# MARINHA DO BRASIL

## INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA

## UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

### PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS GRADUÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA – PPGBM IEAPM/UFF


## ALINE DA SILVA CÂMARA


# AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A BACTÉRIA MARINHA *Pseudomonas fluorescens* E A MICROALGA *Isochrysis galbana* E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO NA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM ÁGUA DE LASTRO


**ARRAIAL DO CABO**

**2018**

# MARINHA DO BRASIL

## INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA

## UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

### PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS GRADUÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA – PPGBM IEAPM/UFF

## ALINE DA SILVA CÂMARA


# AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A BACTÉRIA MARINHA *Pseudomonas fluorescens* E A MICROALGA *Isochrysis galbana* E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO NA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM ÁGUA DE LASTRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira/Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

**Orientador:** Dr. Lohengrin Dias A. Fernandes

**ARRAIAL DO CABO**

**2018**

**INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA**

**Diretora:** Eliane Gonzalez Rodriguez

**SUPERINTENDÊNCIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**Superintendente de Pós-graduação:** Maria Helena C. B. Neves

**Coordenador:** Ricardo Coutinho

**Departamento de Biotecnologia Marinha**

Divisão de Bioncrustação e Bioinvasão

Laboratório de Microbiologia e Citometria

Rua Kioto, 253 – Praia dos Anjos

CEP 28930-000 - Arraial do Cabo, Rio de Janeiro – Brasil

Telefone (22) 2622-9090

www.ieapm.mar.mil.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**Reitor:** Sidney Luiz de Matos Mello

**Vice Reitor:** Antônio Claudio Lucas de Nobrega

**Coordenador:** Renato Crespo

**ARRAIAL DO CABO**

**2018**

# FICHA CATALOGRÁFICA

C172 Câmara, Aline da Silva

Avaliação da interação entre a bactéria marinha *Pseudomonas fluorescens* e a microalga *Isochrysis galbana* e a utilização da técnica de citometria de fluxo na detecção de bactérias presentes em água de lastro/ Aline da Silva Câmara – Arraial do Cabo, 2018. 53p.: 13il.

.

Orientador: Lohengrin Dias de Almeida Fernandes.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Marinha) – IEAPM/UFF, 2018.

1. *Pseudomonas fluorescens* 2. *Isochrysis galbana*. 3. Agua de lastro 4.Citometria de fluxo 5. Bioinvasão
I. Fernandes, Lohengrin Dias de Almeida. II. Título.

CDD: 577.18

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IEAPM

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado defendida por **Aline da Silva Câmara** e aprovada em _____de _____ de _____ pela banca examinadora constituída pelos doutores:

_____
Prof. Dr. Lohengrin Dias A. Fernandes – (Orientador)

_____
Prof. Dr Flávio da Costa Fernandes (Titular interno)

_____
Profa. Dra. Marinella Silva Laport (Titular externo)

_____
Profa.Dra. Maria Helena C. Baeta Neves(Suplente)

**ARRAIAL DO CABO**

**2018**

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais, Josiane e Rovani, que sempre me incentivaram e apoiaram nas minhas escolhas pessoais e profissionais, por todo esforço realizado ao longo da minha vida e principalmente durante esses dois anos, me proporcionando condições para que eu alcançasse meus objetivos e conquistasse cada sonho. Amo vocês!

# AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pois sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais e minha irmã, por terem sido meu suporte e porto seguro. Por terem aturado minhas mudanças de humor e meus dias antissociais, quando eu quase não saia do quarto. Só vocês sabem como os dias foram exaustivos e por isso agradeço muito a paciência. Pelo carro que vocês praticamente me deram para que meus dias fossem menos longos na volta pra casa. Pelos sacrifícios que vocês estão sempre dispostos a fazer e pela dedicação ao longo da minha vida. Amo vocês.

A minha família, tios, primos, avós, por proporcionarem sempre boas risadas, ótimas festas de casamento, foram 4 em dois anos. Por todo apoio e incentivo a minha vida profissional e pessoal.

Ao meu namorado Vinícius, por ter sido meu porto seguro mesmo quando estava a milhas e milhas de distância de mim e tudo ainda estava no início. Por todo interesse e apoio a minha carreira. Por ter aturado minhas crises de choro e desespero, meu mau humor repentino e a maldita TPM triplamente fortificada nessa reta final (desculpa amor). Por me incentivar a crescer cada vez mais em tudo e me proporcionar momentos inesquecíveis. Muito obrigada amor, você foi fundamental nesses momentos finais. Te amo!

As minhas amigas, Marianne e Janaína. Deus foi muito bom comigo quando me permitiu encontrar minhas irmãs de mães diferentes. Obrigada por todos os momentos compartilhados até aqui. Por todo riso e choro. Por vivermos juntas a experiência maravilhosa/suicida de fazer um mestrado. Pelos momentos de alegria e os de dor também. Vocês sempre presente. Obrigada por terem me ensinado muito durante nossos anos no LEMAM (Lab. de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental). Vocês fazem parte de tudo o que conquistei até aqui.

Minha galera do Plâncton. Minha família no IEAPM. Thiago (Titi), Márcio, Debora e Pedro. Obrigada pela amizade, união, pelas risadas e apoio. Por me aguentarem nos dias de estresse (principalmente meu estagiário Pedro, ele sofreu) e aturarem minhas mudanças de humor. Por todas as histórias vividas e pela amizade fortalecida a cada dia. Eu não poderia estar num grupo melhor.

Ao meu amigo Marcio Tenório, por ter me proporcionado muitas risadas diariamente no inicio de tudo. Por ter sido “paciente e amável” daquele seu jeitinho, mesmo quando eu perguntava a mesma coisa vinte vezes. Obrigada por ter me ensinado a operar o citômetro, pelas horas infinitas que passou em pé, tirando as benditas bolhas e em busca do alinhamento perfeito. Pelas vezes que saíamos do laboratório tarde da noite, exaustos. Sou muito grata pelos ensinamentos e conselhos. Muito obrigada. Você faz muita falta na nossa sala.

Aos meus amigos do LEMAM, aos professores e colegas de laboratório. Ao meu ex-orientador Victor, por ter me proporcionado o primeiro contato com o mundo da ciência, quando me selecionou para o LEMAM, foi lá que tive certeza que era isso que eu queria fazer pro resto da vida. Obrigada amigos.

A todos os gestores e professores do PPGBM, que me proporcionaram muito conhecimento e aprendizado e aos colegas de turma que também encararam essa batalha.

Ao IEAPM, pela estrutura disponibilizada e por me proporcionar trabalhar com pesquisadores de alto nível.

Aos membros da banca, Dra. Marinella Laport da UFRJ, por aceitar o meu convite e ao Dr. Flávio Fernandes e Dra. Maria Helena do IEAPM, por aceitarem e por terem colaborado de várias maneiras para que eu chegasse até aqui.

Por último, mas não menos importante, ao meu orientador, chefe e amigo Lohengrin. Eu não poderia ter sido mais abençoada. Deus me deu simplesmente o melhor orientador que alguém pode ter nessa vida. Eu só posso dizer que tudo o que sou profissionalmente hoje, devo principalmente a você. Tudo o que você me proporcionou e todo aprendizado que tive ao longo desses dois anos, sem dúvidas, mudaram a minha vida. Obrigada pela paciência e por sempre me acalmar quando eu estava desesperada, pelo suporte até quando você estava de férias, por respirar fundo várias vezes mesmo quando eu merecia um esporro. Obrigada pela sua dedicação extrema, por sua vontade de me ver crescer, por me incentivar em tudo. Obrigada pelas longas horas de conversa, pelos conselhos e até pelos puxões de orelha, sei que todas às vezes eram porque você sabia da minha capacidade de fazer mais. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma. Obrigada por confiar a mim o “seu *precious”*, o citômetro. Por me tornar uma das poucas pessoas no mundo, especialistas nele e por ter se dedicado tanto, por longas horas, até que eu pudesse liga-lo sozinha. Demorou meses rs. Agradeço por ter me envolvido em tantos projetos importantes na Marinha, por ter despencado algumas vezes de Arraial até o Porto de Itaguaí comigo, antes do sol nascer, pra coletar água de lastro nos navios. Por me proporcionar a experiência maravilhosa e inesquecível que tive no Navio Oceanográfico Antares. Enfim, se eu descrever item por item, não vou terminar hoje. Você foi essencial para o meu crescimento. Espelho-me muito em você, em cada ato. Espero um dia ser pelo menos a metade do que você é e me dedicar e amar tanto a ciência e a pesquisa, como você. Sou extremamente grata e serei pra sempre. Você inspira a todos por onde passa, isso faz de você único, continue assim. Conte comigo pro que precisar, estarei sempre aqui. Muito obrigada por **TUDO**.

# SUMÁRIO


CAPÍTULO 1 ..... x

OBJETIVOS ..... 3

Geral ..... 3

Específicos ..... 3

HIPÓTESE ..... 3

CAPÍTULO 1 ..... 4

RESUMO ..... 5

ABSTRACT ..... 6

INTRODUÇÃO ..... 7

MATERIAL E MÉTODOS ..... 9

RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 11

*Pseudomonas fluorescens* – Quantificação bacteriana ..... 11

Análises de Citometria e Espectrofotometria – Pioverdina (PVD) ..... 11

Análises de microscopia – *Isochrysis galbana* ..... 14

CONCLUSÃO ..... 18

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 19

CAPÍTULO 2 ..... 22

RESUMO ..... 23

ABSTRACT ..... 24

INTRODUÇÃO ..... 25

Convenção Internacional de Controle e Gestão da Água de Lastro (IMO) ..... 26

Bactérias Patogênicas em Água de Lastro ..... 27

MATERIAL E MÉTODOS ..... 29

Marcadores de DNA ..... 30

RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 31

Análises dos Tanques de Lastro ..... 32

Bactérias Isoladas do Tanque de Lastro ..... 36

CONCLUSÃO ..... 38

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 39

CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 42

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** Crescimento populacional de *Pseudomonas fluorescens* (cel.mL) ao longo do tempo (84 horas). Os gráficos superiores ilustram a variação temporal da concentração de *P. fluorescens* mantidas na luz (esquerda) e no escuro (direita) sem a presença de microalga (Controle. Os gráficos inferiores representam a variação temporal da concentração de *P. fluorescens* mantidas em interação com *I. galbana* na luz (esquerda) e no escuro (direita) ..... 11
**Figura 2** Variação temporal da concentração de pioverdina (PVD) em suspensão nas amostras controle de *P. fluorescens* (esquerda) e nas amostras de interação entre *P. fluorescens* e *I. galbana* (direita) ..... 12
**Figura 3** Concentração de pioverdina intracelular da amostra de interação entre *P. fluorescens* e *I. galbana* em 72 horas mantida no escuro. VLP: partículas semelhantes a vírus, Bead: esferas padrão (1,35 µm diâmetro). ..... 13
**Figura 4** Variação da concentração intracelular relativa de pioverdina das populações de *P. fluorescens* associadas a *I.galbana* em 48 horas (esquerda) e 72 horas após o início do experimento. HF: *P. fluorescens* alta fluorescência, LF: *P. fluorescens* baixa fluorescência, VLP: partículas semelhantes a vírus, Bead: esferas padrão (1,35 µm diâmetro). ..... 14
**Figura 5** Quantificação de *Isochrysis galbana* por microscopia. Amostras mantidas na luz em fotoperiodo (Light) e ao abrigo da luz (Dark), sozinhas e em interação ..... 15
**Figura 6** Variação temporal na fluorescência in vivo emitida por *I. galbana* das amostras mantidas em fotoperíodo (Light) e ao abrigo da luz (Dark), sozinhas e em interação com as bactérias ..... 16

### CAPÍTULO 2

**Figura 1** Detecção da assinatura de *Pseudomonas fluorescens* testada com e sem a presença de marcador de DNA. O citograma A representa *P. fluorescens* sem marcador de DNA. O citograma B, representa *P. fluorescens*, marcada com DAPI. O citograma C representa *P. fluorescens* marcada com SYBR Green Nucleic Acid. Todas as amostras foram corridas com o trigger na fluorescência verde. ..... 31
**Figura 2** Citograma das amostras obtidas no navio Hubert Fedry, no Porto de Itaguaí-RJ. O citograma A corresponde a amostras do Tanque 1. Citograma B corresponde a amostras do tanque 2. As beads (B) utilizadas foram da marca Spherotech Yellow fluorescence de 1.35µm e o DNA foi marcado com SYBR Green I Nucleic Acid Thermo Fisher®. As seguintes populações

podem ser caracterizadas como: A: S *Synechococcus* sp., Pcpkt: Picoplâncton B: Prk: Procariotos, Pcpkt: Picoeucariotos. ..... 32
**Figura 3** Detecção das populações presentes no navio Strategic Vision, no Porto de Itaguaí - RJ. O Citograma A corresponde a amostras do Tanque 1 e o citograma B corresponde a amostras do Tanque 2. As beads (B) utilizadas foram da marca Spherotech Yellow fluorescence de 1.35µm e o DNA foi marcado com SYBR Green I Nucleic Acid Thermo Fisher®. As seguintes populações podem ser caracterizadas como: A: Sb: *Synechococcus* bright Sd: *Synechococcus* dim, Pcpkt: Picoplâncton Prk: Procariotos. B: S: *Synechococcus sp.,* B: Beads, Pcpkt: Picoplâncton..... 34
**Figura 4** Detecção das populações presentes no navio China Steel Endeavor, no Porto de Tubarão – Vitória - ES. O Citograma A corresponde a amostras do Tanque 1 com DNA foi marcado por SYBR Green I Nucleic Acid Thermo Fisher®. O citograma B corresponde a amostras do Tanque 2, não marcadas. As beads (B) utilizadas foram marca Spherotech Yellow fluorescence de 1.35µm e As seguintes populações podem ser caracterizadas como: A Prk: Procariotos e VLP: Virus-Like-Particles B: Pcpkt: Picoplâncton, e D: Dinoflagelados. ..... 35
**Figura 5** Placas de petri com meio de cultivo LB Agar, com colônias de bactérias isoladas e cultivadas a partir de amostra do tanque de lastro. ..... 36
**Figura 6** Bactérias potencialmente patogênicas isoladas dos tanques, crescidas em meio de cultura seletivo MacConkay Agar II. As bactérias crescidas possuem características de *Escherichia colli*.e *Pseudomonas* sp. ..... 37

# INTRODUÇÃO GERAL

As questões fundamentais da presente proposta se organizam em dois artigos anexados a este documento.

O artigo documentado no Capítulo 1 aborda a potencial influência que a bactéria *Pseudomonas fluorescens* pode causar à espécie de microalga *Isochrysis galbana.* O gênero *Pseudomonas* é associado às gammaproteobactérias, que incluem inúmeras espécies, patogênicas ou com implicações ecológicas importantes, dentre as quais se destaca *Pseudomonas fluorescens*. Estes organismos ocorrem em diversas regiões tropicais e temperadas do globo e usualmente apresentam alta capacidade de resistência (Dyksma et al. 2016). Essa característica lhes permite sobreviver por longos períodos em ambientes que são desfavoráveis à maioria das demais bactérias, como em tanque de lastro de navios, implicando em alto potencial de disseminação e de seleção de genes de resistência (Keller-costa et al., 2014). É nesse ponto que a proposta se torna mais específica; na investigação dos efeitos que essa bactéria – portadora de um dos mais poderosos transportadores de Ferro (pioverdina) – tem sobre as microalgas *Isochrysis galbana*. Com base em estudos já realizados, foram avaliados – através de um experimento em laboratório – os impactos causados por *P. fluorescens* na sobrevivência e crescimento de *I. galbana* em condições simuladas de um tanque de lastro de navio.

O artigo documentado no Capítulo 2 se organiza em torno da utilização da técnica de citometria de fluxo para detecção bacteriana em amostras de água de lastro, nas interferências bacterianas que podem causar no ecossistema marinho e no risco potencial de disseminação de bactérias patogênicas através da água de lastro. O uso de navios para comercialização de produtos tem sido cada vez maior em todo mundo. Eles transferem aproximadamente de 3 a 5 bilhões de toneladas de água de lastro ao redor do planeta por ano, espalhando assim diversas espécies em todo mundo. Estima-se que até hoje cerca de 60 espécies de organismos tenham sido introduzidas através da água de lastro nos EUA, algumas das quais têm causado impactos ecológicos e econômicos (Takahashi et. al., 2008). Tanques de lastro carregam uma comunidade de organismos diversos, resultando numa grande invasão biológica. Agentes patogênicos, que podem afetar a saúde humana e a economia, são comumente encontrados em águas costeiras e podem também ser transferidos na água de lastro (Burkholder et al.,

2007). Atualmente, a detecção desses microrganismos em água lastro é um processo falho em função da falta de conhecimento sobre as particularidades populacionais no interior do tanque. Ainda que difícil, a Convenção Internacional para Gestão e Controle da Água de Lastro e Sedimentos de Navios (International Maritime Organization 2004) estabelece que a detecção deve ocorrer em diferentes partes de distintos tanques, a fim de se reduzir as falhas do processo. O objetivo principal da proposta em questão foi detectar, quantificar, caracterizar e isolar através da técnica de citometria de fluxo as bactérias presentes nas amostras. Adicionado a isso, buscou-se avaliar a viabilidade das bactérias presentes em tanque de lastro, através do isolamento célular com o auxílio do BD Marine Influx Cell-Sorter.

# OBJETIVOS

## Geral

O objetivo geral foi avaliar os efeitos da interação entre a bactéria *Pseudomonas fluorescens* e a microalga marinha *Isochrysis galbana* na sobrevivência de microrganismos em tanques de lastro

## Específicos

**CAPÍTULO 1**. Avaliar os impactos da interação entre *Pseudomonas fluorescens* sobre a sobrevivência e o crescimento de *Isochrysis galbana,* realizando um experimento para analisar a sobrevivência, o crescimento e a condição fisiológica da população de *I. galbana* em condições simuladas de um tanque de navio em função da presença/ausência de *P. fluorescens* e de luz.

**CAPÍTULO 2** Detectar, quantificar, caracterizar e isolar por citometria de fluxo as bactérias presentes em água de lastro a partir das amostras provenientes do tanque de lastro.

# HIPÓTESE

A presença de *Pseudomonas fluorescens* afeta a sobrevivência da microalga *Isochrysis galbana* em condições de tanque de lastro. No âmbito deste estudo, parte-se da premissa de que a presença de *P. fluorescens* inibe o crescimento das microalgas.

# CAPÍTULO 1

## Avaliação da interação entre a bactéria marinha *Pseudomonas fluorescens* e a microalga *Isochrysis* galbana simulando o ambiente de um tanque de lastro.

**RESUMO**

Avaliar os impactos da interação entre bactérias e microalgas tem sido objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa pelo mundo. Entretanto, pouco se sabe sobre a interferência que pigmentos produzidos por bactérias, como o sideróforo pioverdina, podem causar a microalgas como *Isochrysis galbana.* Pioverdina é um fluorocromo produzidos por certas linhagens de *Pseudomonas*, como *P. fluorescens*, que tem papel na captura e transporte de íons de ferro do ambiente para a célula. Ao contrário dos oceanos onde as concentrações de Fe são extremamente baixas (<10-15 µM), em um tanque de lastro espera-se que haja grande oferta de ferro para as células e que a ausência de luz seja o principal fator limitante até o deslastre. Curiosamente, sob certas condições, as bactérias como *P. fluorescens* absorvem a maior parte dos íons de Ferro solúveis na água e impedem o crescimento do fitoplâncton mesmo que haja luz suficiente. Alterações no padrão de distribuição de luz em ambientes aquáticos podem afetar as características fisiológicas de certas microalgas. Esta investigação buscou avaliar os impactos da presença de *P. fluorescens* sobre a sobrevivência e o crescimento de *I. galbana* no interior do tanque. Para estudo, foi realizado um experimento de interação entre *P. fluorescens* e *I. galbana* em condições simuladas de um tanque de navio em função da presença/ausência de *Pseudomonas* e da luz. Os resultados obtidos revelaram que a presença da bactéria não é o principal fator limitante para o crescimento da microalga. O efeito do fator luz foi determinante na taxa de reprodução. Acredita-se que a pioverdina produzida por *P. fluorescens* tenha contribuído para a taxa de mortalidade e o baixo desenvolvimento das células de *I. galbana*. Entretanto, não é possível afirmar se os níveis de concentração do pigmento foram afetados a partir do crescimento das microalgas.

**Palavras-chave**: *Pseudomonas fluorescens, Isochrysis galbana*, Interação, Pioverdina, Fluorescência

**ABSTRACT**

To evaluate the impacts of the interaction between bacteria and microalgae has been the object of study by many research groups around the world. However, little is known about the interference that pigments produced by bacteria, such as the pyoverdine siderophore, can cause to microalgae like *Isochrysis galbana*. Pyoverdine is a fluorochrome produced by certain *Pseudomonas* strains, such as *P. fluorescens*, which plays a role in capturing and transporting iron ions from the environment to the cell. Unlike the oceans where Fe concentrations are extremely low (<10-15 M), in a ballast tank it is expected that there is a great supply of iron to the cells and that the absence of light is the main limiting factor until the slip. Interestingly, under certain conditions, bacteria such as *P. fluorescens* absorb most of the water soluble iron ions and prevent the growth of phytoplankton even if there is sufficient light. Changes in the pattern of light distribution in aquatic environments may affect the physiological characteristics of certain microalgae. This study aimed to evaluate the impacts of the presence of *P. fluorescens* on the survival and growth of *I. galbana* inside the tank. For the study, an experiment was carried out to study the interaction between *P. fluorescens* and *I. galbana* under simulated conditions of a vessel in the presence / absence of *Pseudomonas* and light. The results showed that the presence of the bacteria is not the main limiting factor for microalga growth. The effect of the light factor was determinant on the reproduction rate. It is believed that pyoverdine produced by *P. fluorescens* contributed to the mortality rates and the low efficiency of *I. galbana* cells. However, it was not possible to check if the pigment concentration was affected by the growth of microalgae.

**Keyword:** *Pseudomonas fluorescens, Isochrysis galbana*, Interaction, Pyoverdine, Fluorescence.

## INTRODUÇÃO

Microrganismos desenham o mundo como conhecemos, repleto de espécies que, via de regra, têm no diminuto tamanho sua única semelhança. Nessa diversidade, incluem-se inúmeras bactérias, patogênicas ou com implicações ecológicas importantes, dentre as quais se destaca *Pseudomonas fluorescens*. Estes organismos ocorrem em diversas regiões tropicais e temperadas do globo e usualmente apresentam alta capacidade de resistência a ambientes inóspitos (Dyksma et al., 2016). Essa característica lhes permite sobreviver por longos períodos em ambientes que são desfavoráveis à maioria das demais bactérias, como por exemplo, em tanques de lastro de navios.

Ao contrário dos oceanos onde as concentrações de ferro são extremamente baixas (<10-15 µM), em um tanque de lastro espera-se que haja grande oferta de ferro para as células e que a ausência de luz seja o principal fator limitante até o deslastre. Curiosamente, sob certas condições, bactérias como *P. fluorescens* absorvem a maior parte dos íons de Ferro solúveis na água (Meyer e Abdallah, 1978) e impedem o crescimento do fitoplâncton, mesmo que haja luz suficiente para as atividades fotossintéticas. Até o presente, não são bem compreendidos os mecanismos de interação entre o fitoplâncton e essas bactérias, mas experimentos com adição de pigmentos quelantes de ferro contraditoriamente apontam para benefício mútuo decorrente do aumento na taxa de reciclagem (De Serrano et al., 2016). Não há, portanto, um consenso sobre o tipo de relação entre bactérias do gênero *Pseudomonas* e microalgas.

A importância dos estudos sobre bactérias do gênero *Pseudomonas* vai muito além da sua patogenicidade a seres humanos e de seu papel no ambiente marinho. Algumas bactérias possuem pigmentos característicos que as tornam capazes de emitir sua própria fluorescência (autofluorescência). O gênero *Pseudomonas* possui um grande número de espécies produtoras de pioverdina (PVD). São cerca de 50 tipos diferentes do sideróforo PVD, além de uma grande variedade de outros tipos de sideróforos (Ahmed e Holmström, 2014). Até o momento, pouco se sabe sobre a pioverdina em todo o mundo. Pioverdina é um fluorocromo sideróforo que tem papel na captura e transporte de íons de ferro do ambiente para a célula (Peek et al., 2012).

Sabe-se há mais de três décadas que diferentes espécies de *Pseudomonas* podem melhorar o crescimento de plantas produzindo sideróforos (PVD) e/ou protegendo-as de patógenos e, portanto, este grupo de bactérias foi classificado como bactéria promotora do crescimento de plantas (Ahmed e Holmström, 2014). Em contrapartida, essas bactérias competem por ferro com o fitoplâncton, produzindo diferentes tipos de sideróforos.

Entre as interações de potencial significado para microalgas estão aquelas que envolvem nutrientes e outros compostos metabolizados por bactérias (Kouzuma e Watanabe, 2015). Microalgas do gênero *Isochrysis* são relativamente comuns em amostras de água de lastro. A espécie *I. galbana* é um fitoflagelado marinho unicelular livre da ordem *Chrysomonadales*. Como outros membros desta ordem, é rico em ácidos graxos poliinsaturados, que são de valor nutricional para larvas de peixes marinhos (Kaplan, et al., 1986). Ademais, a espécie *Isochrysis galbana* está potencialmente propensa à indústria de alimentos devido ao seu alto teor de lipídios (Bonfanti et al., 2018). Consequentemente, pode ser considerada como uma fonte adicional de óleos essenciais para a aquicultura.

Microalgas crescendo em situações naturais estão sempre em interação com bactérias. Existe a hipótese de que a simbiose entre *P. fluorescens* e *I. galbana*, nos moldes daquelas com plantas no solo, promova o crescimento da microalga no tanque de lastro, o que prolongaria a sua viabilidade em viagens de longo curso. Entretanto, sabe-se que a pioverdina pode transportar o ferro do ambiente marinho para dentro das células bacterianas e afetar sua disponibilidade para o crescimento de microalgas (Creanga et. al., 2011). Através desses estudos, foi despertado o interesse em avaliar os impactos da interferência causada por *P. fluorescens* na sobrevivência e no crescimento da microalga *I. galbana.*

## MATERIAL E MÉTODOS

A interação potencial entre bactérias e microalgas foi analisada em um ensaio em condições controladas durante 84 horas. Bactérias do gênero *Pseudomonas* (*P. fluorescens*) e microalgas do gênero *Isochrysis* (*I. galbana*) foram cultivadas isoladamente (Controle) e em interação (Interação). Ambos os organismos foram obtidos na coleção de microrganismos do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). Para que a concentração de nutrientes não afetasse o crescimento apenas das bactérias ou das microalgas, os organismos foram mantidos em meio Conway+Peptona. O meio foi preparado com água do mar filtrada (0.22µm) e autoclavada (120°C por 15 min). Os organismos utilizados no experimento foram retirados de um estoque-mãe na fase exponencial de crescimento.

Com o intuito de simular as condições do tanque de água de lastro dos navios, a interação entre bactérias e microalgas foi analisada no escuro (Dark). O crescimento controle foi conduzido com fotoperíodo 12:12 claro:escuro (Light) e no escuro (Dark). A temperatura nos ensaios foi mantida em 25°C (±1°C) em estufa incubadora. A concentração inicial de bactérias e microalgas foi ajustada para $10^4$ cels.mL$^{-1}$ e $10^3$ cels.mL$^{-1}$, respectivamente. Em cada condição de luz (Fotoperíodo e Escuro), os organismos foram mantidos em Erlenmeyers de vidro boro-silicato (250mL). Foram adicionados 150ml de meio de cultura + 1ml do estoque-mãe de cada cultivo, aos erlenmeyers. Culturas puras (apenas bactérias e apenas microalgas) foram mantidas nas mesmas condições para controle. Todo experimento foi realizado em triplicatas.

O experimento foi realizado por um período de 84 horas, tempo suficiente para que os efeitos potenciais da interação pudessem ser medidos e semelhante às condições de uma viagem de navio pela costa brasileira. Durante o experimento, foram monitorados o crescimento populacional de *P. fluorescens* e de *I. galbana*, a concentração de pioverdina em suspensão (extracelular), a concentração relativa de pioverdina intracelular (apenas em *P. fluorescens*) e a concentração intracelular de Clorofila *a in vivo* (apenas em *I. galbana*).

O crescimento populacional de bactérias foi avaliado em espectrofotometria (Instrutherm UV-VIS 1000). Previamente, foi estabelecida a curva de calibração do equipamento a partir do estoque-mãe. As absorbâncias das amostras foram obtidas em

600 nm e convertidas em concentração celular por meio do coeficiente de absorção. Lâminas para verificação da estabilidade de leitura do equipamento foram preparadas aleatoriamente durante o experimento e a contagem bacteriana feita por microscopia invertida (Olympus BX71) utilizando a lente de aumento com zoom de 40x. Subamostras para preparação de lâminas e leituras em espectrofotometria foram retiradas a intervalos de 12 horas. A quantificação da pioverdina liberada pelas bactérias no meio extracelular foi realizada em espectrofotometria de acordo com Hoegy et al., (2014), a partir da leitura em 380nm. Previamente, as amostras foram centrifugadas em 10000 x g por 5 minutos a 20°C (Zhang et al., 2016) para eliminação das bactérias. Após a centrifugação, 1,5 mL do sobrenadante foram adicionados a 1,5 mL de solução tampão TRIS (pH 7,0). A 380 nm, o coeficiente de extinção molar (ε) de pioverdina é 16.500 $M^{-1}$ $cm^{-1}$. Para garantir a linearidade da avaliação, seguindo a lei de Beer-Lambert, diluições adicionais com TRIS foram realizadas para manter a leitura na faixa entre 0,1 e 1 de absorbância. A avaliação da concentração relativa de pioverdina intracelular foi estimada em citometria de fluxo (BD Marine Influx), por estimulação do lazer azul (488 nm) e leitura em detector verde (>530 nm). Subamostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose (2 µm) e fixadas em solução aquosa de glutaraldeído 0,2% (concentração final), segundo o protocolo Gasol e Moran (2015). A fim de distinguir os efeitos da autofluorescência produzida pela pioverdina e da fluorescência devido ao fluoróforo SYBR Green Nucleic Acid®, as subamostras foram analisadas antes e após marcação dos organismos no fotodetector verde (>530 nm). O total de eventos registrados por amostra foi limitado a 50.000, em fluxo não superior a 1000 eventos segundo Gasol e Moran, (2015).

Para quantificação do crescimento populacional de microalgas, foi utilizada câmara de Neubauer em microscopia de epifluorescência invertida (Olympus BX71). A quantificação da clorofila *a in vivo* foi avaliada por meio de um fluorímetro Turner AquaFluor. O efeito potencial do crescimento de bactérias *P. fluorescens* sobre o crescimento de microalgas *I. galbana* foi avaliado por meio de uma Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo. Foram incluídos os fatores Luz (Escuro vs Fotoperíodo de 12:12) e Interação (Microalgas e Bactérias combinadas vs Controles), em intervalos de 12 horas até o total de 84 horas. Os cálculos foram realizados em StatSoft Statística 7.0 com probabilidade de significância estabelecida em 0,5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Pseudomonas fluorescens* – Quantificação bacteriana

A densidade celular das bactérias se manteve durante todo o experimento em um crescimento linear entre $1.10^4$ e $5.10^4$ cel/mL. Não foi observada uma interferência da luz sobre o desenvolvimento das células, visto que o crescimento foi semelhante em todas as condições. A presença das microalgas também não afetou o crescimento das bactérias (Fig 1).

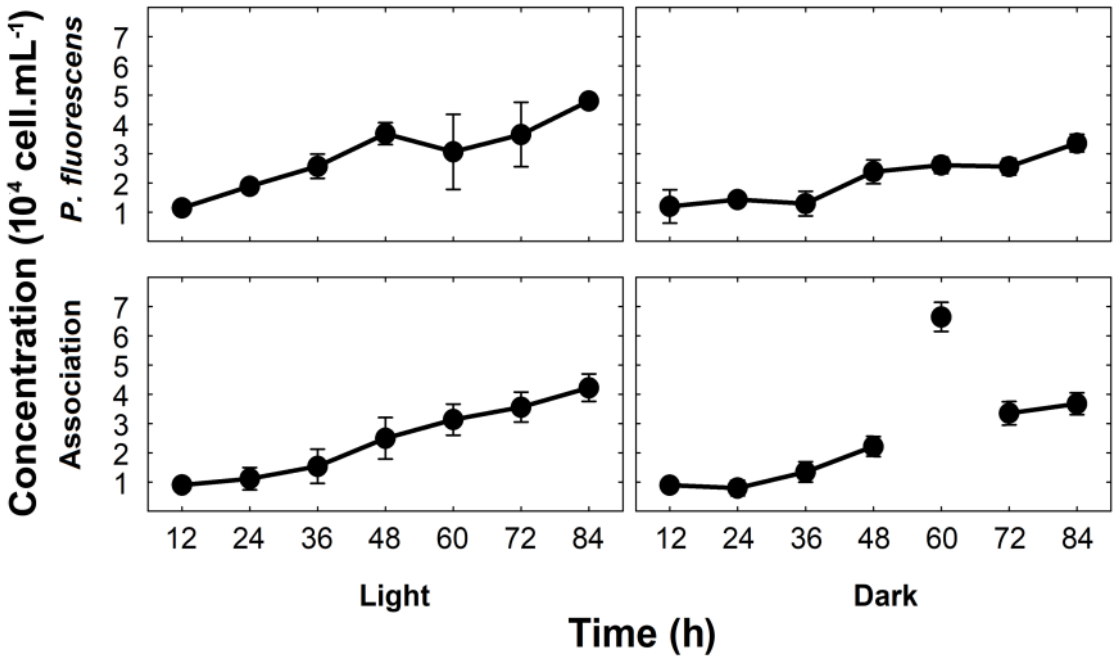


Figura 1 Crescimento populacional de *Pseudomonas fluorescens* (cel.mL) ao longo do tempo (84 horas). Os gráficos superiores ilustram a variação temporal da concentração de *P. fluorescens* mantidas na luz (esquerda) e no escuro (direita) sem a presença de microalga (Controle. Os gráficos inferiores representam a variação temporal da concentração de *P. fluorescens* mantidas em interação com *I. galbana* na luz (esquerda) e no escuro (direita)

### Análises de Citometria e Espectrofotometria – Pioverdina (PVD)

A concentração de pioverdina em suspensão foi intensificada após as primeiras 12 horas do experimento, passada a fase de aclimatação das células bacterianas (Fig 2). Em seguida, houve um segundo pico na concentração de PVD em cerca de 60 horas. O nível de PVD das amostras de bactérias sozinhas ou em interação com as microalgas (Fig 2 A e B) variaram entre 10 e 80µM.

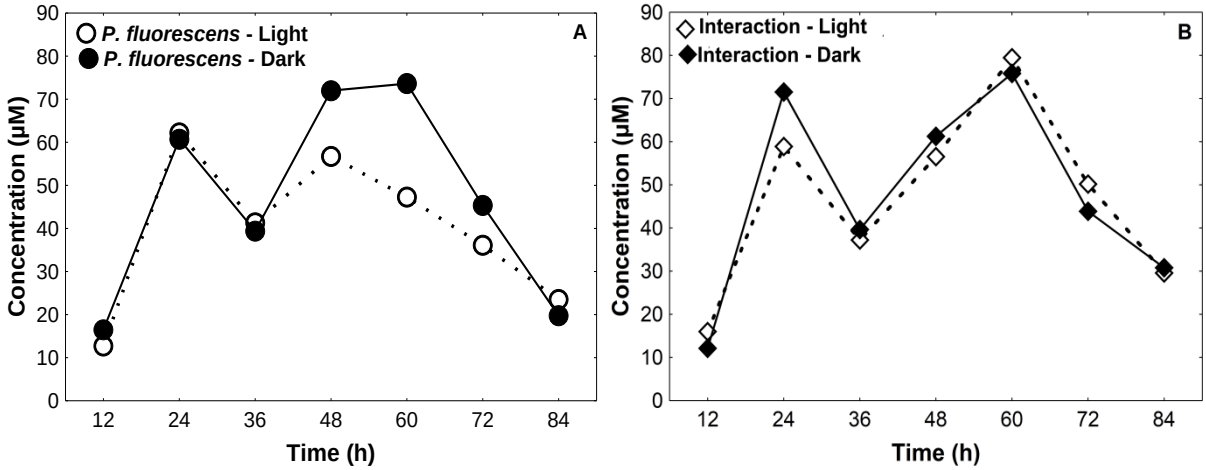


Figura 2 Variação temporal da concentração de pioverdina (PVD) em suspensão nas amostras controle de *P. fluorescens* (esquerda) e nas amostras de interação entre *P. fluorescens* e *I. galbana* (direita)

As diferenças na concentração de piovedina são mais evidentes em um ciclo ao longo do experimento do que entre tratamentos. Dois picos de liberação de pioverdina foram revelados, o primeiro em 24 horas e o segundo em cerca de 60 horas após o início do experimento. Diferenças da ordem de 20 µM ocorreram exclusivamente no controle de *P. fluorescens* entre populações crescendo no escuro e sob fotoperíodo (Fig 2 A). A concentração intracelular de pioverdina, de acordo com os resultados obtidos em citometria, revelou um grande número de células produzindo o pigmento em 48 horas (Fig 4 A). Esse resultado é compatível com a liberação de grandes quantidades de pioverdina nas horas seguintes até 60 horas. Entretanto, quando se dá início ao processo de reprodução de *I. galbana*, após 72 horas (Fig 5), a concentração de pioverdina intracelular e em suspensão cai (Fig 4 B). O citograma B (Fig 4) apresenta duas populações bacterianas em 72 horas após o início do experimento, identificadas como HF (High Fluorescens) e LF (Low Fluorescens) e uma população com características de vírus, identificada com VLP (Virus-like-particles). Nesse instante, a população HF estava representando cerca de 13% do total de células na amostra, indicando que apenas um pequeno grupo possuía uma alta concentração intracelular de pioverdina. A população LF representou a maior parte, cerca de 55% das células presentes na amostra, e pode estar relacionada à baixa concentração de pioverdina. Este resultado sugere que a interação com microalgas interferiu na concentração intracelular de piovedina nas células bacterianas, da mesma forma que observado por Besson-Bard et al., (2016). Esta hipótese pode ser reforçada pelos

resultados das amostras em interação mantidas no escuro, também em 72 horas. Sabendo que o crescimento de *I. galbana* no escuro foi afetado negativamente pela ausência de luz (Fig 5), nota-se que a maior parte da população bacteriana se mantém numa baixa concentração de fluorescência, representado pela cor alaranjada no citograma (Fig 3). Esses resultados indicam que os ciclos de produção e liberação de pioverdina no meio extracelular coincidem com os ciclos de crescimento populacional de *I. galbana*.

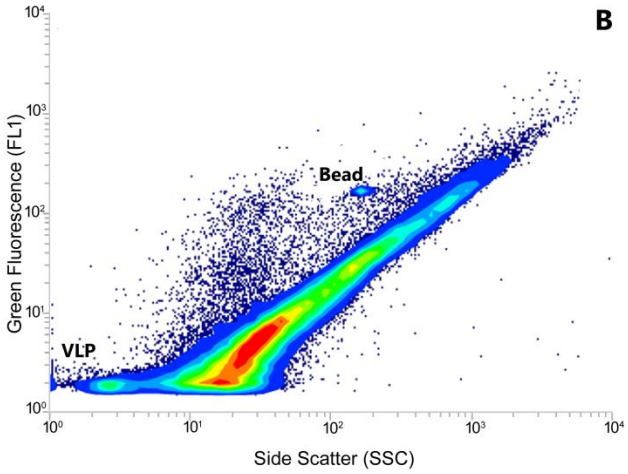


Figura 3 Concentração de pioverdina intracelular da amostra de interação entre *P. fluorescens* e *I. galbana* em 72 horas mantida no escuro. VLP: partículas semelhantes a vírus, Bead: esferas padrão (1,35 µm diâmetro).

A interferência aparente da liberação de pioverdina no processo de reprodução de *I. galbana* se baseia na coincidência entre as altas concentrações de pioverdina e baixas taxas de crescimento. Era esperado que as células de *I. galbana* necessitassem de um período maior de tempo para se reproduzir, passando pelo processo de aclimatação durantes as primeiras horas. A produção de pioverdina por *P. fluorescens* ocorre em situações onde há pouca disponibilidade de ferro solúvel no ambiente, ou quando há uma competição entre espécies, fazendo com que as células produzam o sideróforo para realizar o transporte para dentro das células (Ahmed e Holmström, 2014).

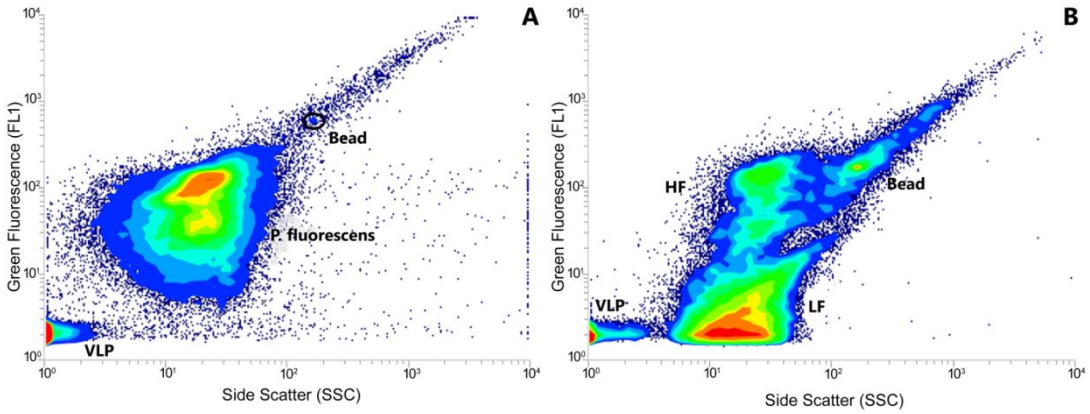


Figura 4 Variação da concentração intracelular relativa de pioverdina das populações de *P. fluorescens* associadas a *I.galbana* em 48 horas (esquerda) e 72 horas após o início do experimento. HF: *P. fluorescens* com alta fluorescência, LF: *P. fluorescens* com baixa fluorescência, VLP: partículas semelhantes a vírus, Bead: esferas padrão (1,35 µm diâmetro).

Estudos realizados sobre a influência da pioverdina em alguns microrganismos sugerem que, apesar de beneficiar o crescimento celular e inibir a infecção de peixes por patógenos (Zhang et al., 2016), a pioverdina tem um papel influente na competição entre espécies, principalmente quando se trata de fitoplâncton. A competição por ferro faz com que *P. fluorescens* aumente a produção do pigmento quando necessário, dificultando a nutrição das microalgas que estão no mesmo ambiente, reduzindo a taxa de crescimento e desacelerando o processo de reprodução (Behrenfeld e Milligan, 2013).

**Análises de microscopia – *Isochrysis galbana***

A quantificação celular de *Isochrysis galbana* através da microscopia revelou diferenças no crescimento populacional relacionadas mais especificamente à disponibilidade de luz do que à interação com as bactérias. Amostras de *I. galbana* no controle (sozinha) crescendo sob fotoperíodo de 12:12 (claro:escuro), seguiram um ciclo semi-diurno (12h) de aumento e diminuição conforme a disponibilidade de luz (taxa de crescimento igual a 240 cels.h$^{-1}$). Ao final do período de aclimatação, próximo a 60 horas, o crescimento acelera exponencialmente até o final do experimento (84h). Quando em interação com *P. fluorescens*, o ciclo inicial de aclimatação, com aumentos e reduções alternadas a cada 12 horas, não é evidente, apesar da disponibilidade de luz (Fig 5). Ainda que o ciclo de aclimatação não tenha sido tão marcado, após decorridas as primeiras 60 horas do início do experimento pode-se notar a mesma aceleração no crescimento (crescimento de 275 cels.h$^{-1}$). Assim, há evidências de que

o fator luz tenha sido determinante na reprodução de *I. galbana* (ANOVA, $F_{(6, 552)}$=6.8, p=0.00001). No escuro, a taxa de crescimento foi próxima de zero, apesar de negativa (-22 cels.h$^{-1}$ e -65 cels.h$^{-1}$, respectivamente pura e em interação), sugerindo que as células não encontraram condições favoráveis para reprodução quando matidas no escuro (Fig 5). Este fato, como dito anteriormente, coincidiu com o ciclo de liberação de pioverdina no meio extracelular, sugerindo uma interferência provocada pela interação. Entretanto, outras análises seriam necessárias para que fosse possível identificar se a concentração pioverdina interferiu no crescimento das microalgas ou se o crescimento das microalgas interferiu na produção da pioverdina.

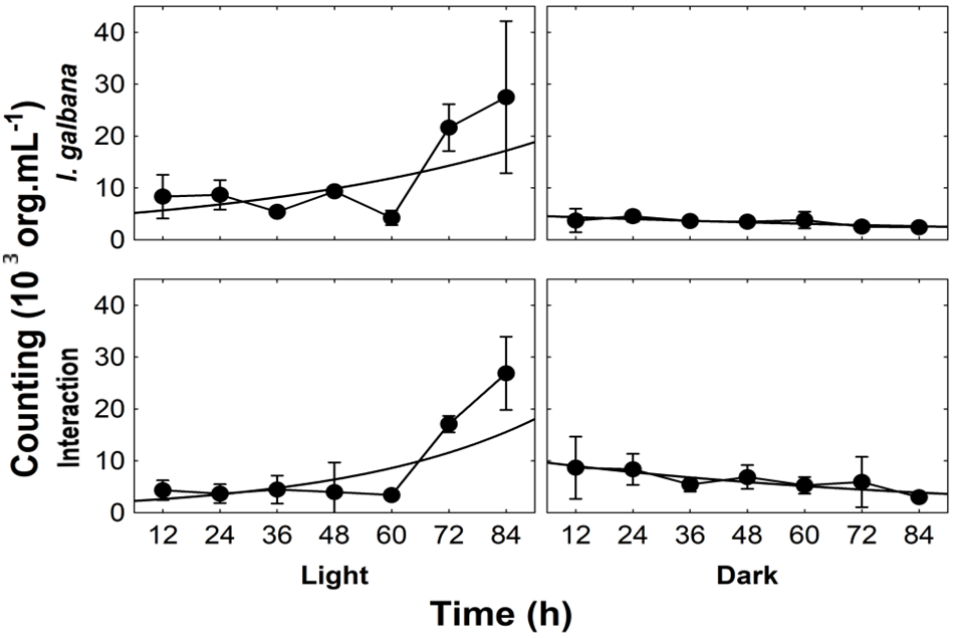


Figura 5 Quantificação de *Isochrysis galbana* por microscopia. Amostras mantidas na luz em fotoperiodo (Light) e ao abrigo da luz (Dark), sozinhas e em interação

A interação com as bactérias, não interferiu no processo reprodutivo de *I. galbana* (Fig 5). A partir das análises microscópicas, notou-se que após 60 horas o desenvolvimento celular foi afetado, apresentando células pequenas, com movimentos imprecisos, rotatórios e lentos. A coloração também foi alterada, passando de marrom/avermelhado para amarelo escuro.

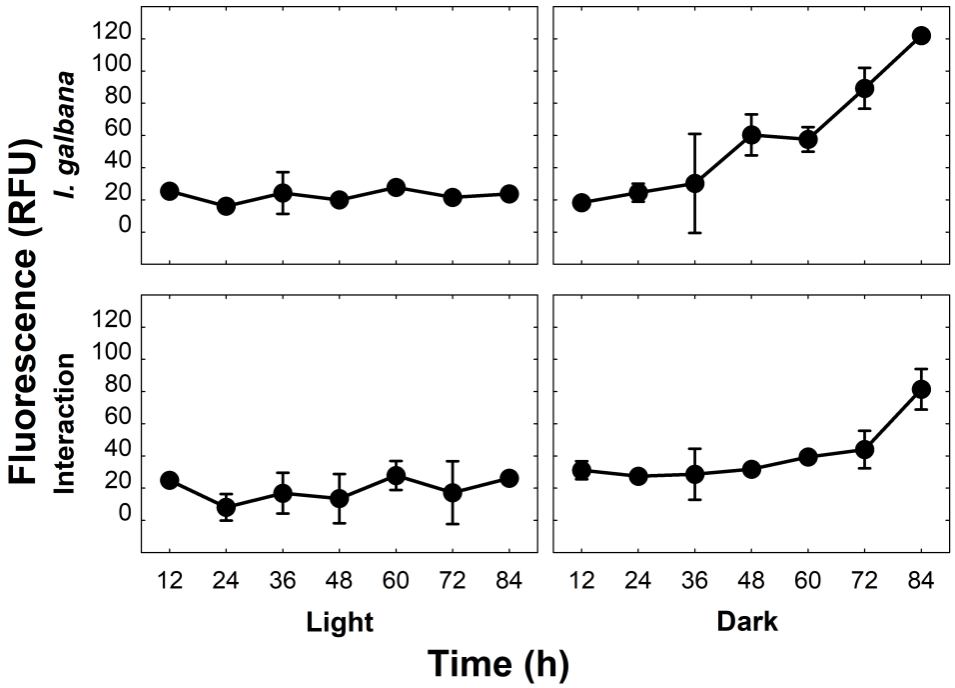


Figura 6 Variação temporal na fluorescência in vivo emitida por *I. galbana* das amostras mantidas em fotoperíodo (Light) e ao abrigo da luz (Dark), sozinhas e em interação com as bactérias

A variação temporal da fluorescência *in vivo* de *I. galbana* revelou o efeito dos fatores luz e interação na concentração de clorofila das microalgas. Na luz, não houve aumento de fluorescência ao longo das 84h (Fig 6), apesar do ciclo semi-diurno sutil. No escuro, houve aumento na concentração de clorofila, atingindo pico máximo em 84h. O aumento da concentração de clorofila entre as amostras é explicado pela ausência de luz no ambiente (Lacour et al., 2017) (Fig 6). A fotoaclimatação realizada pelas células implica no aumento da produção de clorofila (Mooij et al., 2017). Esse processo é esperado quando as células procuram compensar a limitação de luz. Entretanto, apesar do aumento da fluorescência ao longo do tempo, o número de células não aumentou, indicando que as sobreviventes estavam mantendo a produção de clorofila, mas não tinham condições suficientes para se reproduzir (Olson et al, 1990). Em contrapartida, a presença das bactérias parece ter afetado negativamente a produção de clorofila nas células de *I. galbana*, especialmente no escuro. Na ausência da luz, a interação com as bactérias afetou significativamente a produção de clorofila em *I. galbana*, retardando o processo até cerca de 72 horas após o início do experimento (Fig 6). Esse resultado reforça a hipótese de que o fator luz é preponderante sobre o crescimento e a sobrevivência de microalgas ao longo do

tempo, apesar de outros fatores, como as interações com bactérias poderem potencializar seu efeito.

Com base nos resultados desse experimento, há indícios de que a sobrevivência de *I. galbana* em um tanque de lastro seria afetada principalmente pela falta de luz. A presença de bactérias consumidoras de ferro e a competição por nutrientes também afetariam a sua sobrevivência, levando a crer que no momento do deslastro as microalgas estariam severamente debilitadas ou não estariam vivas. Alguns organismos não são sensíveis somente aos valores absolutos de intensidade luminosa, mas também a variações no fotoperiodo (Reynolds, 1994). Alguns níveis de variação nas condições luminosas podem também afetar as organizações biológicas, como população e comunidade, uma vez que flutuações de luz podem ser traduzidas como mudanças na taxa de crescimento em longo prazo, promovendo mudanças nos padrões de dominância e dinâmica de populações (Litchman, 1998). Sabe-se que microalgas dependem primariamente do ferro para sua nutrição e desenvolvimento (Moore et al., 2013), assim como para toda cadeia planctônica o ferro é um elemento fundamental (Morrissey e Bowler, 2008). A interação benéfica dos dois microrganismos utilizados seria possível se seus nichos ecológicos possuíssem características diferentes. *P. fluorescens* produz pioverdina para captação do ferro presente no ambiente (Creanga, Poiata, Fifere, Airinei, e Nadejde, 2011). Apesar de o efeito da pioverdina em alguns microrganismos ser nocivo, diversos estudos mostram o pigmento sendo utilizado como um auxílio benéfico no crescimento de certas espécies, além de plantas (Ganeshan e Kumar, 2005)

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o efeito do fator luz foi determinante para afetar o crescimento das microalgas, visto que quando mantidas no escuro as células não encontraram condições de reprodução. A partir destas análises conclui-se que o crescimento de *Isochrysis galbana* em tanque de lastro, seria afetado principalmente pela ausência da luz. A produção de pioverdina pelas bactérias contribuiu de forma negativa para o desenvolvimento das microalgas. A captação do ferro do ambiente para a célula bacteriana provocada pelo sideróforo pode ter sido um fator determinante para afetar o desenvolvimento de *I. galbana,* resultando na desnutrição e baixa eficiência das células. A competição interespecífica fez com que as microalgas sofressem reduções na reprodução, sobrevivência e no crescimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Ahmed, E. & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, *7*(3), 196–208. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117

Behrenfeld, M. J. & Milligan, A. J. (2013). Photophysiological Expressions of Iron Stress in Phytoplankton. *Annu. Rev. Mar. Sci*, *5*, 217–46. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172356

Bonfanti, C. Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S. & Bandarra, N. M. (2018). Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal Research*, *29*(September 2017), 242–248. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.035

Campbell, L. (2001). 16 Flow Cytometric Analysis of Autotrophic Picoplankton, *30*.

Creanga, D., Poiata, A., Fifere, N., Airinei, A. & Nadejde, C. (2011). Fluorescence of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas* under the effect of iron oxide nanoparticles. *Romanian Biotechnological Letters*, *16*(4), 6336–6343.

De Serrano, L. O., Camper, A. K. & Richards, A. M. (2016). An overview of siderophores for iron acquisition in microorganisms living in the extreme. BioMetals, 29(4), 551–571. https://doi.org/10.1007/s10534-016-9949-x

Dyksma, S., Bischof, K., Fuchs, B. M., Hoffmann, K., Meier, D., Meyerdierks, A., Mußmann, M. (2016). Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in coastal sediments. *Isme J.*, in press. https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2015.257

Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A. C., Khandeparker, L., Mesbahi, E. (2012). Characterization of Bacteria in Ballast Water Using MALDI-TOF Mass Spectrometry, *7*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038515

Ganeshan, G. & Kumar, A. M. (2005). *Pseudomonas fluorescens,* a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*, *1*(3), 123–134. https://doi.org/10.1080/17429140600907043

Gasol, J. M. & Del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, *64*(2), 197–224. https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2197

Gasol, J. M. & Moran, X. A. G. (2015). Flow Cytometric Determination of Microbial Abundances and Its Use to Obtain Indices of Community Structure and Relative Activity. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols - Springer Protocols Handbooks*, 1–29. https://doi.org/10.1007/8623

Hoegy, F., Mislin, G. L. A. & Schalk, I. J. (2014). *Pseudomonas* Methods and Protocols, *1149*, 293–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0

Hoell, I., Olsen, R., Hess-Erga, O.-K., Thuestad, G. & Larsen, A. (2017). Application of flow cytometry in ballast water analysis—biological aspects. *Management of Biological Invasions*, *8*(4), 575–588. https://doi.org/10.3391/mbi.2017.8.4.13

Jonker, R. R. (2000). Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton, *64*(2), 135–156.

Kaplan, D., Cohen, Z. & Abeliovich, A. (1986). Optimal Growth Conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, *9*, 37–48. https://doi.org/10.1016/0144-4565(86)90011-9

Kouzuma, A. & Watanabe, K. (2015). Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, *33*, 125–129. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.007

Lacour, T., Larivière, J. & Babin, M. (2017). Growth, Chl a content, photosynthesis, and elemental composition in polar and temperate microalgae. *Limnology and Oceanography*, *62*(1), 43–58. https://doi.org/10.1002/lno.10369

Meyer, J. M. & Abdallah, M. a. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J Gen Microbiol*, *107*(2), 319–328. https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319

Mooij, T. D., Rajabali, Z., Buren, L. V., Wijffels, R. H. & Janssen, M. (2017). Effect of photoacclimation on microalgae mass culture productivity. *ALGAL*, *22*, 56–67. https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.007

Moore, C. M., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W. Ulloa, O. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosci*. https://doi.org/10.1038/ngeo1765

Morrissey, J., & Bowler, C. (2008). Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae, *3*, 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00043

Olson, R. J., Chisholm, S. W., Zettler, E. R. & Armbrust, E. V. (1990). Pigments, size, and distributions of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific Oceans. *Limnology and Oceanography*, *35*(1), 45–58. https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.1.0045

Trapet, P., Avoscan, L., Klinguer, A., Pateyron, S., Citerne, S., Chervin, C., Mazurier, S., Lemanceau, P. D. W. & Besson-Bard, A. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favour of growth in iron-deficient conditions. *American Society of Plant Biologists*, *33*(0). https://doi.org/10.1104/pp.15.01537

Peek, M. E., Bhatnagar, A., McCarty, N. A. & Zughaier, S. M. (2012). Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/843509

Ruiz-González, C., Galí, M., Lefort, T., Cardelús, C., Simó, R. & Gasol, J. M. (2012). Annual variability in light modulation of bacterial heterotrophic activity in surface northwestern Mediterranean waters. *Limnology and Oceanography*, *57*(5), 1376–1388. https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.5.1376

Wang, B., Liu, C. Q., Wang, F., Yu, Y. & Wu, Y. (2009). Flow cytometric observation of picophytoplankton community structure in the cascade reservoirs along the Wujiang River, SW China. *Journal of Limnology*, *68*(1), 53–63. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2009.53

Zhang, W., Liang, W. & Li, C. (2016). Inhibition of marine *Vibrio sp* . by pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Journal of Hazardous Materials*, *302*(2016), 217–224. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.003

# CAPÍTULO 2

## Utilização da Técnica de Citometria de Fluxo na Detecção de Bactérias Presentes em Água de Lastro e o Risco Associado ao Transporte Microbiológico Marinho via Navios

**RESUMO**

Eventuais diferenças nas concentrações bacterianas em tanques de lastro de navios, com distintas origens e históricos de gerenciamento de lastro, podem por luz sobre a hipótese de que o tanque é um ambiente confinado propício para promover a seletividade de certas espécies e/ou cepas em detrimento de outras. A presença de alguns microrganismos específicos no tanque de lastro, como bactérias potencialmente patogênicas, pode ser indício de uma série de problemas que envolvem questões ambientais e de saúde pública. Atualmente, a detecção desses microrganismos em água lastro é um processo falho em função da falta de conhecimento sobre as particularidades populacionais no interior do tanque. Ainda que difícil, a Convenção Internacional de Controle e Gestão de Água de Lastro e Sedimentos de Navios (International Maritime Organization 2004) estabelece que a detecção deve ocorrer em diferentes partes de distintos tanques, a fim de se reduzir as falhas do processo. A proposta deste trabalho foi a utilização da técnica de citometria de fluxo para a detecção e isolamento de bactérias patogênicas encontradas em tanque de lastro. Um total de 6 tanques dentre três navios foram avaliados. Em todos os navios, foram detectadas bactérias potencialmente patogênicas e identificada através do meio de cultura seletivo MacConkey Agar II, para crescimento de cepas gram-negativas. As células foram isoladas com o uso do citometro de fluxo BD Marine Influx Cell-Sorter® e mantidas no banco de cepas do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). Os resultados obtidos indicaram a presença de pelo menos 2 espécies de bactérias com potencial patogenicidade (*Escherichia coli* e *Pseudomonas sp*.). A partir destas análises, foi possível revelar informações novas e importantes sobre o risco potencial do transporte de microrganismos patogênicos presentes em tanques de lastro de navios para o Brasil. Um total aproximado de 50.000 cels.ml de bactérias foram detectados pela técnica de citometria. Dentre esse total, cerca de 20% eram de espécies de bactérias potencialmente patogênicas.

**Palavras-chave:** Água de lastro, Bactérias, Citometria de fluxo

**ABSTRACT**

Possible differences in bacterial concentrations in ships' ballast tanks with different origins and history of ballast management may in light of the hypothesis that the tank is a confined environment conducive to promoting the selectivity of certain species and / or strains to the detriment of others. The presence of some specific microorganisms, such as pathogenic bacteria, in the ballast tank may be indicative of a number of problems involving environmental and public health issues. Currently, the detection of these microorganisms in water ballast is a failed process due to the lack of knowledge about the population's particularities inside the tank. Although difficult, the International Maritime Organization (2005) stipulates that detection must take place in different parts of different tanks in order to reduce the flaws in the process. The purpose of this work was to use the flow cytometry technique for the detection and isolation of pathogenic bacteria found in ballast tank. A total of 6 tanks from three vessels were evaluated. Pathogenic bacteria were detected on all vessels and characteristically identified through MacConkey Agar II selective culture medium for growth of gram-negative strains. The cells were isolated using the BD Marine Influx Cell-Sorter® flow cytometer and kept in the strains bank of the Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). The results indicated the presence of at least 2 species of pathogenic bacteria (Escherichia coli and Pseudomonas sp.). From these analyzes, it was possible to evaluate the potential risk present in ships' ballast tanks. An approximate total of 50,000 cels.ml of bacteria were detected by the cytometry technique. Among these numbers, about 20% were of pathogenic bacterial species. The risks associated with marine microbiological transport via the ballast tank can lead to serious environmental problems. However, the risk of spreading diseases through the spread of these pathogenic bacteria can lead to an even bigger problem, affecting society, interfering with the health and economy of affected regions.

**Keyword**: Ballast water, Bactérias, Flow cytometry

## INTRODUÇÃO

O ambiente marinho consiste em uma diversidade enorme de microrganismos que chegam por inúmeras vias de acesso. Sabe-se que há uma presença abundante de microrganismos em quase todos os sistemas de água do planeta. Estudos estimam que para cada mililitro de água em lagos e oceanos exista uma concentração de aproximadamente $10^2$ protistas, $10^6$ bactérias e $10^7$-$10^9$ vírus (Dobbs e Rogerson, 2005).

Navios têm usado água de lastro como estabilidade desde os anos 90, descarregando essa água em portos de ligação e em regiões oceânicas durante suas viagens. Os portos podem receber volumes relativamente grandes de água de lastro. Só os Estados Unidos recebem mais de 79 milhões de toneladas por ano (Ruiz et al., 2000). No Brasil, o boletim estatístico portuário do Ministério do Transporte, Portos e Aviação Civil, no primeiro trimestre de 2016, estimou que os portos organizados e terminais privados movimentaram 224,8 milhões de toneladas brutas. Só o Porto do Itaguaí, no estado do Rio de Janeiro, registrou 13,1 milhões de toneladas. Já o Porto de Tubarão, em Vitória, Espírito Santo, movimentou cerca de 24,6 milhões de toneladas. Navios modernos transportam aproximadamente 150.000 toneladas de água de lastro em seus tanques, fazendo com que este seja atualmente um dos principais mecanismos para introdução de espécies exóticas no ambiente marinho em todo o mundo (First et al., 2016). Nos portos, a água é bombeada para os tanques de lastro de navios com pouca carga para garantir estabilidade durante a viagem e para manter a integridade estrutural e a segurança. No entanto, bilhões de microrganismos inevitavelmente entram nos tanques de lastro dos navios durante as operações normais (Dobbs e Rogerson, 2005). Quando o navio chega ao porto de destino e recebe uma nova carga, é necessário realizar o descarte do lastro. O deslastro tem se tornado um preocupante fator de risco ambiental por apresentar um risco potencial no transporte de organismos nocivos não apenas para o ambiente marinho, mas também para a população humana (Hoell et al., 2017).

A estrutura das comunidades do bacterioplâncton é definida pelo tipo de organismo e pela proporção relativa deles. Águas da superfície marinha são tipicamente compostas por alguns grupos abundantes. Geralmente esses grupos são

membros da *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacterias* e o filo *Bacteriodetes* e muitos táxons de baixa abundância (Ruiz-González et al., 2012). A presença de certos microrganismos específicos dentro do tanque de lastro pode ser indício de uma série de problemas que envolvem questões ambientais, econômicas e de saúde pública (Emami et al. 2012).

A introdução de espécies exóticas no ambiente marinho, através da bioinvasão, tem potencial para tornar-se cada vez mais frequente, quando as condições biológicas ambientais são favoráveis (Drake et al., 2014). Esta introdução pressiona sensivelmente o equilíbrio existente, podendo levar a situações irreversíveis, como a extinção de espécies nativas. A ausência de predadores naturais em determinadas áreas pode facilitar o estabelecimento dessas espécies (Occhipinti-Ambrogi e Savini, 2003). Essas espécies podem drasticamente alterar a estrutura e diversidade do ecossistema e algumas têm reduzido ou eliminado grande quantidade de espécies nativas (Emami et al., 2012). Os efeitos da introdução de espécies não desejaveis foram, em muitas áreas do mundo, devastadores (Ferreira et al., 2008). Dados quantitativos mostram que a taxa de bioinvasão continua a crescer significativamente à medida que os volumes do comércio marítimo continuam aumentando (Moser et al., 2016).

**Convenção Internacional de Controle e Gestão da Água de Lastro (IMO)**

A Organização Marítima Internacional (IMO), adotou em 2004, a Convenção Internacional de Controle e Gestão da Água de Lastro e Sedimentos de Navios, para prevenção de introdução de espécies indesejáveis. A Norma da Autoridade Marítima (NORMAM) n° 20 determina que os navios mercantes realizem o gerenciamento da Água de Lastro em Águas Jurisdicionais Brasileiras. Essa diretriz tem por base a obrigatoriedade da troca em região oceânica para minimizar a proliferação de organismos patogênicos ou indesejáveis (Norma D1), apesar de pouco eficiente em certas situações (Burkholder et al., 2007). No dia 8 de setembro de 2017, entrou em vigor com força de lei a Convenção Internacional para o Controle e Gestão da Água de Lastro e Sedimentos de Navios (*International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments*) em todos os países signatários,

incluindo o Brasil. Dessa forma, os navios e demais meios flutuantes que operem com lastro, segundo as normas da Convenção, precisarão adotar medidas de ajuste aos padrões de certificação internacional, o que inclui a instalação de um Sistema de Gerenciamento da Água de Lastro (*Ballast Water Management Systems*), além do cumprimento da regra D2, que determina que a amostra de água de lastro tenha menos de 1 unidade formadora de colônia (ufc) $100mL^{-1}$ de *Vibrio cholerae* toxigênico O1 ou O139 viável. Essa regra também determinou concentrações para os indicadores de contaminação fecal *Escherichia coli* (<250 ufc $100mL^{-1}$) e *Enterococcus* intestinal (<100 ufc $100mL^{-1}$) (IMO, 2004).

**Bactérias Patogênicas em Água de Lastro**

A preocupação com a transmissão de bactérias potencialmente patogênicas via água de lastro deu início em 1992, quando a Food and Drug Administration (FDA) e o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos EUA, detectaram *Vibrio cholerae* em mariscos coletados em tanques de lastros de diversos navios que vieram da África do Sul (Takahashi et al., 2008). Os microrganismos em água de lastro têm despertado preocupações para o ambiente marinho (Dobbs, et al., 2013). A descarga da água de lastro contaminada por agentes nocivos, tornou-se uma das maiores preocupações com relação à saúde publica, disseminando doenças no mundo e afetando a vida humana (Emami et al., 2012). Atualmente, o monitoramento e a caracterização de bactérias marinhas em grandes volumes de água do mar é uma prática demorada e de alto custo. Além do que, a detecção desses microrganismos em água lastro é um processo falho em função da falta de conhecimento sobre as particularidades populacionais no interior do tanque. Diariamente, milhões de microrganismos nocivos e com alto potencial de patogenicidade são transportados de uma região para outra, através de navios (Drake et al., 2005). É estimado que uma quantidade de $10^{19}$ bactérias sejam transportadas todos os dias ao redor do mundo por água de lastro (Brinkmeyer, 2016). A última epidemia de cólera na América do Sul é um exemplo clássico. O vibrião que transmite a doença, originário da Ásia, voltou para cá em 1991 por causa de um navio chinês que trouxe água de lastro contaminada e aportou no Peru. Naquele ano, só no Brasil, a doença fez 33 mortos, número que subiu

nos dois anos seguintes para, respectivamente, 462 e 650 casos. Entretanto, sabe-se pouco sobre a sua composição e a potencial consequência ecológica e para saúde humana.

**Detecção de Bactérias por Citometria de Fluxo**

A detecção de bactérias através da citometria de fluxo, tem se tornado cada vez mais comum dentro dos laboratórios de pesquisa no mundo. Apesar da complexidade de alguns modelos de citômetro, a sua eficiência, desempenho e rapidez em analisar amostras e detectar células, têm sido motivo de satisfação entre os pesquisadores. O sistema óptico do aparelho oferece uma série de lasers que podem ser adaptados para a finalidade desejada (Gasol e del Giorgio, 2000). Cada laser pode ser personalizado com seus detectores e filtros para promover um melhor resultado.

Normalmente, algumas bactérias possuem pigmentos característicos, que as tornam capazes de emitir sua própria fluorescência (autofluorescência) (Jonker, 2000). Porém, apenas com a luz emitida por essas células não é possível identificá-las. Amostras de água do mar possuem inúmeros detritos e partículas que se assemelham a células, dificultando a distinção quando identificados por citometria (Wang, et al., 2009). Sendo assim, o uso da luz emitida pelo laser, em adição à fluorescência natural da célula, permite que as células sejam identificadas mais facilmente, utilizando os parâmetros necessários (Campbell, 2001). A técnica de citometria, conhecida também como citometria de fluxo multiparamétrica, permite uma análise de diferentes parâmetros simultaneamente. Dois detectores são direcionados para determinar as características de tamanho das células. O Forward Scatter (FSC), que tem a capacidade de medir o tamanho relativo das células e o Side Scatter (SSC), que define a granulosidade ou complexidade da célula, além de um ou mais detectores de fluorescência.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os portos de Itaguaí (RJ) e de Tubarão (Vitória - ES) foram selecionados para apoiar a coleta de amostras no interior do tanque de lastro por receberem navios de distintas nações com as quais o Brasil mantém comércio regular. A obtenção das amostras respeitou a especificidade de cada navio e foram priorizados navios com tonelagem acima de 100 mil. Um protocolo de descontaminação prévia de material foi utilizado para preparar os frascos que receberam as amostras.

Entre os anos de 2016 e 2017, a amostragem foi realizada em três navios diferentes, de origens estrangeiras e com lastro realizado em regiões estrangeiras. Dos navios disponibilizados, um total de 6 tanques foi analisado e cerca de 80 litros de água foram coletados. O porto de Itaguaí recebeu duas visitas para coletas de água de lastro ao longo de dois anos, ocorrendo à primeira em abril de 2016. O navio graneleiro Hubert Fedry (número IMO 95007540) de origem panamenha foi disponibilizado. Os tanques continham água proveniente da Índia e as coletas foram realizadas em dois tanques diferentes. As amostras foram devidamente coletadas e imediatamente protegidas da luz após sair do tanque. A água permaneceu no tanque de lastro por um período total de 31 dias até a amostragem.

A segunda coleta também no Porto de Itaguaí foi realizada em março de 2017, no navio graneleiro Strategic Vision (número IMO 9610640), original de Singapura. Três tanques foram disponibilizados para coleta. A água de lastro era de origem de Manzanillo, no México e de Lirquen, no Chile. Um total de 10 litros de água foram coletados. A água permaneceu no tanque de lastro por um período total de 40 dias até a amostragem.

A terceira coleta foi realizada no Porto de Tubarão, em Vitória , em agosto de 2017, realizada a bordo do navio-graneleiro China Steel Endeavour (número IMO 9702558). Neste navio, a água foi coletada junto ao Sistema de Gerenciamento de Água de Lastro, devido à indisponibilidade para acessar os tanques. A água permaneceu no tanque de lastro por um período total de 28 dias até a amostragem. Um total de 10 litros de água foi coletado, cerca de 7 litros foram concentrados em malha de 10 µm até o volume final de 250 mL.

Para preservar a concentração original, foi utilizado glutaraldeído 0,2% (concentração final) para fixar as amostras. Para análise de bactérias totais, 20 mL de

água do tanque foram divididos em dez criotubos com 2 mL cada e congelados para posterior isolamento e avaliação da viabilidade dos microrganismos. As amostras vivas foram processadas em laboratórios dentro de um intervalo de até dez horas após a coleta. Em laboratório, a viabilidade das bactérias foi medida através do crescimento em placas de petri com meio de cultura sólido Luria Bertani (LB) + Ágar. Uma alíquota de 100 µL da amostra foi espalhada sobre placa e colocada em incubadora (tipo BOD) com temperatura constante (30 °C ±1 °C) durante 48 horas. Para a quantificação de bactérias totais, VLP (*Virus-Like Particles*) e microalgas em citometria de fluxo, as mesmas amostras foram filtradas em malhas de Nylon® de modo a separar organismos menores que 5 µm. Para detecção de organismos clorofilados na classe 10-50 µm, foi utilizado o laser azul (488 nm) capaz de excitar a clorofila das células. Para detecção de bactérias e VLP, foi utilizado um marcador específico para DNA (SYBR Green I - Thermo Fisher ®). Microesferas Spherotech microbeads de tamanho (1.35 µm) e concentração ($10^4$ beads.$\mu L^{-1}$) conhecidas foram adicionados às amostras como padrão de referência interna. Em laboratório, as amostras foram processadas no citômetro BD Marine Influx – Cell Sorter, segundo o protocolo modificado de contagem de bactérias e picoplâncton Gasol e Moran (2015).

**Marcadores de DNA**

Para testar a assinatura de bactérias com e sem marcador de DNA, utilizamos a cepa de *Pseudomonas fluorescens*, pertencente ao banco de cepas bacterianas do IEAPM. Dois marcadores de DNA foram testados. O 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e o SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain. Para as amostras marcadas com DAPI, a configuração do citômetro foi realizada utilizando o laser Ultravioleta (UV), no qual o DAPI possui a máxima absorção em 355nm (UV) e emissão máxima em 460nm (Blue). Para as amostras marcadas com SYBR Green, foi utilizado o laser azul, com o trigger na fluorescência verde, que é utilizado para detectar células com DNA marcado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A assinatura da população de *Pseudomonas fluorescens* (Fig 1) foi obtida através do trigger na fluorescência verde. O citograma A representa as células *in vivo* sem marcador de DNA. O citograma B representa as células com DNA marcado por DAPI e o citograma C apresenta células com DNA marcado por SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain.

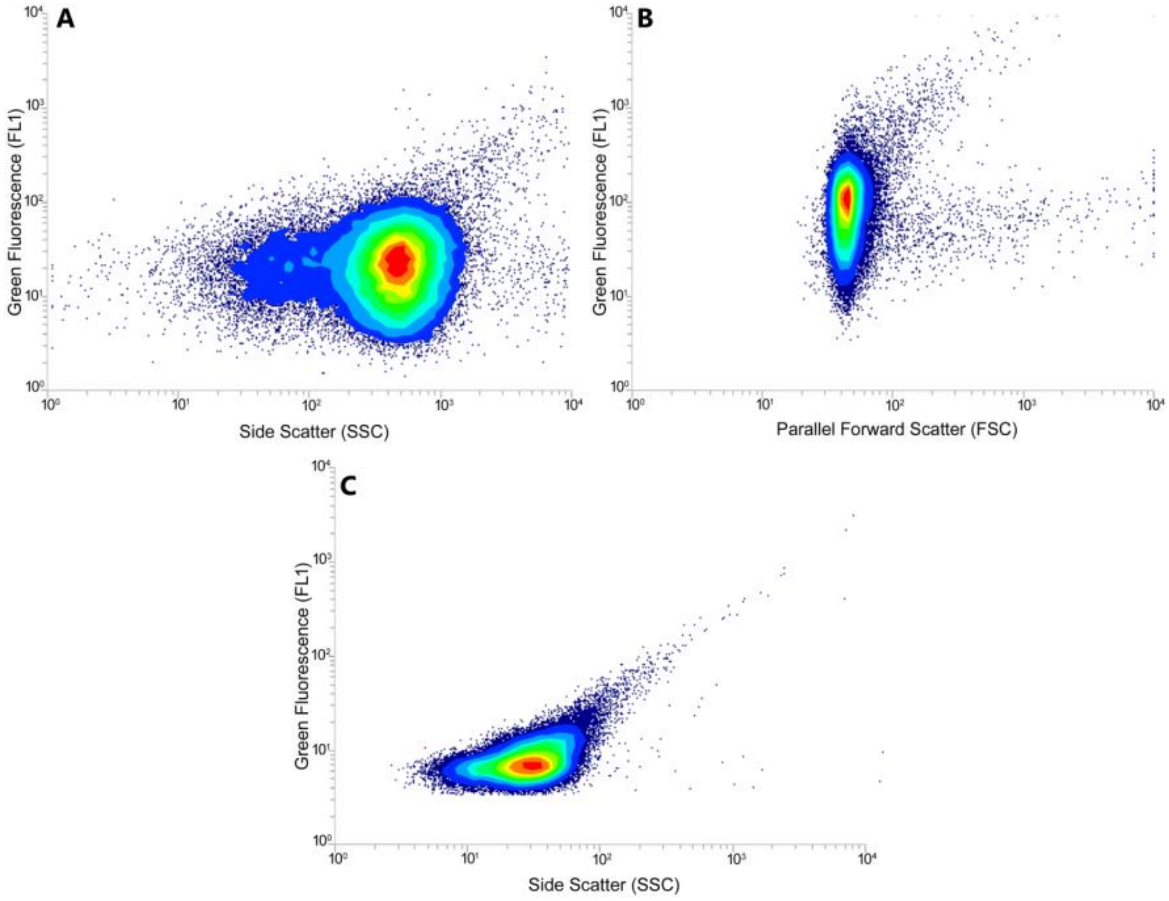


Figura 1 Detecção da assinatura de *Pseudomonas fluorescens* testada com e sem a presença de marcador de DNA. O citograma A representa *P. fluorescens* sem marcador de DNA. O citograma B, representa *P. fluorescens*, marcada com DAPI. O citograma C representa *P. fluorescens* marcada com SYBR Green Nucleic Acid. Todas as amostras foram corridas com o trigger na fluorescência verde.

A assinatura de *P. fluorescens* é facilmente detectada através da autofluorescência produzida pelas células (Fig. 1A). Entretanto, com a presença de marcador de DNA, a assinatura apresenta uma população mais concentrada, mostrando apenas células que possuem DNA. A marcação de DNA funciona como um

auxílio na detecção de bactérias, principalmente de amostras marinhas, onde a quantidade de partículas não desejáveis e detritos é abundante.

**Análises dos Tanques de Lastro**

**Navio 1 – Hubert Fedry**

As análises de citometria detectaram cerca de 5 populações bacterianas presentes nas amostras dos tanques. Dentre as populações de procariotos (Pkt) presentes (Fig 2), pode-se afirmar que as células possuem semelhanças nas características físicas. O tamanho e formato pôde ser distinguidos pelo parâmetro Parallel Forward Scatter (FSC) que determina a forma e tamanho das células detectadas. A alta concentração de DNA presente das células foi detectado pela fluorescência verde do trigger.

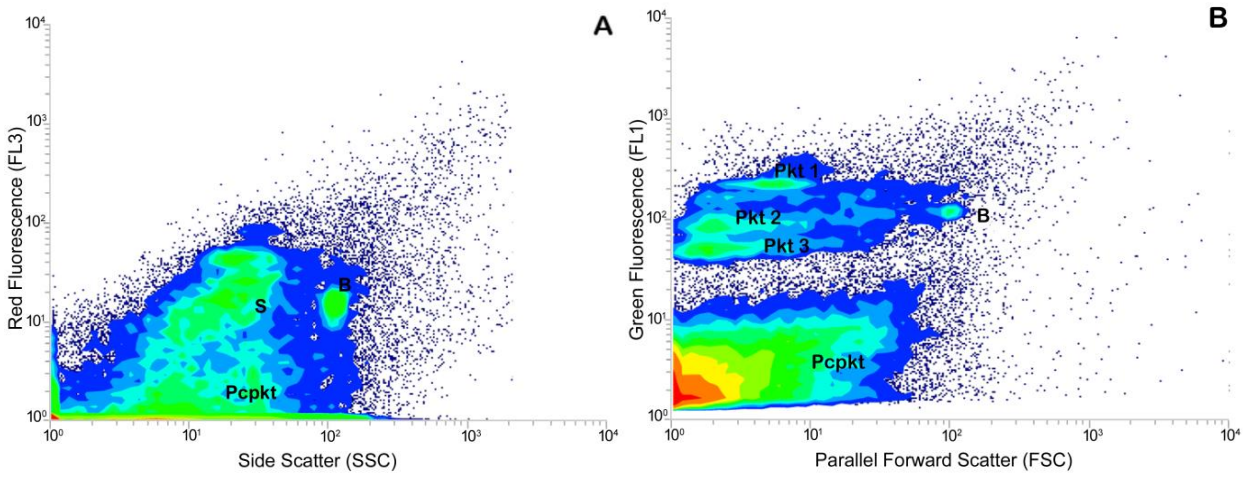


Figura 2 Citograma das amostras obtidas no navio Hubert Fedry, no Porto de Itaguaí-RJ. O citograma A corresponde a amostras do Tanque 1. Citograma B corresponde a amostras do tanque 2. As beads (B) utilizadas foram da marca Spherotech Yellow fluorescence de 1.35µm e o DNA foi marcado com SYBR Green I Nucleic Acid Thermo Fisher®. As seguintes populações podem ser caracterizadas como: A: S *Synechococcus* sp., Pcpkt: Picoplâncton B: Prk: Procariotos, Pcpkt: Picoeucariotos.

A detecção da concentração de clorofila dos organismos é visualizada através do uso da fluorescência vermelha. Em todos os tanques analisados, foi possível detectar o sinal da clorofila. As cianobactérias do gênero *Synechococcus*, abundantes em regiões costeiras, estão presentes em quase todas as amostras analisadas, identificadas no citograma pela letra “S” (Fig 2 A). Estas cianobactérias possuem cerca de 1µm de diâmetro e são facilmente reconhecidas por citometria de fluxo devido ao pigmento acessório que elas possuem. Além de clorofila, *Synechococcus* sp. possuem

ficoeritrina, e quando excitadas pela fluorescência laranja, suas células brilham, permitindo a certificação das populações quando associados à fluorescência vermelha (Olson et al., 1990). Uma grande população picoplânctonica foi detectada em todas as amostras. A população “Pcpkt” (Fig 2), representou cerca de 45% do total de células presente, indicando que houve uma predominância de organismos clorofilados

A água de lastro coletada no navio 1 veio da região do sul da Índia, realizando um total de 31 dias de viagem até o Porto de Itaguaí. Apesar do longo tempo de permanência dentro do tanque foi possível detectar com eficiência a fluorescência das células. As amostras clorofiladas mantiveram uma intensidade relativamente alta, indicando uma resistência das células. Entretanto, a viabilidade dos organismos pode ter sido comprometida. O isolamento realizado com células de *Synechococcus* não apresentou resultado positivo. A taxa de reprodução foi quase zero. Este resultado sugere que as células precisaram realizar o processo de fotoaclimatação no interior do tanque. A produção de clorofila foi intensificada como mecanismo de sobrevivência (Mooij et al., 2017). Durante um período as células precisaram produzir o pigmento, devido a total ausência de luz, induzindo o aumento da concentração de clorofila por célula. Entretanto, a alta produção de clorofila, não indica que as células estavam se reproduzindo. A ausência de luz debilitou o desenvolvimento celular, fazendo com que a reprodução fosse afetada.

**Navio 2 – Stratégic Vision**

As análises realizadas nas amostras do Navio 2 apresentaram uma grande diversidade de organismos (Fig 3). Foi possível identificar uma população de bactérias, além de duas populações do gênero *Synechococcus*. As amostras possuíam células de *Synechococcus* com intensidade de fluorescência diferentes, denominadas ‘Sd’ para *Synechococcus* dim, quando as células possuíam baixa fluorescência luminosa e ‘Sb’ para *Synechococcus* bright, indicando que as células possuiam alta intensidade de fluorescência (Fig 3A). As duas populações representaram cerca de 40% do total de eventos corridos, significando um total aproximado de 20.000 cel/mL detectadas.

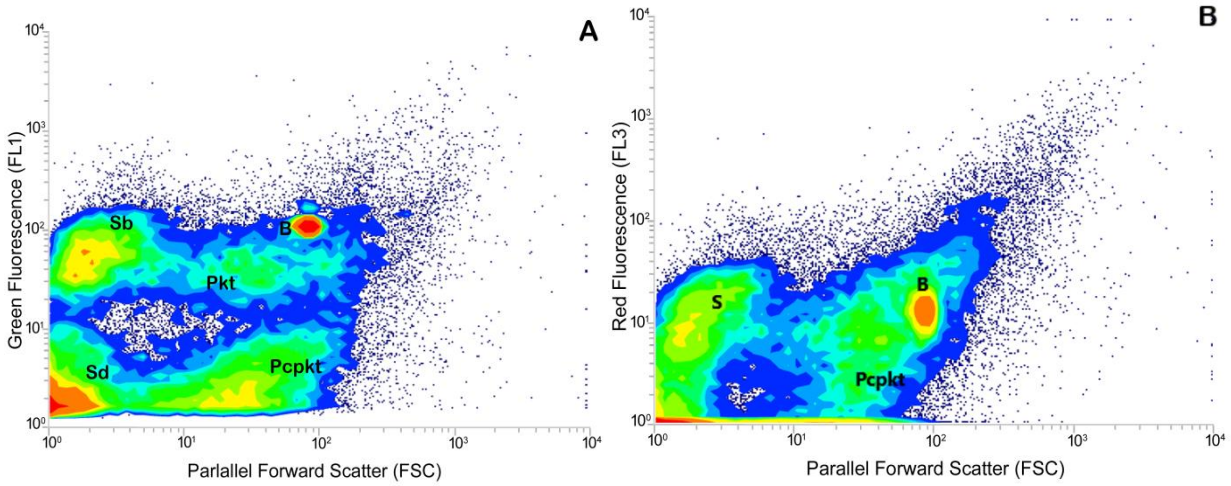


Figura 3 Detecção das populações presentes no navio Strategic Vision, no Porto de Itaguaí - RJ. O Citograma A corresponde a amostras do Tanque 1 e o citograma B corresponde a amostras do Tanque 2. As beads (B) utilizadas foram da marca Spherotech Yellow fluorescence de 1.35µm e o DNA foi marcado com SYBR Green I Nucleic Acid Thermo Fisher®. As seguintes populações podem ser caracterizadas como: A: Sb: *Synechococcus* bright Sd: *Synechococcus* dim, Pcpkt: Picoplâncton Prk: Procariotos. B: S: *Synechococcus sp.,* B: Beads, Pcpkt: Picoplâncton

Com o auxílio da fluorescência vermelha emitida, foi possível visualizar duas grandes populações clorofiladas, identificadas com S: *Synechococccus sp*. e Pcpkt: Picoplâncton (Fig 3 B). Organismos clorofilados foram detectados a partir o laser azul.

Bactérias fotossintéticas de tamanho <1 µm (0,2-0,6 µm) são facilmente discriminadas com base na luz dispersa e teor de clorofila (Chisholm et al., 1988) produzindo geralmente um pico bastante afiado nos canais de dispersão de luz, apesar do tamanho reduzido. Como regra geral, descobriu-se que a dispersão de luz de ângulo pequeno (2-15 °) (FSC) está relacionada à massa celular ou ao volume celular, enquanto a dispersão de luz grande angular (15 a 90 °) (SSC) está relacionada ao índice de refração do conteúdo celular (Gasol e Del Giorgio, 2000).

A população identificada como Pcpkt: picoplâncton, representou 20% do total de células detectadas (Fig 3 A). A população de bactérias (Pkt) detectada apresentou aproximadamente 12.000 células/mL a partir da fluorescência verde, representando cerca de 25% do total de eventos corridos. A alta intensidade de fluorescência pode se dar devido à quantidade de DNA presente nas células. O isolamento em placa de petri demostrou que as células permaneceram viáveis e com uma boa taxa de crescimento.

**Navio 3 – China Steel Endeavor**

As análises dos tanques do navio 3 apresentaram uma diversidade menor se considerarmos o número de populações evidentes. Entretanto, as populações eram formadas por um grande número de células, que revelou uma alta concentração de organismos clorofilados com tamanho aproximado de 5µm (Fig 4 B), maiores que as bactérias. A concentração total foi estimada em cerca de 16.800 organismos por mililitro. Foram identificadas populações cujo tamanho sugere que pertençam aos grupos de bactérias e de vírus. Uma única população evidente possuía características de bactérias (Fig 4 A). Através do isolamento foram detectados cerca de 5 colônias diferentes crescidas em meio de cultura para bactérias (LB Agar) (Fig 5). Em meio seletivo foi possível detectar a presença de uma colônia rosa, com características de *Escherichia coli,* segundo o protocolo de caracterização BD MacConkey II Agar, 2014.

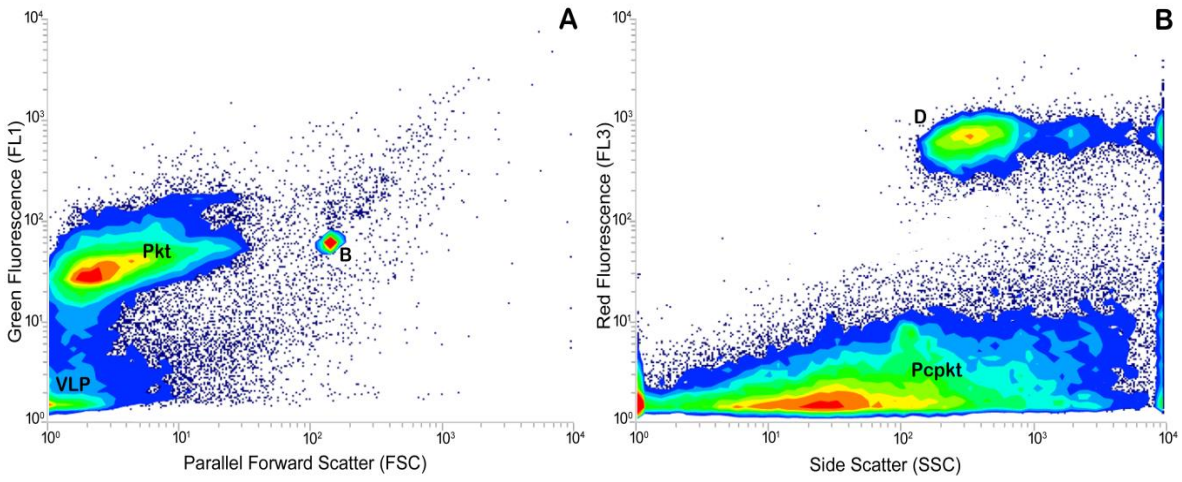


Figura 4 Detecção das populações presentes no navio China Steel Endeavor, no Porto de Tubarão – Vitória - ES. O Citograma A corresponde a amostras do Tanque 1 com DNA foi marcado por SYBR Green I Nucleic Acid Thermo Fisher®. O citograma B corresponde a amostras do Tanque 2, não marcadas. As beads (B) utilizadas foram marca Spherotech Yellow fluorescence de 1.35µm e As seguintes populações podem ser caracterizadas como: A Prk: Procariotos e VLP: Virus-Like-Particles B: Pcpkt: Picoplâncton, e D: Dinoflagelados.

Na fluorescência verde (Fig 4 A), foi detectada a presença de uma grande população, identificada como procariotos (Pkt). Esta população representou cerca de 70% dos eventos corridos. Foi possível visualizar uma alta intensidade de fluorescência emitida pelas células. Esta fluorescência sugere uma concentração de DNA alta,

presente nas células. A população de Pkt, representou aproximadamente 35.000 cels.mL do total de 50.000 eventos corridos. Além das bactérias, uma população com características de Virus-Like-Particles (VLP) foi identificada na fluorescência verde.

A população em destaque com alta concentração de clorofila, na parte superior a direitam, (Fig 4 B (D)), foi identificada como pertencentes ao grupo dinoflagelados (*Peridinium* sp.), após uma análise extra, por microscopia invertida. O número de células representou cerca de 15% do total de eventos, detectadas a partir da fluorescência vermelha emitida pelo citômetro. Foram estimados menos de 10 organismos para cada mililitro de amostra. Apesar na alta concentração de clorofila, a viabilidade do organismo não foi avaliada.

**Bactérias Isoladas do Tanque de Lastro**

Através do método de isolamento por citometria de fluxo foi possível avaliar a viabilidade das bactérias presentes em água de lastro. O isolamento revelou uma diversidade de 3 a 6 colônias para cada 100µL de amostra de cada tanque. Em todas as amostras coletadas, o resultado apresentado foi semelhante. As cepas apresentaram um rápido crescimento, com formação de colônia evidente após 24 horas de incubação (Fig 5). Esse resultado indica que a condição oferecida no interior dos tanques de lastro não interferiu na viabilidade da maioria das bactérias crescidas, visto que o tempo necessário para crescimento, quando isoladas, foi relativamente o esperado quando em condições favoráveis de luz e oxigênio.

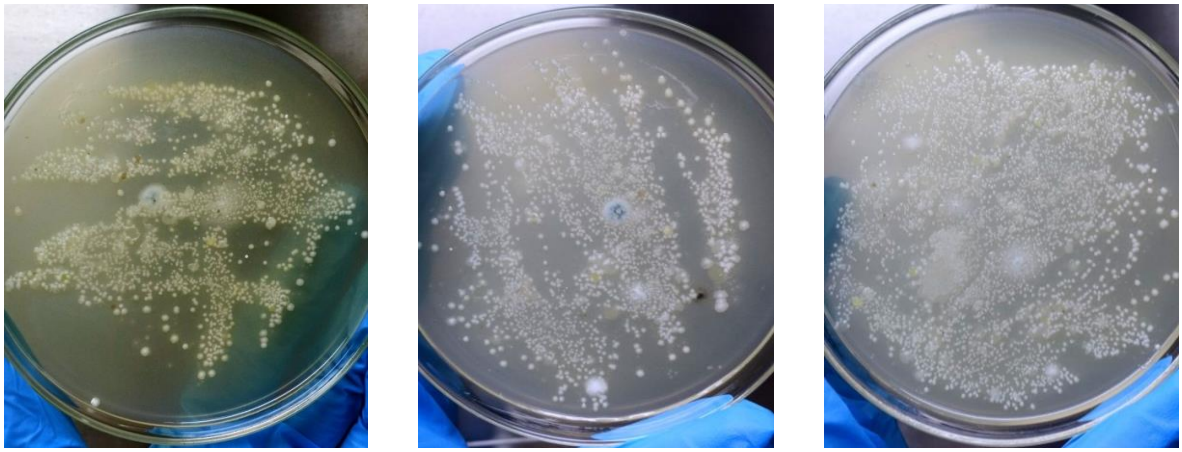

Figura 5 Placas de petri com meio de cultivo LB Agar, com colônias de bactérias isoladas e cultivadas a partir de amostra do tanque de lastro.

A presença de bactérias patogênicas nas amostras foi determinada a partir das características das cepas, após crescimento no meio seletivo MacConkey Agar II. Nas amostras obtidas no navio Strategic Vision, bactérias do gênero *Escherichia* e *Pseudomonas sp*. foram detectadas a partir do método rápido de crescimento em meio seletivo (Fig 6). Estas amostras permaneceram cerca de 40 dias dentro do tanque, ao abrigo da luz. O crescimento rápido e o bom desempenho apresentado pelas células indicam que a viabilidade das bactérias não é afetada pelo fator luz, nem pela permanência por longos dias em local confinado. Esses fatores não foram suficientes para interferir na sobrevivência das células. Considerando que as bactérias do gênero detectado fazem parte do grupo de bactérias super-resistentes, pode-se considerar que a permanência dessas bactérias dentro do tanque pode contribuir para a seletividade e resistência das cepas.

Figura 6 Bactérias potencialmente patogênicas isoladas dos tanques, crescidas em meio de cultura seletivo MacConkay Agar II. As bactérias crescidas possuem características de *Escherichia* coli e *Pseudomonas*.

De acordo com a determinação da Organização Marítima Internacional, bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* toxigênico O1 e O139 e *Enterococcos* intestinais, possuem um limite tolerável de unidades formadoras de colônia a cada 100mL. Resultados que ultrapassam este limite, indicam que o navio encontra-se em desacordo com as normas de segurança no Gerenciamento de Água de Lastro, aumentando o risco de disseminação dessas bactérias, caso o deslastre seja realizado de maneira incorreta, como em regiões próximas a costa, por exemplo.

## CONCLUSÃO

O uso de técnicas que auxiliem na detecção dessas espécies tem sido motivo de estudo em diversos institutos de pesquisa ao redor do mundo. A Convenção Internacional para o Controle e Gestão da Água de Lastro e Sedimentos de Navios (*International Convention for the Control and Management of Ship's Ballast Water and Sediments*) estabelece diretrizes (Padrão D2) que exigem medidas mais restritivas e mais confiáveis para o deslastre e a eliminação de microrganismos. A detecção desses microrganismos em água de lastro é um processo difícil em função da complexidade estrutural dos tanques de lastro. A técnica de citometria é um método satisfatório e que pode contribuir para uma rápida detecção e isolamento para analises mais detalhadas. Os riscos associados ao transporte microbiológico marinho via tanque de lastro podem acarretar sérios problemas ambientais. Porém, o risco de disseminação de doenças através do espalhamento dessas bactérias patogênicas pode acarretar num problema ainda maior, afetando a sociedade, interferindo na saúde e economia das regiões afetadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Behrenfeld, M. J., Milligan, A. J. (2013). Photophysiological Expressions of Iron Stress in Phytoplankton. *Annu. Rev. Mar. Sci*, *5*, 217–46. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172356

Brinkmeyer, R. (2016). Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing. *Marine Pollution Bulletin*. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.058

Burkholder, J. M., Hallegraeff, G. M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H. A., Oldach, D. W., Mallin, M. A. (2007). Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of U .S. military ships as a function of port of origin , voyage time , and ocean exchange practices, *6*, 486–518. https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.11.006

Campbell, L. (2001). Flow Cytometric Analysis of Autotrophic Picoplankton

De Serrano, L. O., Camper, A. K., & Richards, A. M. (2016). An overview of siderophores for iron acquisition in microorganisms living in the extreme. *BioMetals*, *29*(4), 551–571. https://doi.org/10.1007/s10534-016-9949-x

Dobbs, F. C., Goodrich, A. L., F. K. T., & Hynes, W. (2013). Pandemic Serotypes of *Vibrio cholerae* Isolated from Ships ' Ballast Tanks and Coastal Waters : Assessment of Antibiotic Resistance and Virulence Genes (tcp A and ctx A), 969–974. https://doi.org/10.1007/s00248-013-0182-7

Dobbs, F. C., & Rogerson, A. N. (2005). Ridding Ships.

Drake, L. A., Meyer, A. E., Forsberg, R. L., Baier, R. E., Doblin, A., Heinemann, S., Dobbs, F. C. (2005). Potential invasion of microorganisms and pathogens via "interior hull fouling": biofilms inside ballast water tanks, 969–982. https://doi.org/10.1007/s10530-004-3001-8

Drake, L. A., Tamburri, M. N., First, M. R., Smith, G. J., & Johengen, T. H. (2014). How many organisms are in ballast water discharge ? A framework for validating and selecting compliance monitoring tools. *Marine Pollution Bulletin*, *86*(1–2), 122–128. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.034

Dyksma, S., Bischof, K., Fuchs, B. M., Hoffmann, K., Meier, D., Meyerdierks, A., Mubmann, M. (2016). Ubiquitous Gammaproteobacteria dominate dark carbon fixation in coastal sediments. *Isme J.*, in press. https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2015.257

Emami, K., Askari, V., Ullrich, M., Mohinudeen, K., Anil, A. C., Khandeparker, L., Mesbahi, E. (2012). Characterization of Bacteria in Ballast Water Using MALDI-TOF Mass Spectrometry, *7*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038515

Ferreira, C. E. L., Ribeiro, A. D. O. J., Villac, M. C., & Lopes, R. M. (2008). Marine Bioinvasions in the Brazilian Coast : of Non-indigenous Species co c co. *Biolgical Invasions in Marine Ecosystems*, 459–478. https://doi.org/10.1007/978-3-540-

First, M. R., Robbins-, S. H., Riley, S. C., & Drake, L. A. (2016). Towards minimizing transport of aquatic nuisance species in ballast water: Do organisms in different size classes respond uniformly to biocidal treatment? *Biological Invasions*, *18*(3), 647–660. https://doi.org/10.1007/s10530-015-1036-7

Gasol, J. M., & Del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, *64*(2), 197–224. https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64n2197

Hoell, I., Olsen, R., Hess-Erga, O.-K., Thuestad, G., & Larsen, A. (2017). Application of flow cytometry in ballast water analysis biological aspects. *Management of Biological Invasions*, *8*(4), 575–588. https://doi.org/10.3391/mbi.2017.8.4.13

International Convention For The Control And Management Of Ships Ballast Water And Sediments. *International Maritime Organization*, IMO. (2004).

Jonker, R. R. (2000). Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton , *64*(2), 135–156.

Meyer, J. M., and Abdallah, M. a. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J Gen Microbiol*, *107*(2), 319–328. https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319

Moore, C. M., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W., Ulloa, O. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geosci*. https://doi.org/10.1038/ngeo1765

Moser, C. S., Wier, T. P., First, M. R., Grant, J. F., Riley, S. C., Tamburri, M. N., Drake, L. A. (2016). Quantifying the extent of niche areas in the global fleet of commercial ships : the potential for "super-hot spots" of biofouling. *Biological Invasions*. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1386-4

Occhipinti-Ambrogi, A., & Savini, D. (2003). Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, *46*(5), 542–551. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00363-6

Olson, R. J., Chisholm, S. W., Zettler, E. R., & Armbrust, E. V. (1990). Pigments, size, and distributions of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific Oceans. *Limnology and Oceanography*, *35*(1), 45–58. https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.1.0045

Pauline Trapet, Laure Avoscan, Agnès Klinguer, Stéphanie Pateyron, Sylvie Citerne, Christian Chervin, Sylvie Mazurier, Philippe Lemanceau, D. W. and, & Besson-Bard, A. (2016). The *Pseudomonas fluorescens* siderophore pyoverdine weakens *Arabidopsis thaliana* defense in favour of growth in iron-deficient conditions. *American Society of Plant Biologists*, *33*(0). https://doi.org/10.1104/pp.15.01537

Peek, M. E., Bhatnagar, A., McCarty, N. A., & Zughaier, S. M. (2012). Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition.

*Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/843509

Ruiz-González, C., Galí, M., Lefort, T., Cardelús, C., Simó, R., & Gasol, J. M. (2012). Annual variability in light modulation of bacterial heterotrophic activity in surface northwestern Mediterranean waters. *Limnology and Oceanography*, *57*(5), 1376–1388. https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.5.1376

Ruiz, G. M., Rawlings, T. K., Dobbs, F. C., Drake, L. a, Mullady, T., Huq, a, & Colwell, R. R. (2000). Global spread of microorganisms by ships. *Nature*, *408*(6808), 49–50. https://doi.org/10.1038/35040695

Takahashi, C. K., Lourenço, N. G. G. S., Lopes, T. F., Rall, V. L. M., & Lopes, C. a M. (2008). Ballast water: a review of the impact on the world public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *14*(3), 393–408. https://doi.org/10.1590/S1678-91992008000300002

Wang, B., Liu, C. Q., Wang, F., Yu, Y., & Wu, Y. (2009). Flow cytometric observation of picophytoplankton community structure in the cascade reservoirs along the Wujiang River, SW China. *Journal of Limnology*, *68*(1), 53–63. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2009.53

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da realização deste trabalho, foi possível obter respostas sobre questões ainda pouco estudadas, além do aprimoramento do uso de novas tecnologias na detecção de microrganismos. A preocupação com a disseminação de certos microrganismos nocivos no ambiente tem se tornado cada dia maior, ponto em que os dois trabalhos se relacionam. Estudos sobre introduções de espécies não nativas têm ganhado destaque no universo cientifico. A realização deste trabalho foi de grande valia para avaliar primeiramente os impactos causados pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* no crescimento da microalga *Isochrysis galbana* quando em ambiente semelhante a um tanque de lastro. Através deste trabalho buscou-se avaliar os efeitos do pigmento pioverdina, produzido por espécies de *Pseudomonas*, que até o momento ainda é pouco conhecido. Segundo, foi possível avaliar a qualidade do uso da técnica de citometria de fluxo na detecção de microrganismos. A partir deste trabalho, conclui-se que o método de detecção de bactérias por citometria pode ser uma ferramenta rápida e eficaz nas análises detalhadas determinadas pela Organização Marítima Internacional (IMO), contribuindo na avaliação de eficiência do sistema de tratamento dos navios. A partir da realização deste trabalho, um novo estudo será realizado com as bactérias de risco determinadas pela IMO, buscando o desenvolvimento de um método de tratamento.