ (PIZZUTTO; HIRST, 1995). Também Selvin, Huxley e Lipton (2005) relataram a relação da bioluminescência destas bactérias como um dos indicadores de virulência.

1.3 Fatores abióticos e sua influência sobre a capacidade bioluminescente

Estudos sugerem que fatores ambientais tais como temperatura, salinidade, pH e carga orgânica influenciam o crescimento de bactérias luminescentes (FARGHALY, 1950; RAMESH; LOGANATHAN; VENUGOPALAN, 1989) e também que estes fatores estão relacionados a processos como o desencadear de surtos de doenças causadas por bactérias, como observado por Sunaryanto e Mariam (1986), onde a maioria dos surtos de doenças causadas por bactérias bioluminescentes na Indonésia, ocorreram durante a estação chuvosa. No entanto, ainda não está clara qual a influência destes fatores abióticos sobre a luminescência e, conseqüentemente, sobre a patogenicidade.

Salinidade, pH e temperatura são os mais importantes fatores envolvidos no crescimento de microrganismos bioluminescentes (WATERS; LLOYD, 1985). A síntese do sistema luciferase, bem como a expressão de luminescência, depende da interação entre muitos fatores, por exemplo, taxa de crescimento, concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes como o Ferro, presença de auto-indutores e ausência de substâncias que possam reprimir essa atividade (HASTINGS; NEALSON, 1977; HASTINGS *et al.*, 1985).

Waters e Lloyd (1985) em seu estudo avaliaram *in vitro* a dependência das condições de pH, sais e nutrientes no crescimento e atividade bioluminescente em três espécies de bactérias, entre elas *A. fischeri*, e foi observado o crescimento em todos os valores de temperatura testados (10°C, 15°C, 20°C e 25°C), a emissão de luminescência foi constatada até mesmo nos menores teores de NaCl e em baixos valores de pH.

Também Eley (1972) realizou estudo semelhante em bactéria bioluminescente da espécie *Photobacterium phosphoreum* e verificou que em valores de pH próximos a 6,5, concentração de NaCl 30 g.L⁻¹ e incubação a 15°C a atividade luminescente apresentou-se mais intensa.

Poucos são os estudos com enfoque na bioluminescência e suas propriedades. O estudo de Leite (2011) foi um dos pioneiros na área da bioluminescência bacteriana no Brasil, onde se tem uma predominância de estudos acerca das espécies bioluminescentes relacionando-as com sua capacidade patogênica em organismos marinhos, devido aos seus

impactos na indústria de aquicultura, como o citado por Sae-Oui, Tunsutapanit e Ruangpan (1987).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Observar a variação da capacidade bioluminescente de bactérias do gênero *Vibrio* quando expostas a diferentes parâmetros abióticos em testes *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- I. Determinar a influência dos parâmetros abióticos temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e salinidade sobre a capacidade bioluminescente em bactérias da família Vibrionaceae.
- II. Avaliar o fenômeno do *quorum-sensing* sobre a indução de bioluminescência por estirpes de *Aliivibrio fischeri* em *Vibrio harveyi*.
- III. Identificar as espécies bioluminescentes isoladas de água de viveiro de camarões marinhos cultivados e de estuários do Cocó e Pacoti, Ceará.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das cepas

As estirpes testadas foram provenientes de hemolinfa de camarões marinhos cultivados (*Litopenaeus vannamei*) pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado já previamente identificadas; o restante das cepas foram isoladas da água de tanque de cultivo experimental de camarões marinhos, também da espécie *Litopenaeus vannamei*, do Centro de Estudos Aquáticos da Universidade Federal do Ceará (CEAC/LABOMAR), e isoladas diretamente do ambiente, oriundas da água do estuário do Rio Cocó ($3^{\circ}46'26''$ S e $38^{\circ}26'9''$ W) e do Rio Pacoti ($3^{\circ}49'6''$ S e $38^{\circ}24'33''$ W) (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – Ponto de coleta no Rio Cocó.

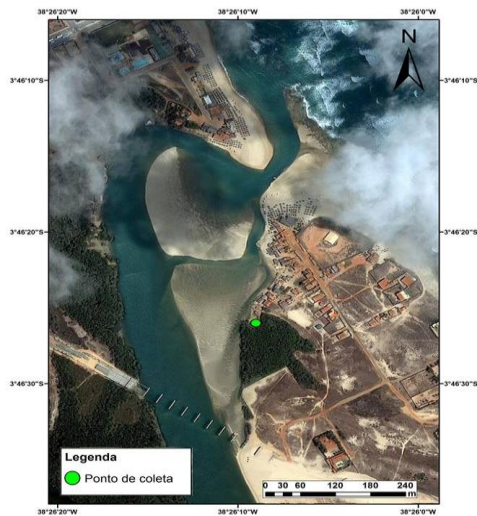
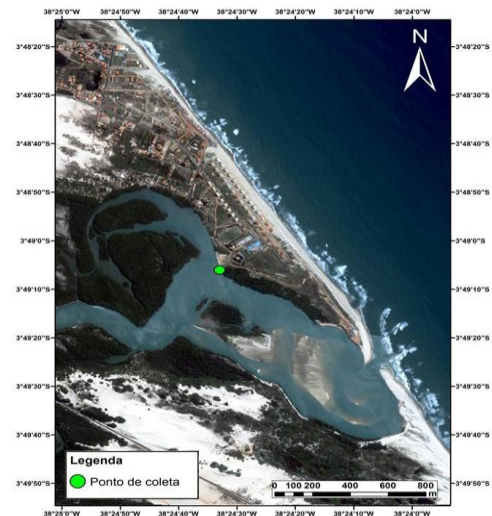


Figura 2 – Ponto de coleta no Rio Pacoti.



3.2 Isolamento e identificação das culturas

As cepas isoladas da água de tanque de cultivo experimental de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, e diretamente do ambiente, oriundas da água do estuário do Rio Cocó e do Rio Pacoti passaram por um processo de isolamento onde o inóculo foi feito através da técnica de plaqueamento sobre superfície em placas de Agar Luminescência (ANEXO E). Após as 24h de incubação em estufa a 35°C , as cepas selecionadas foram aquelas que emitiram luminescência ao serem expostas à luz Ultra Violeta em câmara escura.

Após esse processo as cepas selecionadas foram submetidas à identificação fenotípica seguindo protocolo proposto por Nogueirola e Blanche (2008).

3.2.1 Prova da Hidrólise de Arginina e Descarboxilação de Lisina e Ornitina

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, as cepas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio basal, suplementado com 1% (p/v) de NaCl. Em cada um dos tubos foram adicionadas 5g de arginina, lisina e ornitina. Também foi preparado um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer aminoácido, para servir de controle da prova. Após a inoculação, a cada tubo foi acrescentado 1 mL de óleo mineral esterilizado, seguindo-se a incubação a 35°C por até 6 dias. O meio inoculado torna-se amarelo como resultado da produção de ácido oriundo do metabolismo da glicose existente no meio basal. Quando a reação positiva ocorre, o meio torna-se alcalino, apresentando cor púrpura. O tubo controle por sua vez, permanece ácido, com coloração amarela.

3.2.2 Prova de halofilismo

Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, as cepas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Caldo Triptona, cada tubo com concentrações 0%, 6% e 10% de NaCl. Os tubos foram incubados a 35°C por 24h e a positividade se dá pela turvação do meio.

3.2.3 Teste de Voges-Proskauer (VP)

Tubos contendo o Caldo MR-VP, foram inoculados e incubados a 35°C por 24h. Após a incubação, foi adicionado aos tubos 0,6mL de solução alfa-naftol concentração 5% (Barrit I) e 0,2 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio concentração 40% (Barrit II). Os tubos foram agitados e o resultado foi visto num intervalo de 2h. A positividade se dá pela presença de coloração vermelha.

3.2.4 Teste de hidrólise do Orto-nitrofenil-β – D-Galacto-Piranosídeo (ONPG)

As cepas crescidas em Agar TSA suplementado com 1% NaCl a 35°C por 24 h foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 0,25 mL de solução salina 1% (p/v) de NaCl.

Após, em cada tubo, foi adicionada uma gota de Tolueno (Quimis) e o tubo foi agitado e mantido em repouso por 15 min. Em seguida, a cada tudo, foi adicionada uma alíquota de 0,25 mL da solução de recém-preparada de ONPG. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 h.

3.2.5 Prova da fermentação de carboidratos

As cepas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Caldo Púrpura de Bromocresol ($\text{pH} \pm 7,8$), cada tudo foi separadamente acrescido de manitol, D-glucosamina e arabinose. Após a inoculação os meios foram incubados em estufa a 35°C por até 4 dias. A positividade se dá pela coloração amarela consequência da acidificação resultante do metabolismo dos carboidratos.

3.2.6 Teste de produção do Indol

Cepas crescidas em meio Agar TSA suplementado com 1% NaCl foram semeadas através de picada profunda com auxílio de alça níquel-cromo, em tubos contendo meio SIM (DIFCO) e foram então incubadas em estufa a 35°C por 48h. Após a incubação, foi adicionado aos tubos 0,2 mL do reagente de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído). A positividade ou produção de Indol, resultante do metabolismo do triptofano presente no meio, é observada através da formação de uma camada de coloração vermelha sobre o meio.

3.2.7 Análise morfológica

As estirpes selecionadas foram submetidas a uma etapa de verificação de pureza das culturas através de inóculos em tubos contendo Caldo Triptona Soja suplementado com 1% (p/v) de NaCl (TSB 1%), incubados em estufa bacteriológica (Fanem) a 35°C por 24 h. Após esse período, as cepas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Tiosulfato Bile Sacarose (TCBS) para confirmação da morfologia das colônias (sacarose positivas ou sacarose negativas).

3.2.8 Análise morfotintorial

Cada estirpe teve uma porção semeada em tubos contendo Agar Tripticase Soja adicionado de 1% (p/v) de NaCl (TSA 1%), foram então incubadas em estufa a 35°C por 24 h e, após esse período foram submetidas à técnica de coloração de Gram, descrita por Tortora, Funke e Case (2005), para verificação da homogeneidade celular. As cepas que se apresentaram com morfologia Gram-negativa e como bastonetes ligeiramente curvados foram consideradas do gênero *Vibrio*.

3.3 Verificação da emissão de luminescência

As estirpes foram testadas quanto à emissão de luminescência segundo metodologia adaptada de MacFaddin (1980), que consiste no inóculo das estirpes em meio de cultura próprio à verificação da atividade luminescente. As cepas testadas foram crescidas em tubos contendo 5 mL de TSB 1% e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Após esse período, as cepas foram individualmente semeadas em placas de Petri contendo 15 mL do meio Ágar Luminescência proposto pela *Collection of Aquatic Important Microorganisms* (ANEXO E) e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Depois do período de incubação, em câmara escura, foi emitida sobre as placas uma luz Ultra Violeta durante 30 s para estimular a luminescência das colônias. Os analisadores permaneceram no escuro durante 5 minutos para adaptação dos olhos para o exame das placas. A positividade foi evidenciada pelo brilho azulado das colônias no escuro.

3.4 Efeito dos fatores abióticos sobre a capacidade luminescente

Como descrito no item 3.2, as bactérias passaram por uma prova específica para verificação da capacidade de emissão de luminescência, durante o isolamento, onde somente as que se mostraram positivas foram selecionadas. Assim, as cepas provenientes de hemolinfa e de água de tanque de cultivo experimental de camarões foram submetidas a esses testes de variação de fatores abióticos de modo a se verificar se a emissão ou inibida entre as estirpes já sabidas como bioluminescentes.

3.4.1 Preparo dos inóculos

De culturas crescidas em Agar TSA suplementado com 1% NaCl a 35°C por 24h, uma porção foi retirada e inoculada em tubos contendo 5 mL de meio Caldo Luminescente (CL) (Anexo D) com valores de salinidade e pH ajustados de acordo com as recomendações para cada teste.

3.4.2 Efeitos da temperatura

De culturas crescidas em Agar TSA suplementado com 1% NaCl a 35°C por 24h, uma porção foi retirada e inoculada em tubos contendo 5 mL de meio CL e foram incubados em estufas a temperaturas de 10°C, 20°C e 30°C e incubadas por 48h. Após o período de incubação o teste da capacidade luminescente foi realizado como descrito no item 3.3.

3.4.3 Efeitos da salinidade

De culturas crescidas em Agar TSA suplementado com 1% NaCl a 35°C por 24 h, uma porção foi retirada e inoculada em tubos contendo 5 mL de meio CL com concentrações de NaCl 1 ppm, 30 ppm e 100 ppm (p/v) e incubados em estufa a 35°C por 48 h. Após o período de incubação o teste da capacidade luminescente foi realizado como descrito no item 3.3.

3.4.4 Efeitos do pH

De culturas crescidas em Agar TSA suplementado com 1% NaCl a 35°C por 24 h, uma porção foi retirada e inoculada em tubos contendo 5 mL de meio CL com pH ajustado para valores 4, 7 e 9 e incubados em estufa a 35°C por 48 h. Após o período de incubação o teste da capacidade luminescente foi realizado como descrito no item 3.3.

3.5 Teste para a verificação de produção de indutores de luminescência por estirpes de *Aliivibrio fischeri* em *Vibrio harveyi* (adaptado de BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997)

3.5.1 Preparo dos inóculos de Aliivibrio fischeri

As cepas testadas de *Aliivibrio fischeri* foram crescidas em meio CL e incubadas em estufa a 35°C por 24 h.

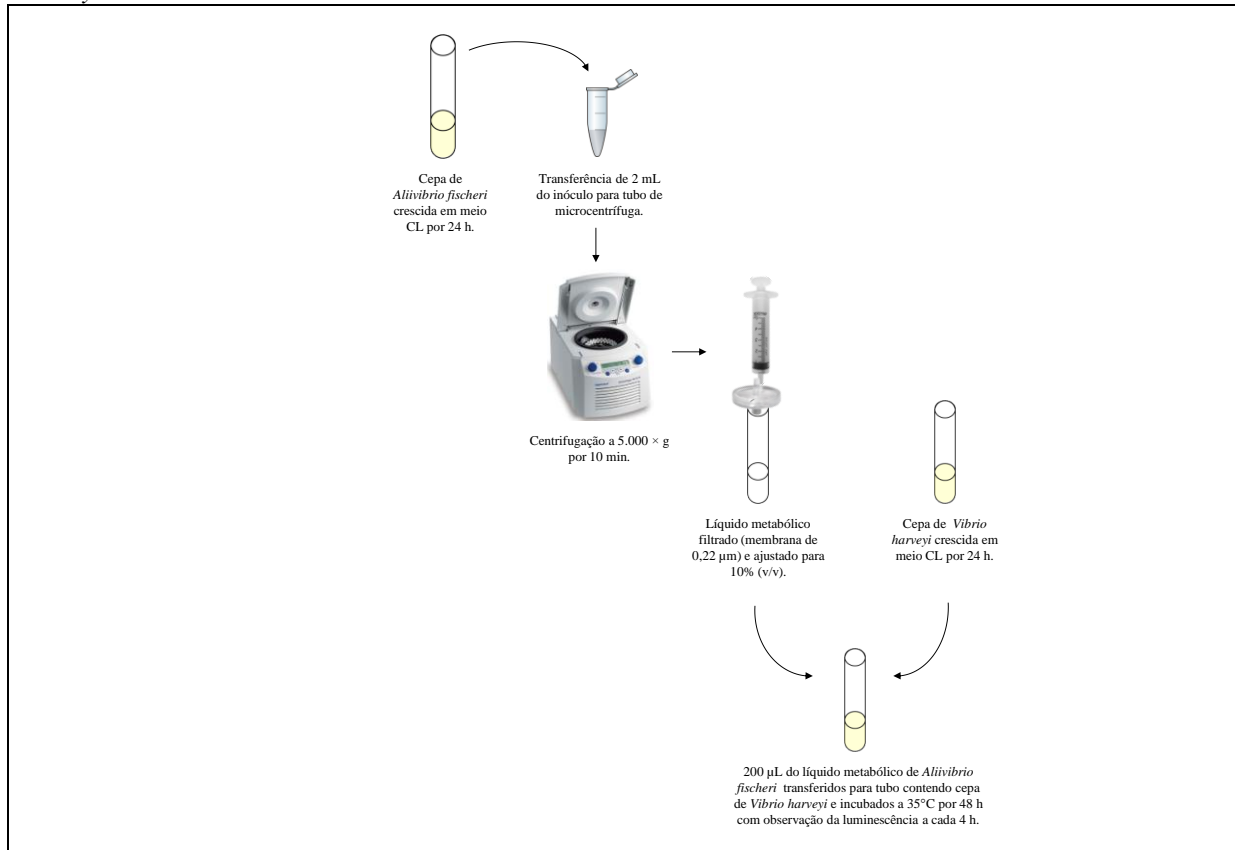
3.5.2 Extração do líquido metabólico

Após o período de incubação, as células de *Aliivibrio fischeri* foram retiradas por centrifugação a $5000 \times g$ durante 10 minutos, seguido pela filtração do fluido através de membrana de celulose com 0,22 μm de poro (Millipore) (Figura 3).

3.5.3 Preparo dos inóculos de Vibrio harveyi

Para verificar a influência sobre a capacidade luminescente, os isolados de *Vibrio harveyi* foram crescidos em tubos contendo 5 mL de meio CL, acrescido do fluido livre de células de *Aliivibrio fischeri* em concentração de 10% do líquido metabólico inicial. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C e os resultados foram observados com auxílio de luz UV, em câmara escura, a cada 8h durante 48h (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma do processo de indução de luminescência por estirpes de *Aliivibrio fischeri* em *Vibrio harveyi*



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1, abaixo, estão listados o número de cepas isoladas e seus respectivos locais de origem. Foram isoladas 53 culturas bacterianas com capacidade de emitir luminescência. As origens das culturas foram diferenciadas: do ambiente de cultivo (hemolinfa de animais cultivados e tanques de cultivo) e das águas dos estuários dos rios Cocó e Pacoti.

Tabela 1 - Identificação e origem das estirpes bacterianas testadas.

Origem	Número de isolados	Codificação
Hemolinfa de camarões cultivados	11	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
Tanque de cultivo de camarão	10	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21
Estuário Rio Cocó	15	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36
Estuário Rio Pacoti	17	37, 38, 39, 40, 42, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53

4.1 Verificação da capacidade luminescente

As estirpes que se apresentaram como bioluminescentes ao serem expostas à luz UV em câmara escura, como mostrado na figura 4, foram selecionadas para os testes posteriores.

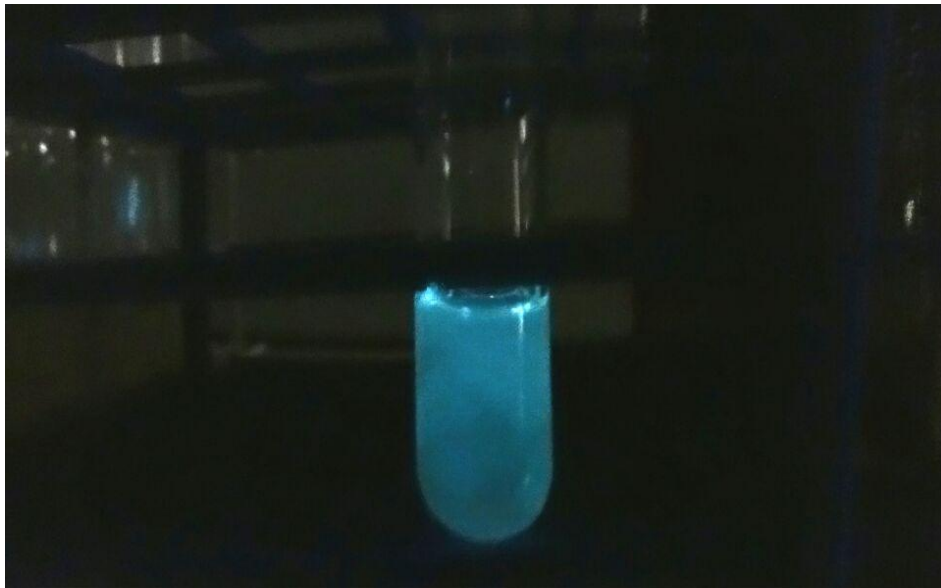
Figura 4 – Imagem demonstrativa da emissão de luminescência das colônias isoladas



4.2 Efeitos dos fatores abióticos

A positividade nos testes foi evidenciada pelo brilho azulado no meio CL, como mostrado na figura 5.

Figura 5 – Imagem demonstrativa do resultado positivo (luminescente) nos testes de fatores abióticos.



Onze estirpes que fazem parte do acervo de bactérias do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LABOMAR-UFC) foram identificadas como *V. harveyi* e estas permaneceram estocadas por um período de 4 anos dado que foram isoladas em estudos anteriores; 10 foram identificadas como pertencentes à espécie *V. coralliilyticus*; 32 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, não sendo identificadas a nível de espécie, sendo aqui identificadas como *Vibrio* sp.

4.3 Efeitos da temperatura

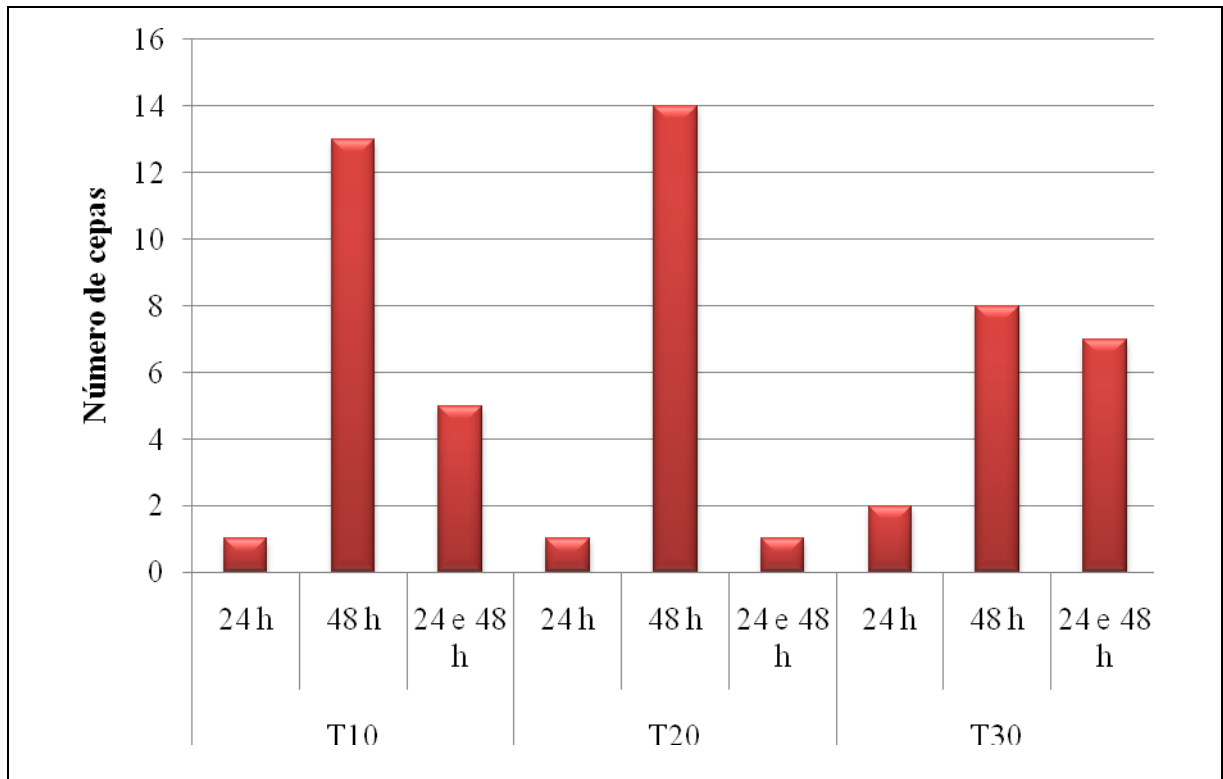
Os resultados da emissão de luminescência entre as estirpes sob as diferentes condições simuladas de temperatura estão apresentadas na tabela 2 e Gráfico 1.

Tabela 2 – Resultados quanto à emissão de luminescência sob incubação em três diferentes condições de temperatura, onde T₁₀ – incubação a 10°C ; T₂₀ – incubação a 20°C ; T₃₀ – incubação 30°C.

Origem	Identificação	Cepa	T ₁₀		T ₂₀		T ₃₀	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	1	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	2	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	3	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	4	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	5	–	–	–	–	–	–

Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	6	-	-	-	-	-	-
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	7	-	-	-	-	-	-
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	8	-	-	-	-	-	-
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	9	-	-	-	-	-	-
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	10	-	-	-	-	-	-
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	11	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	12	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	13	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	14	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	15	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	16	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>V. coralliilyticus</i>	17	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	18	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	19	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	20	-	-	-	-	-	-
Tanque de cultivo	<i>V. coralliilyticus</i>	21	-	-	-	-	-	-
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	22	-	-	-	-	-	-
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	23	-	+	-	+	+	+
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	24	-	+	+	-	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	25	-	+	-	+	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	26	-	-	-	-	-	-
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	27	-	-	-	-	+	-
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	28	-	-	-	-	-	-
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	29	-	+	+	+	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	30	-	+	-	+	+	-
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	31	-	+	-	+	-	+
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	32	-	+	-	+	-	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	33	-	+	-	-	-	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	34	-	+	-	-	-	+
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	35	+	+	-	+	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	36	+	-	+	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	37	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	38	-	+	-	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	39	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>V. coralliilyticus</i>	40	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	41	-	-	-	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	42	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>V. coralliilyticus</i>	43	-	-	-	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	44	-	+	-	+	-	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	45	+	+	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	46	-	+	-	-	-	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	47	-	+	-	+	-	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	48	-	-	-	+	+	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	49	+	+	-	-	-	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	50	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	51	+	+	-	+	+	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	52	+	+	-	+	+	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	53	-	-	-	-	-	-

Gráfico 1 – Número de cepas capazes de emitir luminescência nas diferentes condições de temperatura.



Diferentes temperaturas não influenciaram a emissão de luminescência entre os isolados de *Vibrio* oriundos da hemolinfa de camarões ou dos isolados vindos da água dos tanques de cultivo experimental de camarões.

O total de bactérias que emitiram luminescência a cada temperatura testada foi, respectivamente: a) 19 cepas (35,85% do total de cepas testadas) foram positivas a temperatura de 10°C, onde 1 cepa (5,27% do total de cepas positivas) apresentou positividade após 24h de incubação, 13 cepas (68,43% do total de cepas positivas) apresentaram positividade após 48h de incubação e 5 cepas (26,32% das cepas positivas) apresentaram positividade com 24h e permaneceram luminescentes até 48h; b) 16 cepas (30,19% do total de cepas testadas) foram positivas a temperatura de 20°C, onde 1 cepa (6,25% das cepas positivas) apresentou positividade após 24h de incubação, 14 cepas (87,50% das cepas positivas) apresentaram positividade após 48h de incubação e 1 cepa (6,25% das cepas positivas) apresentou positividade após 24h e permaneceu luminescente até 48h; c) 17 cepas (32,08% do total de cepas testadas) foram positivas a temperatura de 30°C, onde 2 cepas (11,77% das cepas positivas) apresentaram positividade após 24h de incubação, 8 cepas (47,06% das cepas positivas) apresentaram positividade após 48h de incubação e 7 cepas

(41,18% das cepas positivas) apresentaram positividade com 24h e permaneceu luminescente até 48h.

Pode-se observar que as estirpes com melhor desempenho, ou seja, com maior capacidade de expressão de bioluminescência a diferentes valores de temperatura e em ambos os tempos de incubação (24 e 48 horas), foram aquelas isoladas a partir do ambiente estuarino, principalmente do estuário do Rio Pacoti. É sabido que vbrios são bactérias mesófilas, ou seja, tem seu metabolismo otimizado em valores de temperatura na faixa entre 25°C e 35°C, o que torna curioso o fato de o maior número de bactérias testadas terem a emissão de luminescência estimulada em temperatura igual a 10°C, no entanto, este fato pode explicar o por quê do maior número de cepas que emitiram luminescência já nas primeiras 24h de incubo. Nota-se também que nessa temperatura mais baixa, o tempo de incubo foi determinante para a expressão do fenótipo da luminescência. No entanto, Eley (1972) que realizou estudo semelhante em bactéria bioluminescente da espécie *Photobacterium phosphoreum*, verificou que em valores de incubo a 15°C a atividade luminescente apresentou-se mais intensa e, Waters e Lloyd (1985) que avaliaram a influência do NaCl, pH e temperatura em três espécies de bactérias bioluminescentes (*Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum* e *Vibrio fischeri*, atualmente nomeado como *Aliivibrio fischeri*) também constataram crescimento e emissão de luminescência em baixos valores de temperatura iguais a 15°C e 10°C.

Processos inibitórios de luminescência foram observados em cepas anteriormente capazes de emitir luminescência e até mesmo naquelas que se mostraram luminescentes após 24h e perderam essa capacidade com 48h de incubo, tendo como exemplo a temperatura de incubo igual a 10°C, a perda da capacidade bioluminescente foi observada nas cepas de 1 a 21 e, a capacidade bioluminescente observada com 24h sendo perdida após 48h de incubo ocorreu na cepa 36. Por outro lado, o efeito estimulante também foi observado, uma vez que cepas que não se mostraram luminescentes em 24h o foram após 48h de incubo. Ainda como exemplo a temperatura de incubo igual a 10°C, isso foi observado nas cepas 22, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 44 e 47. Isso pode estar relacionado com o fenmeno do *quorum-sensing*, onde  necessário haver uma determinada densidade de células para são então haver a bioluminescência, densidade essa que deve ter sido suficiente após 48h de incubo.

4.4 Efeitos da salinidade

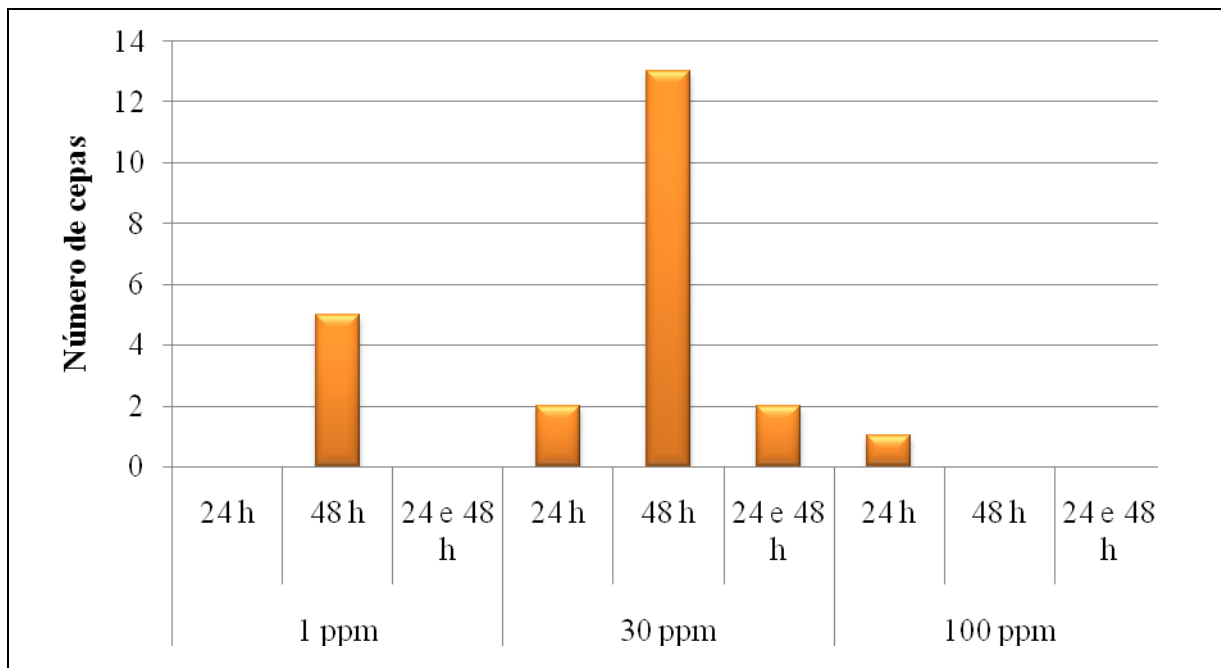
Os resultados da emissão de luminescência entre as estirpes expostas a diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) estão apresentados na Tabela 3 e Gráfico 2.

Tabela 3 – Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a emissão de luminescência entre cepas de *Vibrio*.

Origem	Identificação	Cepa	NaCl 1‰		NaCl 30‰		NaCl 100‰	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	1	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	2	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	3	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	4	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	5	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	6	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	7	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	8	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	9	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	10	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	11	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp..	12	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	13	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	14	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	15	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	16	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>V. coralliilyticus</i>	17	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	18	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	19	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	20	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>V. coralliilyticus</i>	21	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	22	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	23	–	–	+	–	+	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	24	–	–	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	25	–	+	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	26	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	27	–	–	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	28	–	–	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	29	–	+	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	30	–	–	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	31	–	+	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	32	–	–	–	+	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	33	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	34	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	35	–	–	+	+	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	36	–	–	–	+	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	37	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	38	–	–	–	–	–	–

Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	39	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>V. coralliilyticus</i>	40	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	41	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	42	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>V. coralliilyticus</i>	43	-	-	-	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	44	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	45	-	-	-	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	46	-	+	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	47	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	48	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	49	-	-	+	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	50	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	51	-	-	-	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	52	-	+	+	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	53	-	-	-	+	-	-

Gráfico 2 – Número de cepas capazes de emitir luminescência às diferentes condições de salinidade.



O total de bactérias que emitiu luminescência a cada valor de salinidade testado foi, respectivamente: a) 5 cepas (9,44% do total de cepas testadas) foram positivas a salinidade em concentração de 1 ppm, onde as 5 cepas que se mostraram positivas o foram somente após 48h de incubação; b) 17 cepas (30,08% do total de cepas testadas) foram positivas a salinidade em concentração de 30 ppm, onde 2 cepas (11,77% das cepas positivas) apresentaram positividade após 24h de incubação, 13 cepas (76,48% das cepas positivas) apresentaram positividade após 48h de incubação e 2 cepas (11,77%) das cepas positivas)

apresentaram positividade após 24h e permaneceram luminescentes até 48h; c) 1 cepa (1,89% do total de cepas testadas) foi positiva a salinidade de 100 ppm, onde, essa cepa que se mostrou positiva o foi após 24h de incubação no entanto, a bioluminescência foi ausente após 48h de incubação.

Pode-se observar que o maior número de cepas com melhor desempenho, ou seja, com maior capacidade de expressão de bioluminescência a diferentes valores de salinidade e em ambos os tempos de incubação (24 e 48 horas), foram, novamente, aquelas isoladas a partir do ambiente estuarino, no entanto, neste teste a maior quantidade de cepas positivas proveio do estuário do Rio Cocó, diferentemente do observado quanto à temperatura.

É sabido que bactérias do gênero *Vibrio* são levemente halófilas, ou seja, tem seu crescimento otimizado em concentrações de NaCl entre 25 e 30 ppm, logo o resultado obtido é o esperado uma vez que as emissões de luminescência foram maiores no valor considerado ótimo ao metabolismo das bactérias teste. Waters e Lloyd (1985) constataram em seu estudo a emissão de luminescência em variadas concentrações de NaCl (baixas e altas). Eley (1972) também constatou a mais eficiente emissão de luminescência da bactéria *Photobacterium phosphoreum* em concentração de NaCl igual a 30 g.L⁻¹ e, Leite (2011) concluiu que, juntamente com a temperatura, a salinidade do meio é fator determinante na capacidade bioluminescente de bactérias marinhas.

De modo semelhante ao observado quanto à temperatura, pode-se perceber a ação inibidora da salinidade sobre a capacidade bioluminescente uma vez que cepas que emitiram luminescência após 24h de incubação perderam essa capacidade após 48h. Isso pode ser explicado pela atividade metabólica das bactérias, como proposto por Waters e Lloyd (*op. cit.*), que observaram que após 48h de incubação havia uma diminuição da capacidade luminescente acompanhada pela elevação do pH e diminuição da concentração de NaCl no meio. O contrário também foi observado, cepas que não emitiram luminescência após 24h de incubação foram positivas após 48h. Novamente, o fenômeno do “*quorum-sensing*” pode ser usado para explicar este resultado.

4.5 Efeitos do pH

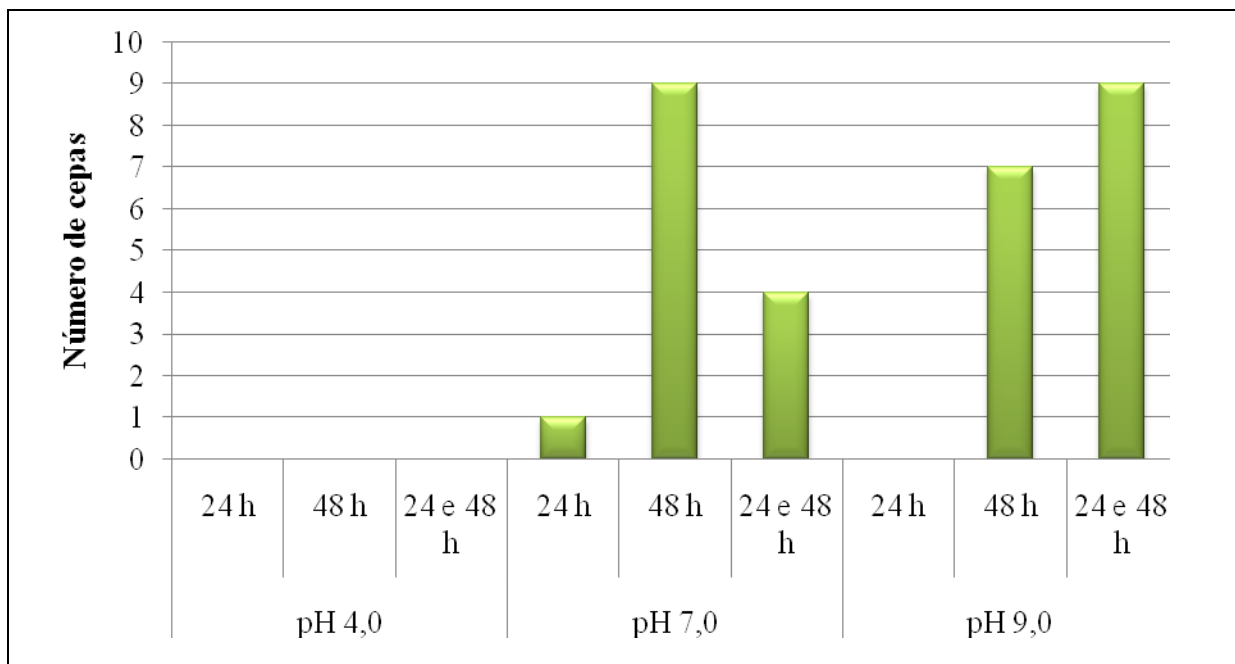
Os resultados da emissão de luminescência entre as estirpes expostas a diferentes valores de pH estão apresentados na Tabela 4 e Gráfico 3.

Tabela 4 – Efeito do pH sobre a emissão de luminescência entre cepas de *Vibrio*.

Origem	Identificação	Cepa	pH 4		pH 7		pH 9	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	1	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	2	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	3	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	4	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	5	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	6	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	7	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	8	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	9	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	10	–	–	–	–	–	–
Hemolinfa	<i>V. harveyi</i>	11	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp..	12	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	13	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	14	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	15	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	16	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>V. coralliilyticus</i>	17	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	18	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	19	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>Vibrio</i> sp.	20	–	–	–	–	–	–
Tanque de cultivo	<i>V. coralliilyticus</i>	21	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	22	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	23	–	–	–	+	–	+
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	24	–	–	–	+	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	25	–	–	–	–	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	26	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	27	–	–	–	+	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	28	–	–	–	–	–	–
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	29	–	–	–	–	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	30	–	–	–	–	–	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	31	–	–	–	+	–	+
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	32	–	–	–	–	+	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	33	–	–	–	–	–	+
Rio Cocó	<i>Vibrio</i> sp.	34	–	–	–	–	–	+
Rio Cocó	<i>V. coralliilyticus</i>	35	–	–	–	+	+	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	36	–	–	–	+	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	37	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	38	–	–	–	+	+	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	39	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>V. coralliilyticus</i>	40	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	41	–	–	–	+	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	42	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>V. coralliilyticus</i>	43	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	44	–	–	–	–	–	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	45	–	–	–	+	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	46	–	–	–	–	–	–
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	47	–	–	+	–	+	+

Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	48	-	-	+	+	-	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	49	-	-	+	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	50	-	-	-	-	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	51	-	-	+	+	-	-
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	52	-	-	+	+	+	+
Rio Pacoti	<i>Vibrio</i> sp.	53	-	-	-	-	-	-

Gráfico 3 – Número de cepas capazes de emitir luminescência nas diferentes condições de pH.



O total de bactérias que emitiu luminescência a cada valor testado de pH foi: nenhuma cepa emitiu luminescência em valor de pH igual a 4 em qualquer dos intervalos de incubação; 14 cepas (26,42% do total de cepas testadas) foram positivas em valores de pH 7, onde 1 cepa (7,15% das cepas positivas) apresentou positividade após 24h de incubação; 9 cepas (64,29% das cepas positivas) foram positivas após 48h de incubação e 4 cepas (28,58% das cepas positivas) foram positivas após 24h de incubação e permaneceram luminescentes até 48h; 14 cepas (26,42% do total de cepas testadas) foram positivas em valores de pH 9, onde não houve cepas positivas após 24h de incubação, 5 cepas (35,72% das cepas positivas) foram positivas após 48h de incubação e 9 cepas (64,29% das cepas positivas) foram positivas após 24h de incubação e permaneceram luminescentes até 48h.

Pode-se observar que houve igual quantidade de cepas capazes de emitir luminescência dentre aquelas isoladas dos estuários do Rio Cocó e do Rio Pacoti, mostrando

novamente que essa habilidade é mais fortemente expressa em estirpes isoladas do ambiente natural.

Víbrios são bactérias que habitam ambientes marinhos e estuarinos, no primeiro, o pH geralmente varia de 7,4 a 8,5; já no ambiente estuarino, esse parâmetro sofre alterações bem maiores tanto sazonais quanto diárias e, embora estejam adaptadas a essas alterações, vibrios tem seu metabolismo otimizado em pH próximos ao alcalino (entre 7,5 e 8,5), o que pode explicar o estímulo da bioluminescência nos valores 7 e 9 testados.

4.6 Verificação de produção de indutores de luminescência por estirpes de *Aliivibrio fischeri* em *Vibrio harveyi* (adaptado de BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997).

As cepas de *Vibrio* foram submetidas a crescimento em meio de cultura CL com a posterior adição de líquido metabólico de *A. fischeri*. Após 48 horas de incubação, não foi verificada a emissão de luminescência das estirpes testadas, significando que a presença de indutores no meio não representou um gatilho eficiente para estimular a emissão de luminescência. As estirpes usadas como teste nesta prova foram aquelas menos eficientes quanto à emissão de luminescência nas provas de fatores abióticos.

5 CONCLUSÃO / CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros avaliados neste estudo mostraram significativa influência sobre a capacidade bioluminescente das estirpes de *Vibrio* testadas, sendo os valores mais estimulantes a essa emissão, os próximos aos encontrados no ambiente natural. As combinações dos parâmetros testados: temperatura, salinidade e pH que mais estimularam a capacidade bioluminescente foram temperatura 10°C, salinidade 30 ppm e pH 7, e, a que mais inibiu foi: temperatura 20°C, salinidade 100 ppm e pH 4.

O fenômeno do *quorum-sensing* não mostrou significância no estímulo da bioluminescência no teste de auto-indução no entanto, parece ter atuado sobre os testes de efeitos abióticos, uma vez que num maior tempo de incubação as cepas que não haviam emitido luminescência, o fizeram.

Quanto às cepas identificadas, 11 foram pertencentes à espécie *V. harveyi*; 10 foram identificadas como pertencentes à espécie *V. coralliilyticus*; 32 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, não sendo identificadas a nível de espécie.

Ambientes estuarinos são muito dinâmicos e muitos são os fatores que influenciam essa dinâmica, como variações de maré e correntes, clima e atividades antrópicas presentes no local, sendo as comunidades bacterianas um reflexo das condições desse local, estudos pontuais se fazem necessários ao entendimento de sua distribuição e identificação.

Um maior espaço de tempo e um maior número de coletas poderiam ampliar o entendimento a respeito das estruturas das comunidades microbianas luminescentes presentes em ambientes costeiros, uma vez que esse grupo vem sendo amplamente aplicado em vários ramos da ciência.

REFERÊNCIAS

- AST, J. C.; URBANCZYK, H.; DUNLAP, P. V. Multi-gene analysis reveals previously unrecognized phylogenetic diversity in *Aliivibrio*. **Systematic and Applied Microbiology**. v.32. n.6. pp.379-386. 2009.
- BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W.; FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KUHN, I.; MOLLBY, R.; BRUSCOLINI, F.; DONELLI, G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65. pp. 2748–2753. 1999.
- BASSLER, B. L.; GREENBERG, E. P.; STEVENS, A. M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. **Journal of Bacteriology**. v. 179. pp. 4043–45. 1997.
- BEAZ-HIDALGO, R.; DOCE, A.; BALBOA, S.; BARJA, J. L.; ROMALDE, J. L. *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov., isolated from Manila clam, *Ruditapis philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60. pp. 223-228. 2010.
- CHATTERJEE, J.; MEIGHEN, E.A. Biotechnical applications of bacterial bioluminescence (lux) genes. **Photochemical Photobiology**. v. 62. pp. 641–650. 1995.
- CHATTERJEE, J.; MEIGHEN, E. A. Biotechnical applications of bacterial bioluminescence (lux) genes. **Photochemical Photobiology**. v. 62. pp. 641–650. 1995.
- COSTA, R. A. Pesquisa de *Vibrio* no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado do Ceará. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Curso de Mestrado do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 2006.
- CZYZ, A.; PLATA, K.; WERGRZYN, G. Stimulation of DNA repair as an evolutionary drive for bacterial bioluminescence. **Luminescence**. v. 18. pp 140-144. 2003
- DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Disponível em: <http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Vibrio>. Acesso em: 11 de junho de 2013.
- DUNLAP, P. V. Bioluminescence, microbial. **The Desk Encyclopedia of Microbiology** (Schaechter M, ed.). Elsevier, Oxford. pp. 202–218. 2009.
- DUNLAP, P. V. Microbial bioluminescence, in: M. Schaechter (Ed.), **Encyclopedia of Microbiology**. Elsevier. Amsterdam. 3rd ed. pp. 45–61. 2009.
- DUNLAP, P. V.; GREENBERG, E. P. Role of intercellular chemical communication in the *Vibrio fischeri*-monocentrid fish symbiosis. In **M. Dworkin** (ed.), *Microbial cell-cell interactions*. p. 219-253. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1991.

ELEY, M. H. Optimal environmental conditions and nutrient concentrations for the synthesis of bacterial luciferase in *Photobacterium phosphoreum*. **Journal of Genomic Microbiology**. v. 72. pp. 415-417. 1972.

FARGHALY, A. H. Factors influencing the growth and light production of luminous bacteria. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**. v. 36. pp. 165-184. 1950.

FARMER III, J. J. The Family *Vibrionaceae*,. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.). **The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, and applications**. 2nd ed. pp. 2938–2951. Berlin, Germany. 1992.

FARMER III, J. J.; JANDA, M.; BRENNER, F. W.; CAMERON, D. N.; BIRKHEAD, K. M. Genus I. *Vibrio Pacini* 1854, 411^{AL}. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd 530 edn, v.2 The Proteobacteria, Part B The Gammaproteobacteria, New York, Springer, pp. 494-546. 2005.

FIDOPIASTIS, P. M.; VON BOLETZKY, S.; RUBY, E.G. A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiola*. **Journal of Bacteriology**. v. 180. pp. 59–64. 1998

FUKAWASA, S.; DUNLAP, P. Identification of luminous bacteria isolated from the light organ of the squid *Doryteuthis kensaki*. **Agriculture and Biological Chemistry**. v. 50. pp. 1645–1646. 1986.

GREENBERG, E. P; HASTINGS, J. W.; ULITZER, S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. **Archives of Microbiology**. v. 120. pp. 87–91. 1979.

GRISEZ, L.; REYNIERS, J.; VERDNOCK, L.; SWINGS, J.; OLLEVIER, F. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae from two hatcheries, during larval development. **Aquaculture**. v. 155. pp. 387–399. 1997.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F.; TRON-MAYEN, L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**. v. 163. pp. 1–9. 1998.

HADDOCK, S. H. D.; CASE, J.F. Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: ctenophores, medusae and siphonophores. **Marine Biology**. v. 133. pp. 571–82. 1999.

HANZELKA, B. L.; GREENBERG, E. P. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. **Journal of Bacteriology**. v. 177. pp. 815–817. 1995.

HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. **Journal of Bacteriology**. v. 181. pp. 2667–2668. 1999.

HASTINGS, J. W.; NEALSON, K. H. Bacterial bioluminescence. **Annual Reviews Microbiology**. v. 31. pp. 549-595. 1977.

HEDLUND, B. P.; STALEY, J. T. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51. pp. 61–66. 2001.

HEIDELBERG, J. F.; HEIDELBERG, K.B.; COLWELL, R. R. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68. pp. 5488–5497. 2002.

HERRING, P. J. The spectral characteristics of bioluminescent marine organisms. **Proceedings of the Royal Society of London B**. v. 220. pp. 183–217. 1983

HERRING, P. J.; WIDDER, E. A. Bioluminescence. In **Encyclopedia Of Ocean Science**, ed. JH Steele, SA Thorpe, KK Turekian, v.1. pp. 308–317. San Diego: Academic. 2001.

JOHNSEN, S.; WIDDER, E. A.; MOBLEY, C. Propagation and perception of bioluminescence: factors affecting counterillumination as a cryptic strategy. **Biology Bulletin**. v. 207. pp 1–16. 2004.

KAPLAN, H. B.; GREENBERG, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **Journal of Bacteriology**. v. 163. pp. 1210–1214. 2005.

LATZ, M. I.; FRANK, T. M.; CASE, J. F. Spectral composition of bioluminescence of epipelagic organisms from the Sargasso sea. **Marine Biology**. pp. 441-446. 1988.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; BATICADOS, M. C. L.; CRUZ-LACIERDA, E. R.; DE LA PENA, L. D. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture**. v. 91. pp. 1–13. 1990.

LEITE, B. R. **Isolamento e identificação de bactérias bioluminescentes de animais e de ambientes naturais de Imbé e Tramandaí, litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. 83 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RG. 2011.

MADIGAN, M. T. *et al.* Cap. 9: Regulação da Expressão Gênica. In____. Microbiologia de Brock. Tradução Andrea Queiroz Maranhão *et al.* 12. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2a ed. Willians & Wilkins. Baltimore. pp. 527. 1980.

MCFALL-NGAI, M. J.; RUBY, E. G. Symbiont recognition and subsequent morphogenesis as early events in an animal-bacterial mutualism. **Science**. v. 254. pp.1491–94. 1991.

MEIGHEN, E. A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. **Microbiology Reviews**. v. 55. pp. 123-142. 1991.

- NEALSON, K. H.; HASTINGS, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. **Microbiology Reviews**. v. 43. pp. 496-518. 1979.
- NOGUEROLA, I.; BLANCH, A. R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105. pp. 175–185. 2008.
- NUNES-HALLDORSON, V. da S.; DURAN, N. L. Bioluminescent bacteria: genes lux as environmental biosensors. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. v. 34. n. 2. pp. 91-96. 2003.
- RAMESH, A.; LOGANATHAN, B.G; VENUGOPALAN, V.K. Seasonal distribution of luminous bacteria in the sediments of a tropical estuary. **Journal of Genomic and Applied Microbiology**. v. 35. pp. 363–368. 1989.
- ROSENBERG, E.; BEN-HAIM, Y. Microbial diseases of corals and global warming. **Environmental Microbiology** v. 4. pp. 318–326. 2002.
- RUBY, E. G.; MCFALL-NGAI, M. J. A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. **Journal of Bacteriology**. v. 174. pp.4865–4870. 1992
- RUBY, E. G.; NEALSON, K. H. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore sea water. **Limnology Oceanography**. v. 23. pp. 530-533. 1978.
- SAWABE, T.; N. SETOGUSHI, N.; INOUE, S.; TANAKA, R.; OOTSUBO, M.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y. Acetic acid production of *Vibrio halioticoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone-*V. halioticoli* association. **Aquaculture**. v. 219. pp. 671–679. 2003.
- SELVIN, J.; HUXLEY, A. J.; LIPTON, A. P. Pathogenicity, antibiogram and biochemical characteristics of luminescent *Vibrio harveyi*, associated with ‘black shell disease’ of *Penaeus monodon*. **Fishery Technology** v. 42. pp. 191-196. 2005.
- SHIMOMURA, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. **Singapore: World Scientific**. pp. 500. 2006.
- SAE-OUI, D.; TUNSUTAPANIT, A.; RUANGPAN, L. *Vibrio harveyi*, a causative agent of marine shrimp *Penaeus merguensis* larvae. In : Limsuwan C et al. (eds) “Shrimp Disease and Chemotherapy”. Kasetsart Univ. Press, Bangkok. pp 1-8. 1987.
- SUGUMAR, G.; NAKAI, T.; HIRATA, Y.; MATSUBARA, D.; MUROGA, K. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. **Diseases of Aquatics Organisms**. v. 33. pp. 111-118. 1998.
- SUNARYANTO, A.; MARIAM, A. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. **Bulletin of the Brackish Water Aquaculture**. v. 8. pp. 105-112. 1986.
- THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 68(3). pp. 403–431. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed. 894 p. 2005.

ULITZUR, S. Established technologies and new approaches in applying luminous bacteria for analytical purpose. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**. v. 12. pp. 179–192. 1997.

URAKAWA, H.; YOSHIDA, T.; NISHIMURA, M; OHWADA, K. Characterization of depth- related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinine profiling. **Environmental Microbiology** v. 2. pp. 542–554. 2000.

VANDENBERGHE, J.; LI, Y.; VERDONCK, L.; LI, J.; SORGELOS, P.; XU, H. S.; SWINGS, J. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. **Aquaculture**. v. 169. pp. 121–132. 1998.

VANDENBERGHE, J.; THOMPSON, F. L.; GOMEZ-GIL, B.; SWINGS, J. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. **Aquaculture**. v. 219. pp. 9–20. 2003

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Rev.** v. 64. pp. 655–671. 2000.

WAI, S. N.; MIZUNOE, Y.; YOSHIDA, S. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. **FEMS Microbiology Letters**. v. 180. pp. 123–131. 1999.

WATERS, P.; LLOYD, D. Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analysed on gradient plates. **Journal of Genomic Microbiology**. v. 131. pp. 2865–2869. 1985.

WIDDER, E. A. in **Adaptive Mechanisms in the Ecology of Vision**, S. N. Archer, M. B. A. Djamgoz, E. Loew, J. C. Partridge, S. Vallerga, Eds. (Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands), pp. 555–581. 1999.

WIDDER, E. A. Bioluminescence in the ocean: Origins of biological, chemical, and ecological diversity. **Science**. v. 328. pp. 704–708. 2010.

YANG, Y.; YAH, L. P.; CAO, Y.; BAUMANN, L.; BAUMANN, P.; TANG, J. S.; BEAMAN, B. Characterization of marine luminous bacteria isolated off the coast of China and description of *Vibrio orientalis* sp. nov. **Current Microbiology**. v.8. pp. 95–100. 1983.

YOSHIZAWA, S.; WADA, M.; KITA-TSUKAMOTO, K.; YOKOTA, A.; KOGURE, K. *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 59. pp. 1438–1442. 2009.

YOSHIZAWA, S.; KARATANI, H.; WADA, M.; YOKOTA, A.; KOGURE, K. *Aliivibrio sifiae* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from seawater. **Journal of Genomic and Applied Microbiology**. v. 56. pp. 509–518. 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Ágar Trypticase Soja suplementado com 1% de NaCl (TSA 1%)

Ágar Trypticase Soja.....	40 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10 g
Água destilada.....	1000 mL

Para cada 1000 mL de água destilada, foram acrescentados 40g de Ágar Trypticase Soja (Difco) e 10g de cloreto de sódio (Vetec). O pH foi ajustado para 8. O meio foi posteriormente fundido para a sua total solubilização e distribuído em tubos de ensaio no volume de 5mL. O meio foi então esterilizado em autoclave, em temperatura de 121°C por 15 minutos. Após a esterilização os tubos foram inclinados com auxílio de rampas. Após a solidificação do Ágar, o meio foi estocado em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS

ANEXO B – Caldo Triptona Soja suplementado com 1% de NaCl (TSB 1%).

Caldo Triptona Soja.....	30 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10 g
Água destilada.....	1000 mL

Para cada 1000 mL de água destilada foram adicionados 30 g de Caldo Triptona Soja (Difco) suplementado com 10 g de cloreto de sódio (Vetec). O pH foi ajustado para 8. O meio foi distribuído em tubos de ensaio no volume de 5 mL e, posteriormente, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, foi armazenado em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS

ANEXO C – Meio para verificação de luminescência adaptado de MacFaddin (1980).

Peptona.....	20 g
Triptona.....	10 g
Fosfato de potássio bibásico.....	1,5 g
Sulfato de magnésio.....	0,73 g
Glicerol.....	10 g
Ágar.....	15 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10 g
Água destilada.....	1000 mL

À água destilada foram adicionados os demais ingredientes. O pH do meio foi ajustado para 8. O meio foi fervido para total solubilização dos componentes e, posteriormente, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis no volume de 15 mL. Após a solidificação do Ágar, as placas foram armazenadas em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS**ANEXO D – Caldo para verificação de emissão de luminescência**

Peptona.....	20 g
Triptona.....	10 g
Fosfato de potássio bibásico.....	1,5 g
Sulfato de magnésio.....	0,73 g
Glicerol.....	10 g
Cloreto de sódio.....	10 g
Água destilada.....	1000 mL

À água destilada foram adicionados os demais ingredientes. O meio teve seu pH ajustado para 8 e foi distribuído em tubos de ensaio no volume de 5 mL. Foi posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e, após a esterilização foi armazenado em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS

ANEXO E – Meio de cultura para verificação de produção de luminescência

Peptona.....	20 g
Triptona.....	10 g
Fosfato de potássio bibásico.....	1,5 g
Sulfato de magnésio.....	0,73 g
Glicerol.....	10 g
Cloreto de sódio.....	10 g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1000 mL

À água destilada foram adicionados os demais ingredientes. O pH do meio foi ajustado para 8. O meio foi fervido para total solubilização dos componentes e, posteriormente, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis no volume de 15 mL. Após a solidificação do Ágar, as placas foram armazenadas em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS

ANEXO F – Meio de cultura para verificação da capacidade luminescente segundo CAIM (Collection of Aquatic Important Microorganisms)

NaCl.....	30 g
K ₂ HPO ₄	3.9 g
KH ₂ PO ₄	2.1 g
NH ₄ Cl.....	5 g
Extrato de levedura.....	5 g
Triptona.....	5 g
Tampão Tris 1M pH 7,5.....	50 mL
Glicerol.....	3 mL
MgSO ₄ x 7 H ₂ O.....	1 g
KCl.....	0,75 g
CaCO ₃	1 g
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	1000 mL

À água destilada foram adicionados os demais ingredientes. O meio foi fervido para total solubilização dos componentes e, posteriormente, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis no volume de 15 mL. Após a solidificação do Ágar, as placas foram armazenadas em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS**ANEXO G – PREPARO DO CORANTE CRISTAL VIOLETA (2%) PARA COLORAÇÃO DE GRAM**

- Solução A:

Cristal violeta (85% puro).....2 g

Álcool etílico (95%).....20 mL

- Solução B:

Oxalato de amônio.....0,8 g

Água destilada.....80 mL

As soluções A e B foram misturadas e armazenadas em frasco de cor âmbar, em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS**ANEXO H – PREPARO DO CORANTE LUGOL PARA COLORAÇÃO DE GRAM**

Iodo cristalizado.....	1 g
Iodeto de potássio.....	2 g
Água destilada.....	300 mL

Os reagentes foram misturados e armazenados em frasco de cor âmbar, em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.

ANEXOS**ANEXO I – PREPARO DO CORANTE SAFRANINA (025%) PARA COLORAÇÃO DE GRAM**

Safranina (2,5% em álcool a 96%).....10 mL
Água destilada.....100 mL

Os reagentes foram misturados e armazenados em frasco de cor âmbar, em geladeira a temperatura aproximada de 4°C.