

**ANTT – Agência Nacional de Transportes Terrestres
RDT – Recurso de Desenvolvimento Tecnológico**

RELATÓRIO FINAL

**ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIOLUMINESCENTE SUSTENTÁVEL
PARA APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE SINALIZAÇÃO DE
RODOVIAS – FASE II**

ECOVIAS CERRADO

21/11/2025

Sumário

1.	DESCRIÇÃO DO PROJETO.....	4
2.	MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADAS	13
2.1.	Aquisição de equipamentos	13
2.2.	Abordagem bioluminescência	14
2.3.	Abordagem bioeletroatividade	14
3.	ETAPAS DA ABORDAGEM BIOLUMINESCÊNCIA	15
3.1.	ETAPA 01: coleta, isolamento e estoque	15
3.2.	ETAPA 02: avaliação da produção de bioluminescência qualitativamente	18
3.3.	ETAPA 03: avaliação da produção de bioluminescência quantitativamente	22
3.4.	ETAPA 04: genoma completo.....	28
3.5.	ETAPAS 05 e 06: planejamento molecular (estudo da construção do plasmídeo, escolha do vetor, amplificação do gene, clonagem) e experimental (DoE) para otimização	34
3.6.	ETAPA 07: formulação.....	55
3.7.	ETAPA 08: desenvolvimento do protótipo e teste em campo	58
4.	ETAPAS DA ABORDAGEM BIOELETRATIVIDADE	86
4.1.	ETAPA 01: ativação, validação e seleção de tratamentos no contexto de bioeletroatividade	86
4.2.	ETAPA 02: investigação do genoma completo das cepas associadas a eletroatividade	96
4.3.	ETAPA 03: desenvolvimento do protótipo e teste em campo	112
5.	CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PRODUTOS	140
5.1.	Considerações finais.....	140
5.2.	Produtos Gerados.....	141
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

7. ANEXOS	144
7.1. Resumo de atividades	144

|

1. DESCRIÇÃO DO PROJETO

Título do projeto:

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIOLUMINESCENTE SUSTENTÁVEL
PARA APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE SINALIZAÇÃO DE RODOVIAS – FASE II

Resumo:

O presente Relatório Final (Fase II) do projeto "Estudos para o Desenvolvimento de Sistema Bioluminescente Sustentável para Aplicação em Elementos de Sinalização de Rodovias" teve como objetivo principal desenvolver e validar em ambiente relevante (Escala de maturidade tecnológica – TRL 5) protótipos de sinalização sustentável a partir de microrganismos marinhos do BANCO REGENERA – primeiro banco de bactérias e fungos marinhos e costeiros legalmente disponível para bioprospecção – usando duas abordagens inovadoras: Bioluminescência e Bioeletroatividade. Este trabalho visa oferecer uma alternativa ecológica para a sinalização rodoviária, minimizando a dependência de energia da rede e o impacto ambiental de tecnologias convencionais. Na abordagem de Bioluminescência, 44 bactérias marinhas bioluminescentes foram isoladas, sendo a bactéria 1485 identificada como a mais promissora após avaliação qualitativa e quantitativa. Foram desenvolvidas formulações utilizadas em protótipos para a sinalização de rodovias e EPIs. Os protótipos se mostraram perceptíveis a uma distância de até 15 metros, validando o conceito em ambiente relevante. Na abordagem de Bioeletroatividade, microrganismos pré-selecionados foram avaliados em Células a Combustível Microbianas (CCMs), sendo selecionado o microrganismo mais promissor (848). Foi desenvolvido o protótipo, um sistema de geração de energia com eletrodos de alumínio e carbono, que alimenta um sinalizador. Este sistema demonstrou potencial, sendo detectável por veículos e pedestres em ambiente relevante, a uma distância de até 40 metros. Os resultados demonstram a viabilidade técnica e a alta sustentabilidade das abordagens, uma vez que utilizam recursos biológicos renováveis, contrastando com a alta pegada de carbono e o descarte de resíduos tóxicos das tecnologias de iluminação convencionais. Estes resultados posicionam a REGENERA/ECOVIAS CERRADO/ANTT como líderes absolutos em inovação verde para infraestrutura em bioeletroatividade e bioluminescência para sinalização de rodovias. Desta forma, todos os objetivos do plano de trabalho foram cumpridos.

Palavras-chave:

Bioeletroatividade; Bioluminescência; Microrganismos marinhos; Sinalização

Justificativas:

A demanda no consumo de energia no mundo vem continuamente aumentando e a busca pela independência nesse setor é motivo de intensa pesquisa. O uso de formas de energias sustentáveis, chamadas de energias-verdes, vem ganhando espaço no mercado dadas as inúmeras vantagens frente a outras energias não-renováveis disponíveis. Neste contexto, o uso de microrganismos tem se apresentado como uma das principais alternativas para geração de luz de maneira sustentável. Dentro deste cenário, a empresa REGENERA MOLÉCULAS DO MAR viabiliza o acesso à biodiversidade de fungos e bactérias marinhos de maneira legal, sustentável e sem burocracias. A empresa possui uma plataforma de Pesquisa & Desenvolvimento inédita no país: o BANCO REGENERA. Trata-se do primeiro e único banco de microrganismos de origem marinha do Brasil disponível para bioprospecção e desenvolvimento tecnológico com potencial de aplicação em diferentes setores da economia. Para a atual proposta, o BANCO REGENERA foi incrementado com novos organismos bioluminescentes.

A bioluminescência é a emissão de luz por seres vivos, resultante de uma reação química provocada por um gene. Bactérias e fungos de origem marinha são apontados como importantes fontes de bioluminescência, visto que os grandes relatos desse fenômeno ocorrem no mar. Além disso, estes microrganismos têm o potencial de produzir energia elétrica a partir do seu metabolismo (bioeletroatividade), sendo considerada uma outra abordagem sustentável para a iluminação (Herring, 1997; Logan, 2009; Zarubin et al., 2012; Tanet et al., 2019; Syed & Anderson, 2021).

A proposta aqui apresentada é a segunda fase de um projeto já aprovado e executado, envolvendo duas “estratégias” para estabelecer uma solução que possa ser utilizada para a sinalização de rodovias. O objetivo da FASE II é desenvolver para teste em campo um sistema bioluminescente e um sistema sinalização com bioeletroatividade passível de aplicação em rodovias, uniformes e coletes a partir de microrganismos marinhos e de forma sustentável.

Em relação aos ganhos na área Ambiental, a iluminação proveniente de bactérias produz uma luz fria que diminui a radiação termal, é praticamente não poluente e não emite CO₂ (Jose et al., 2021). Graças a uma matéria-prima de origem biológica e biodegradável feita de bactérias marinhas que podem ser cultivadas infinitamente em laboratório, podemos reduzir o consumo de recursos limitados como a água (luzes de LED dependem de grande quantidade de água de hidrelétrica para seu funcionamento e não são

biodegradáveis), bem como a poluição gerada por sua extração, transformação e exportação, tendo como principal objetivo a redução dos efeitos nocivos da poluição luminosa e da poluição visual.

Em relação aos ganhos na operação em todo o sistema rodoviário, destaca-se o estabelecimento de uma nova tecnologia que seja autossustentável para uso em rodovias com elementos mais visíveis, diminuição da manutenção na sinalização de rodovias a longo prazo, diminuição dos custos e melhoria da capacidade visual, gerando assim um maior conforto e segurança aos usuários. Embora a iluminação biológica esteja dando os primeiros passos, é uma solução particularmente promissora, uma vez que apresenta inúmeras vantagens ambientais e de operação:

- (i) É um recurso inesgotável. As bactérias utilizadas podem ser cultivadas infinitamente. A biomassa resultante pode ser reciclada como energia renovável.
- (ii) A luz emitida é “fria”, a bioluminescência pode combater a poluição visual que atinge 80% da população.
- (iii) A bioluminescência permitiria utilizar menos recursos, emitir menos CO₂ para a atmosfera e proteger os ecossistemas animais e vegetais fragilizados pela iluminação pública tradicional.

Objetivos geral e específicos:

O objetivo geral deste projeto foi desenvolver para teste em campo sinalizações sustentáveis, dentro das abordagens (i) Bioluminescente e (ii) Bioeletroatividade, passíveis de aplicação em rodovias e/ou EPIs a partir de microrganismos marinhos.

Objetivos específicos para a abordagem Bioluminescência

1. Coletar microrganismos originários da biodiversidade marinha brasileira a fim de criar um estoque de organismos capazes de produzir bioluminescência;
2. Avaliar a produção de bioluminescência qualitativamente e quantitativamente a fim de selecionar os microrganismos mais promissores;
3. Selecionar a(s) cepa(s) bioluminescente(s) mais promissora(s) para sequenciamento do genoma completo, buscando os genes de interesse;

4. Desenvolver e otimizar uma formulação bioluminescente, utilizando uma abordagem de engenharia genética mais experimental (e.g., construção do plasmídeo, escolha do vetor, amplificação e clonagem dos genes de interesse) e/ou planejamento experimental (DoE).
5. Validar a formulação;
6. Desenvolver e testar o protótipo em campo.

Objetivos específicos para a abordagem Bioeletroatividade

7. Realizar testes de incremento de produção de energia pelas cepas dos microrganismos selecionados na FASE I do projeto;
8. Selecionar a(s) cepa(s) mais promissora(s) para sequenciamento do genoma completo, buscando os genes de interesse;
9. Selecionar a(s) cepa(s) mais promissora(s) para o emprego de técnicas moleculares e/ou otimização dos sistemas e do meio de cultivo;
10. Desenvolver e testar o protótipo em campo.

Organização do trabalho:

A Tabela abaixo apresenta as Etapas e Principais Atividades de cada abordagem do projeto.

Abordagem	Etapas	Principais Atividades
-	Aquisição de equipamentos	Aquisição dos seguintes equipamentos: Freezer; Computador; Microscópio; Espectrofotômetro; Autoclave; Capela de fluxo laminar; Centrífuga; Cuba e fonte de eletroforese; Banho seco; Fotodocumentador; Termociclador; Quantificador de DNA.

Bioluminescência	Etapa 01: coleta, isolamento e estoque	<ol style="list-style-type: none"> 1. Coleta e isolamento de microrganismos marinhos; 2. Avaliação da viabilidade dos microrganismos e desenvolvimento do estoque para ampliação da longevidade das linhagens.
	Etapa 02: avaliar a produção de bioluminescência qualitativamente	<ol style="list-style-type: none"> 1. Avaliar a produção de bioluminescência dos microrganismos isolados por meio de técnicas de microbiologia qualitativa – câmara escura.
	Etapa 03: avaliar a produção de bioluminescência quantitativamente	<ol style="list-style-type: none"> 1. Avaliar a produção de bioluminescência dos microrganismos isolados por meio de técnica de microbiologia quantitativa – espectrofotômetro; 2. Selecionar as cepas bioluminescentes de interesse e identificá-las em nível de espécie.
	Etapa 04: genoma completo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extração de DNA dos microrganismos para a análise do genoma completo; 2. Envio para sequenciamento do genoma; 3. Montagem do genoma; 4. Análise de genes de interesse.
	Etapas 05 e 06: planejamento molecular (estudo da construção do plasmídeo, escolha do vetor, amplificação do gene, clonagem) e experimental (DoE) para otimização	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estudo aprofundado sobre plasmídeos disponíveis; 2. Estudo aprofundado sobre gene de interesse e regiões regulatórias; 3. Planejamento da construção do plasmídeo e potenciais chassis; 4. Escolha do chassi para clonagem; 5. Desenho de <i>primers</i> para obtenção dos genes de interesse para clonagem; 6. Estudo sobre amplificação do gene; 7. Estudo sobre a Construção do vetor; 8. DoE 9. Validação.
	Etapa 07: formulação	<ol style="list-style-type: none"> 1. Testar diferentes formulações bioluminescentes; 2. Definir a formulação.
	Etapa 08: desenvolvimento do protótipo e teste em campo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Desenvolvimento do protótipo; 2. Produção de biomassa em bioreator dos tratamentos a serem testados nas rodovias; 3. Aplicação simulando o campo; 4. Definição da qualificação dos parâmetros; 5. Análise estatísticas dos dados observados.
	Bioeletroatividade	Etapa 01: ativação, validação e seleção de tratamentos no contexto de bioeletroatividade
Etapa 02: investigação do genoma completo das cepas associadas a eletroatividade		<ol style="list-style-type: none"> 1. Extração de DNA do(s) microrganismo(s) para a análise do genoma completo; 2. Envio para sequenciamento do genoma; 3. Montagem do genoma; 4. Análise de genes de interesse; 5. Otimização.

	Etapa 03: desenvolvimento do protótipo e teste em campo	<ol style="list-style-type: none">1. Desenvolvimento do protótipo em larga-escala;2. Produção de biomassa em bioreator dos tratamentos a serem testados nas rodovias;3. Aplicação simulando o campo;4. Definição da qualificação dos parâmetros;5. Análise estatísticas dos dados observados.
--	--	---

Período de desenvolvimento do projeto:

01/11/2023 a 31/10/2025

Cronograma de execução:

O quadro abaixo apresenta o cronograma de execução do projeto em 24 meses, sendo a entrega de 3 Relatórios Parciais realizados em abril/2024, out/2024 e abril/2025 e do Relatório Final em nov/2025.

Período		2023		2024									
Abordagem	Etapas	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out
Bioluminescência	Etapa 01: coleta, isolamento e estoque												
	Etapa 02: avaliar a produção de bioluminescência qualitativamente												
	Etapa 03: avaliar a produção de bioluminescência quantitativamente												
	Etapa 04: genoma completo												
	Etapas 05 e 06: planejamento molecular (estudo da construção do plasmídeo, escolha do vetor, amplificação do gene, clonagem) e experimental (DoE) para otimização												
	Etapa 07: formulação												
	Etapa 08: desenvolvimento do protótipo e teste em campo												
Bioeletroatividade	Etapa 01: ativação, validação e seleção de tratamentos no contexto de bioeletroatividade												
	Etapa 02: investigação do genoma completo das cepas associadas a eletroatividade												
	Etapa 03: desenvolvimento do protótipo e teste em campo												
Período		2024		2025									
Abordagem	Etapas	nov	dez	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out
Bioluminescência	Etapa 01: coleta, isolamento e estoque												
	Etapa 02: avaliar a produção de bioluminescência qualitativamente												
	Etapa 03: avaliar a produção de bioluminescência quantitativamente												
	Etapa 04: genoma completo												
	Etapas 05 e 06: planejamento molecular (estudo da construção do plasmídeo, escolha do vetor, amplificação do gene, clonagem) e experimental (DoE) para otimização												
	Etapa 07: formulação												
	Etapa 08: desenvolvimento do protótipo e teste em campo												
Bioeletroatividade	Etapa 01: ativação, validação e seleção de tratamentos no contexto de bioeletroatividade												
	Etapa 02: investigação do genoma completo das cepas associadas a eletroatividade												
	Etapa 03: desenvolvimento do protótipo e teste em campo												

Local de execução:

REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A., com antiga sede na cidade de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, na Av. Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421 - Setor IV - Sala 117, Bairro Agronomia, CEP 91501-970 (Cx. Postal 15005); e sede atual na cidade de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, na

Av. Ipiranga 6681 - Prédio 96D- Sala 210, Bairro Partenon, CEP 90619-900. Site: <https://regeneramoleculas.com.br/>

LAPEC – Laboratório de Pesquisa em Corrosão – UFRGS com sede na cidade de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, na Av. Bento Gonçalves - 43427, 2º Andar - Setor IV Bairro Agronomia, CEP 91501-970. Site: <https://www.ufrgs.br/lapec/>.

Equipe executora:

O projeto foi executado por uma equipe multidisciplinar com perfil diversificado, focado em áreas como biotecnologia, biologia, química, física, engenharia, gestão da qualidade e gestão de projetos.

Dr. Mário Luiz Conte da Frota Júnior – Coordenador Geral do Projeto

Diretor-Presidente e Sócio-Fundados da REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. Graduado em Ciências Biológicas – Ênfase Molecular e Funcional (2002) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica (2005) e Doutor em Ciências Biológicas - Bioquímica (2008) pela UFRGS; Pós-Doutorado (Programa PNPd-CNPq/Capes) no PPG-Bioquímica/UFRGS (2008 - 2013). (Link do Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7777625656290021>).

Dra. Vanessa Ochi Agostini – Coordenadora Técnica do Projeto

Especialista de P&D II na REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. Graduada em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira (2012) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Mestre em Oceanografia Biológica (2014) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG); Doutora em Oceanografia Biológica (2018) – FURG com sanduíche no Istituto di Scienze Marine (ISMAR), Itália; Pós-Doutorado (Programa PNPd-CAPES) no PPG Oceanologia/FURG (2018-2020); Pós-Doutorado (Programa PDI-CNPq) na REGENERA (2020-2021); Especialista em Gestão de Projetos (2025) - Faculdade Metropolitana de Franca, FAMEF (Link do Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7539912325046266>).

Dr. Alexandre José Macedo – Consultor do Projeto

Sócio-Fundados da REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. Graduado em Química (1999) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Mestre em Biologia Celular e Molecular (2002) – UFRGS; Doutor em Ciências Naturais - Microbiologia (2006) – Helmholtz Centre for Infection Research,

Alemanha.

Esp. Jéssica Scherer – Pesquisadora do Projeto

Gerente de P&D na REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. Graduada em Biotecnologia – Ênfase em Biotecnologia Molecular (2015) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); MBA em Gestão da Qualidade e Engenharia de Produção (2019 – 2021) – Instituto de Pós-Graduação e Graduação (IPOG).

Dr. Adilar Gonçalves dos Santos Jr. – Pesquisador do Projeto (remunerado com recurso RDT) – Nov/23 a Ago/25

Graduado em Engenharia Mecânica (2009) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI); Especialista em Engenharia de Campo – Ênfase Construção e Montagem (2013) - Universidade Federal do Rio Grande (FURG); Mestre em Engenharia Mecânica (2016) - FURG e Doutor em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (2021) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Yasmin de Castro Coelho de Souza – Bolsista do Projeto (remunerada com recurso RDT) – Jan/24 a Jun/24

Graduação em andamento (durante o período de contratação) em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS).

Gabriel Stracke Oliveira – Bolsista do Projeto (remunerado com recurso RDT) – Jul/24 a Dez/24 Técnico em Biotecnologia (2023) - Instituto Federal de Ciências e Tecnologias do Rio Grande do Sul; Graduação em andamento em Biotecnologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Daniela Arantes de Almeida – Equipe Ecovias Cerrado

Coordenadora de Sustentabilidade na Ecovias Cerrado. Graduada em Engenharia Ambiental (2016) – Universidade Federal de Uberlândia (UFU); Pós graduação em Gestão Ambiental (2018) – Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM); MBA em andamento em ESG Sustentabilidade e Inovação – Trevisan Escola de Negócios.

Andressa de Moura Silva – Equipe Ecovias Cerrado

Analista de Sustentabilidade Sr. na Ecovias Cerrado. Graduada em Engenharia Ambiental (2018) – Universidade Federal de Uberlândia (UFU); MBA em andamento em ESG e impact – Trevisan Escola de Negócios.

2. MÉTODOS E TÉCNICAS UTILIZADAS

2.1. Aquisição de equipamentos

Para desenvolvimento do projeto, foram adquiridos os seguintes equipamentos com recursos RDT:

- Freezer;
- Computador;
- Microscópio;
- Espectrofotômetro;
- Autoclave;
- Capela de fluxo laminar;
- Centrífuga;
- Cuba e fonte de eletroforese;
- Banho seco;
- Fotodocumentador;
- Termociclador;
- Quantificador de DNA.

Considerando a opção da Concessionária por não arrolar os equipamentos como bens da concessão, foi protocolada a carta ECC-GAC-1098-2025 (SEI 37236413) solicitando autorização da Agência para dar seguimento aos trâmites de doação dos equipamentos.

2.2. Abordagem bioluminescência

Microrganismos marinhos foram isolados de tecidos animais e vegetais marinhos frescos (e.g., peixes, algas e moluscos), água, substratos consolidados (e.g., pilares e basalto), bem como de sedimentos marinhos, a fim de compor um BANCO de microrganismos bioluminescentes. Para a seleção dos microrganismos de interesse, o material coletado foi ressuspendido, inoculado e incubado em meios de cultivo líquidos e sólidos específicos (TCBS, LB, LM, LSW70, SWC). Após o período de incubação foi realizada a seleção dos organismos que apresentaram bioluminescência (observação em sala escura), os quais foram isolados e estocados (-80°C) para uso nas posteriores etapas do projeto. Os microrganismos isolados foram investigados qualitativamente em relação a produção de bioluminescência. Para tal, foram cultivados em meio sólido específico e avaliados quanto à produção de bioluminescência em câmara escura, utilizando o *software Living Image 3.1*. Os microrganismos isolados e que apresentaram atividade qualitativa tiveram sua bioluminescência quantificada em espectrofotômetro. Os microrganismos que produziram maiores intensidades luminosas e por mais tempo foram selecionados e tiveram o seu genoma completo analisado. A fim de otimizar a atividade de bioluminescência, algumas estratégias moleculares e de planejamento experimental (DoE) foram estudadas: plasmídeos disponíveis; genes de interesse e regiões regulatórias; construção do plasmídeo e potenciais chassis; formas de conjugação, fatores nutricionais e ambientais. Posteriormente, à otimização realizada, foram avaliadas estratégias de formulação. A produção do microrganismo selecionado foi escalonado em biorreator e os protótipos (sinalização de rodovias e EPI) foram testados em campo. Dentre os parâmetros avaliados em campo, inclui-se: intensidade da bioluminescência, a distância, ofuscamento de faróis e a duração, viabilidade do sistema, validação, poluição visual, delineamento de pista, tempo entre manutenções, resistência à interpéries.

2.3. Abordagem bioeletroatividade

Os 22 microrganismos, selecionados na Fase I do projeto, foram ativados e comparados em relação a produção de energia em células combustíveis microbianas em meio marinho artificial (MD), mensurada pela diferença de potencial utilizando um multímetro (BOM-6007-BOMVINK). Após ensaios quantitativos, o microrganismo com maior produção de bioeletroatividade foi selecionado para a obtenção do genoma completo, para auxiliar na otimização da atividade. Para o desenvolvimento de dispositivo microbiano para geração de energia a partir de eletroatividade de microrganismos, foram avaliadas diferentes características das células combustíveis microbianas (tamanho, proporção,

substratos, ponte salina), bem como características de crescimento do microrganismo (meio de cultivo, temperatura, pH, salinidade). Após os parâmetros definidos, o microrganismo foi escalonado em biorreator para compor o protótipo de tente em campo, baseado no projeto desenvolvido na Fase I. Dentre os parâmetros avaliados em campo, inclui-se: intensidade da bioluminescência, a distância, ofuscamento de faróis e a duração, viabilidade do sistema, validação, poluição visual, delineamento de pista, tempo entre manutenções, resistência à interpéries.

3. ETAPAS DA ABORDAGEM BIOLUMINESCÊNCIA

3.1. ETAPA 01: coleta, isolamento e estoque

3.1.1. Coleta e isolamento de microrganismos marinhos

Foram realizadas coletas microbiológicas em novembro de 2023 com o objetivo de obter microrganismos marinhos bioluminescentes. Para tal, foram selecionados meios de cultivo sólidos e líquidos que favorecem o crescimento destes microrganismos (LB, LM, SWC, LSW), levantados a partir da literatura especializada. Basicamente, os meios continham uma combinação de nutrientes, tais como: Peptona Bacteriológica, Triptona, Extrato de Levedura, Glicerol e Sal. Os microrganismos foram coletados em ambiente marinho (água, sedimento e superfícies de substratos e organismos) no litoral norte do Rio Grande do Sul (Imbé, Tramandaí, Torres) (Figura 1).



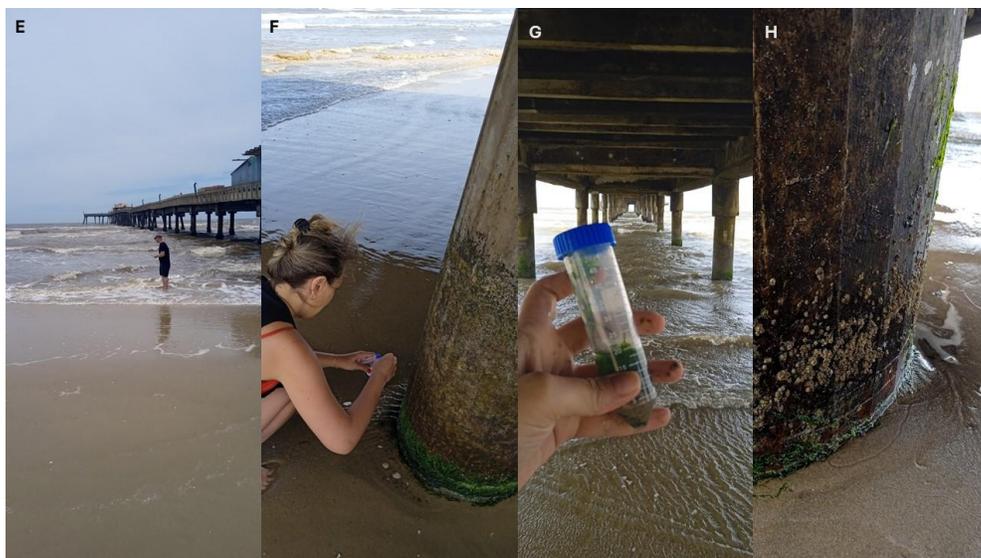


Figura 1. Pontos de coleta de microrganismos bioluminescentes. A: Costão Rochoso de Torres, RS. B: Planta aquática, C: Peixe morto, D: Plataforma de Pesca de Cidreira, RS após a arrebentação, E: Plataforma de Pesca de Tramandaí, RS pré-arrebentação, F: coleta por esfregaço em pilar da plataforma de pesca, G: algas coletadas dos pilares da plataforma de pesca, H: organismos incrustantes presentes nos pilares da plataforma de pesca.

O processo de isolamento dos microrganismos de interesse ocorreu em laboratório. Onde as amostras coletadas foram estriadas nos meios de cultivo sólidos e incubadas a 28°C. A cada 24h de crescimento, as colônias foram sendo separadas em novos meios de cultivo até a obtenção do isolamento dos microrganismos de interesse. Para constatação da atividade de bioluminescência, os organismos foram avaliados em sala escura (Figura 2).

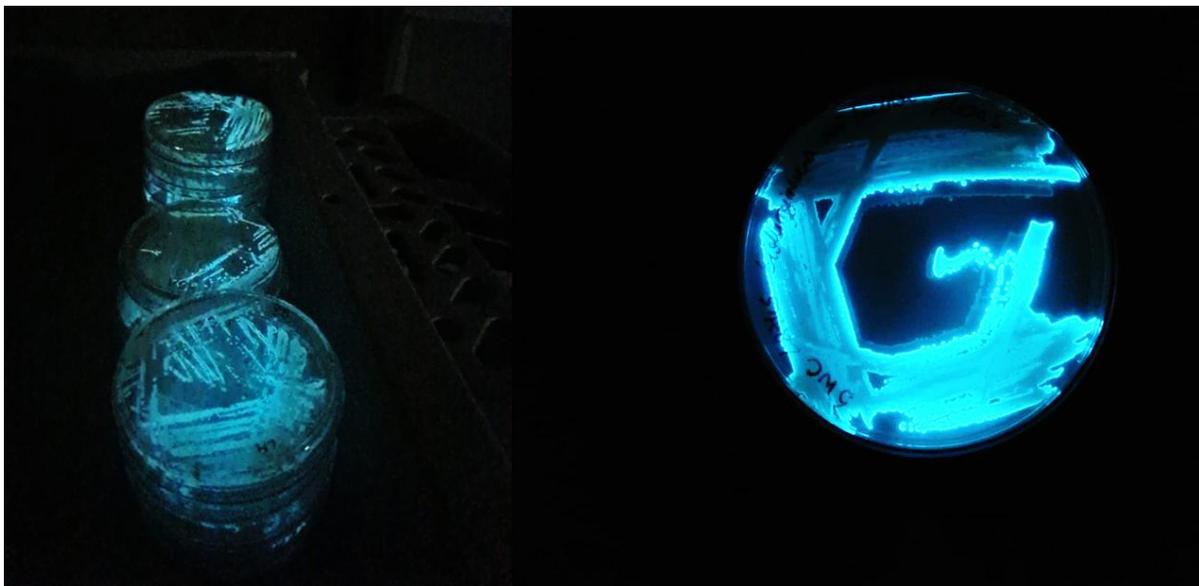


Figura 2. Fotos das bactérias bioluminescentes do BANCO REGENERA isoladas, em sala escura.

3.1.2. Ativação e avaliação da viabilidade dos microrganismos e desenvolvimento do estoque para ampliação da longevidade das linhagens

No total, foram isoladas 44 bactérias bioluminescentes, as quais seguiram para as próximas etapas do projeto. Após incubação a 28°C por 24h, nos meios de isolamento, o fenótipo dos microrganismos foi confirmado macroscopicamente e microscopicamente (análise de Gram). Estoques foram feitos (meio base acrescido de 15% de glicerol) e mantidos a -80°C, garantindo a longevidade das linhagens e a viabilidade para as próximas etapas do projeto (Tabela 1).

Tabela 1. Código de identificação dos microrganismos bioluminescentes (REF#) e seu respectivo meio de cultivo de isolamento (meio base).

REF #	Meio	REF #	Meio	REF #	Meio	REF #	Meio
1483	LB	1548	LM	1538	LSW70	1486	SWC
1505	LB	1549	LM	1540	LSW70	1487	SWC
1516	LB	1550	LM	1541	LSW70	1488	SWC
1517	LB	1551	LM	1543	LSW70	1544	SWC
1533	LB	1552	LM	1546	LSW70	1554	SWC
1542	LB	1484	LSW70	1559	LSW70	1555	SWC
1547	LB	1485	LSW70	1560	LSW70	1556	SWC
1553	LB	1504	LSW70	1561	LSW70	1557	SWC
1482	LM	1534	LSW70	1562	LSW70	1558	SWC
1537	LM	1535	LSW70	1563	LSW70	1564	SWC
1539	LM	1536	LSW70	1566	LSW70	1565	SWC

3.2. ETAPA 02: avaliação da produção de bioluminescência qualitativamente

3.2.1. Avaliação da produção de bioluminescência dos microrganismos isolados por meio de técnicas de microbiologia qualitativa – câmara escura

Os 44 microrganismos bioluminescentes foram avaliados qualitativamente. O objetivo foi selecionar os microrganismos com maior intensidade luminosa (observação em sala escura), maior durabilidade da bioluminescência (tempo) e que apresentassem reprodutibilidade (três repetições). Para tal, os microrganismos foram repicados com palito estéril a partir do estoque do projeto (-80° C) nos seus respectivos meios base (i.e., LM ou LSW70 ou SWC ou LB). Após o repique, os microrganismos foram incubados a 28°C por 10 dias.

Os microrganismos que apresentaram intensidade luminosa significativa, durabilidade da atividade e reprodutibilidade nos três ensaios desenvolvidos foram o 1485, 1533, 1534, 1535, 1536, 1543, 1546, 1551, 1554, 1561, 1563 e 1564 (Figura 3).

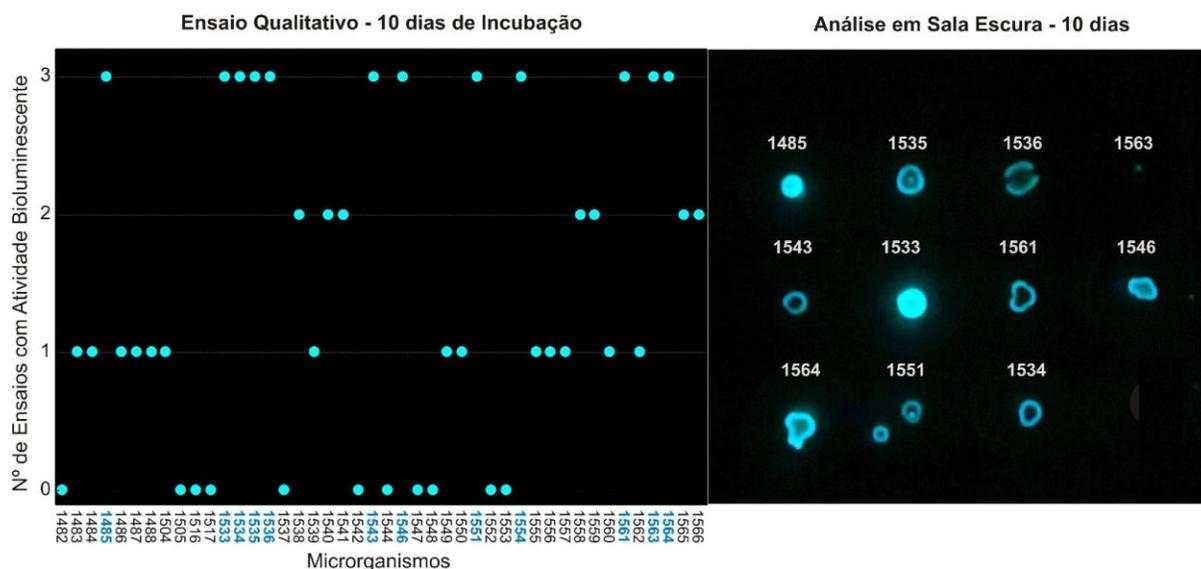


Figura 3. Gráfico com os resultados da seleção de microrganismos por reprodutibilidade de bioluminescência após três ensaios com incubação de 10 dias (28° C) (esquerda) e fotos das colônias com 10 dias de exposição em sala escura (direita).

Os microrganismos selecionados foram então avaliados qualitativamente por 30 dias. A avaliação se deu a partir de repique com palito da mesma forma do ensaio anterior com o objetivo de investigar a reprodutibilidade de bioluminescência após 30 dias (28° C) em quatro ensaios. Os microrganismos 1485

e 1564 apresentaram o maior tempo de bioluminescência de forma reproduzível (Figura 4).

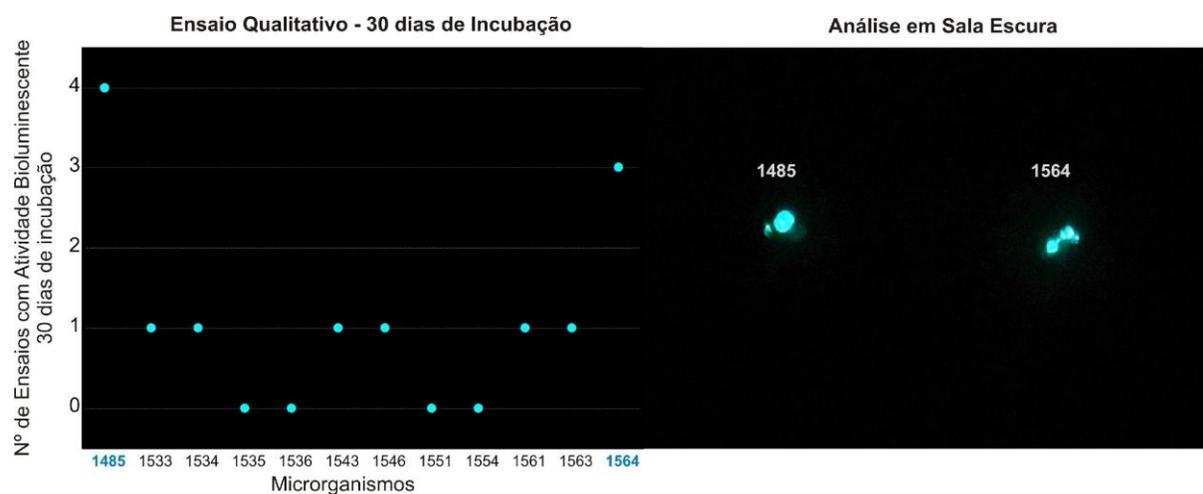


Figura 4. Gráfico com os resultados da seleção de microrganismos por reprodutibilidade de bioluminescência após quatro ensaios com incubação de 30 dias (28° C) (esquerda) e fotos das colônias com 10 dias de exposição em sala escura (direita).

Por se tratarem de microrganismos isolados em meios de cultivo sólidos diferentes (LM, LB, LSW70, SWC), optou-se por cultivar todos os microrganismos selecionados em todos os meios garantindo a maior expressão da bioluminescência. Além disso, foi avaliada a influência de vitamina B₂ (Riboflavina) para a ocorrência da atividade de bioluminescência, pois segundo informações da literatura (Fischer et al. 2004) a presença da vitamina poderia otimizar a atividade. As observações de bioluminescência foram realizadas em sala escura com 10, 20 e 30 dias de incubação (28°C).

Os dados qualitativos de intensidade luminosa e diâmetro da colônia obtidos foram tratados estatisticamente através de um Dendrograma (*Cluster*) que tem como finalidade avaliar a similaridade ou dissimilaridade (índice Euclidiano) entre os tratamentos. A avaliação foi feita para cada tempo de exposição. Os resultados demonstraram que o meio LM e LB se destacaram por influenciar o crescimento dos microrganismos. Já os meios LSW70 e SWC, a intensidade luminosa, sendo o LSW70 mais influente no primeiro período de avaliação, enquanto o SWC nos demais. A vitamina B₂ somente teve influência na intensidade luminosa após 30 dias de exposição, influenciando na manutenção da atividade (Figura 5).

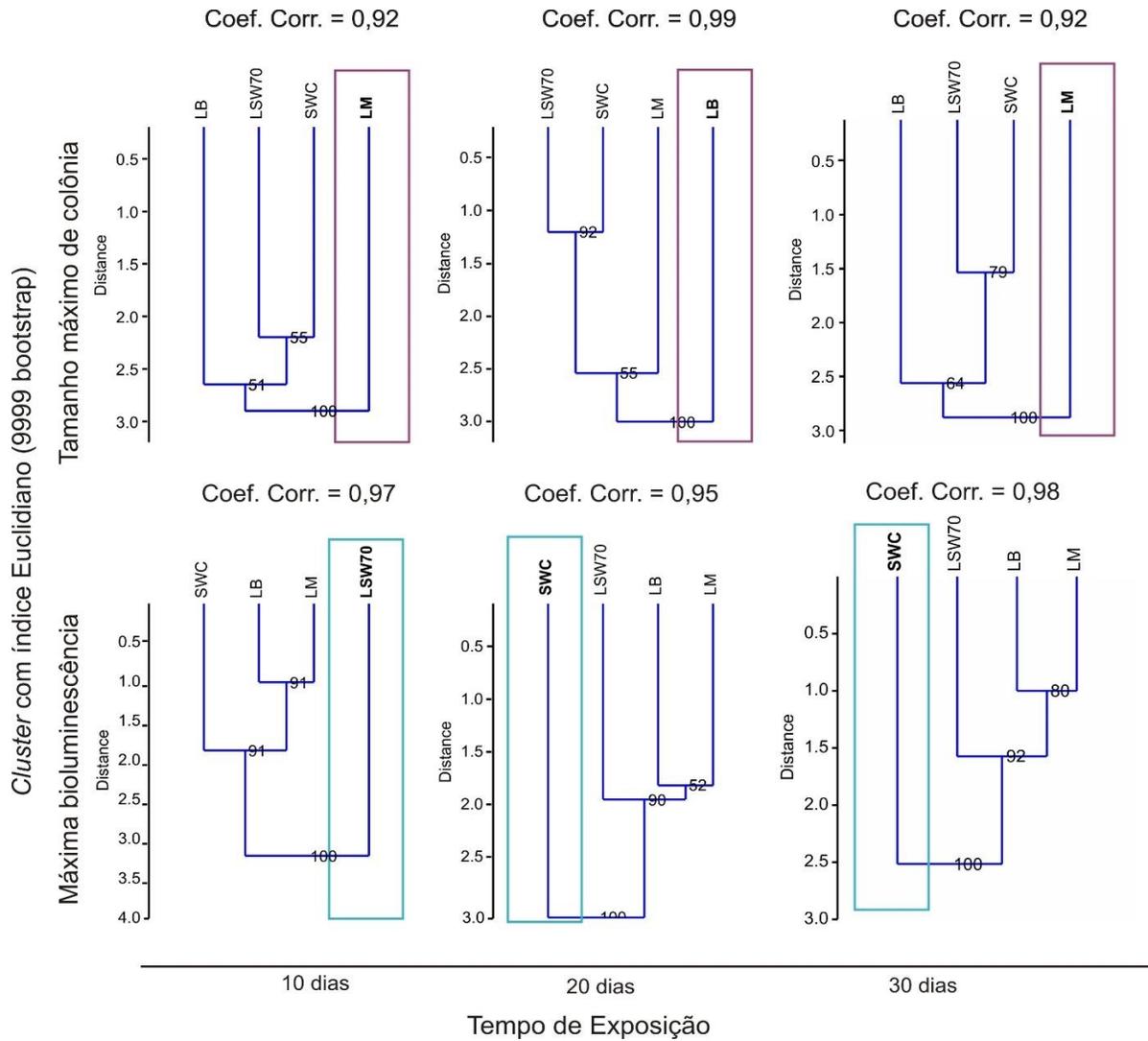


Figura 5. Dendrograma (*Cluster*) com índice Euclidiano ordenando os meios de cultivo em relação à atividade de bioluminescência e tamanho da colônia com 10, 20 e 30 dias de exposição entre os tratamentos.

A Figura 6 apresenta a intensidade luminosa obtida para cada microrganismo e tratamento com 30 dias de exposição em sala escura.

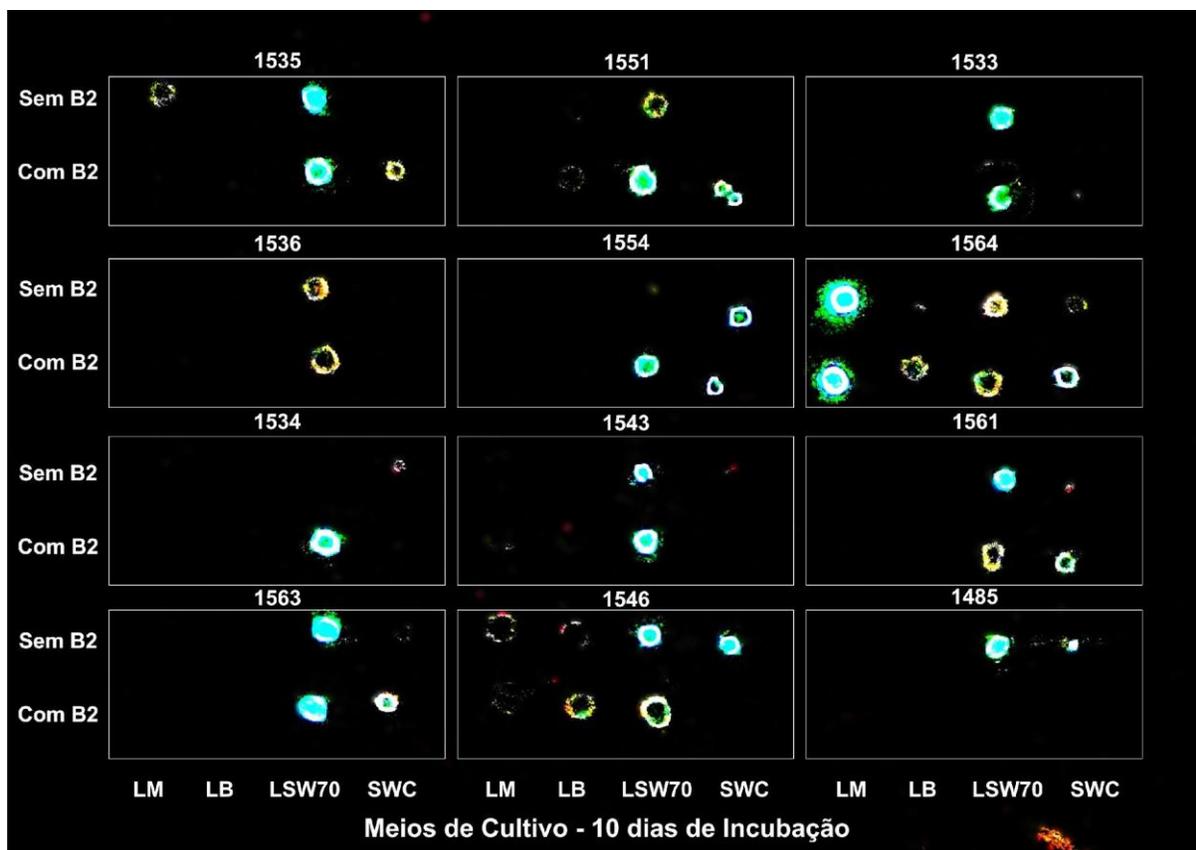


Figura 6. Fotografia tirada em sala escura demonstrando a intensidade luminosa de cada microrganismo por tratamento, após 10 dias de incubação (28°C).

Para otimizar a atividade de bioluminescência e unificar o meio de uso para os ensaios quantitativos, evitando interferências na interpretação dos resultados, foi criado um meio Bioluminescente Alternativo (BA), mesclando os meios de isolamento. A Tabela 2 apresenta a composição dos meios de cultivo de isolamento, bem como a composição do meio BA.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo avaliados para atividade de bioluminescência.

Composição dos meios de cultivo para microrganismos bioluminescentes									
Nutrientes	g/L				mL/L		mL		Salinidade final
	Pep Bac	E Lev.	Trip	NaCl	Glicerol	H ₂ Odest	H ₂ Omar		
LSW0	0	5	10	0	0	250	750	22,5 PSU	
SWC	5	3	0	0	3	300	700	21 PSU	
LB	0	5	10	10	0	1000	0	8 PSU	
LM	10	5	0	30	0	1000	0	25 PSU	
BA	10	5	10	0	3	500	500	15 PSU	

Para fins de validação, os microrganismos selecionados foram repicados no meio BA sólido e

incubados a 28°C por 24h. A Figura 7 apresenta a intensidade luminosa para cada microrganismo em meio BA com um dia de incubação.

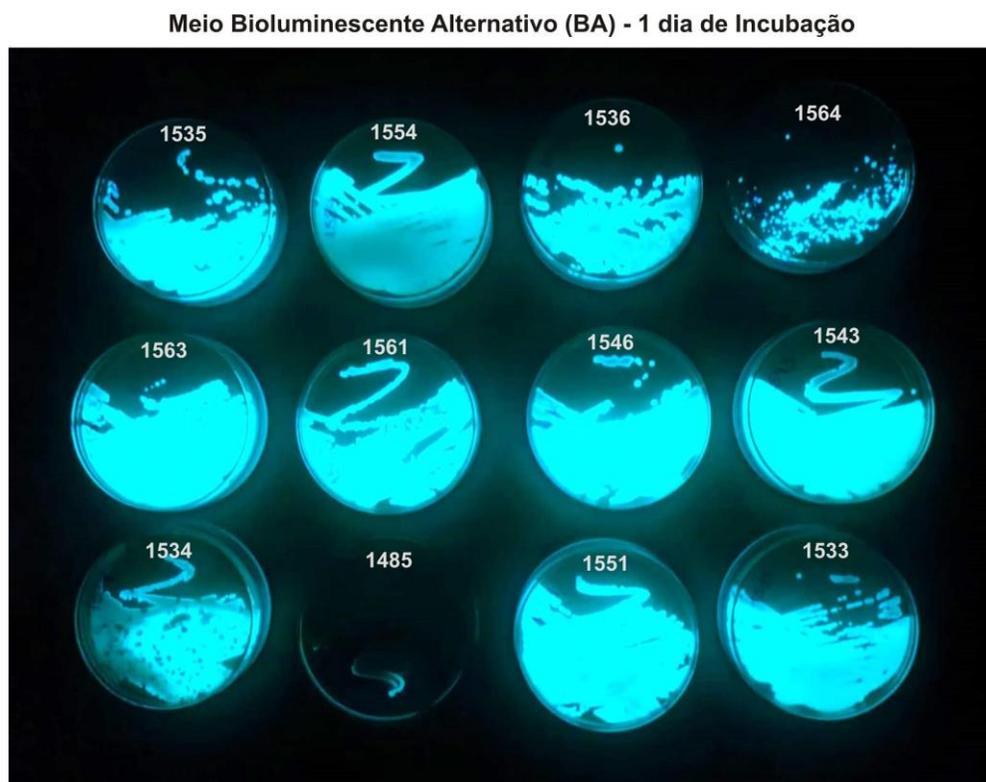


Figura 7. Microrganismos selecionados para a fase quantitativa avaliados em meio sólido BA em sala escura com um dia de incubação (28° C).

3.3. ETAPA 03: avaliação da produção de bioluminescência quantitativamente

3.3.1. Avaliação da produção de bioluminescência dos microrganismos isolados por meio de técnica de microbiologia quantitativa – espectrofotômetro

Ensaio quantitativos foram realizados com os microrganismos selecionados: 1485, 1533, 1534, 1535, 1536, 1543, 1546, 1551, 1554, 1561, 1563 e 1564. Para tal, os microrganismos foram repicados em meio sólido BA e incubados a 28°C. Os microrganismos foram analisados em câmera escura (IVIS ILUMINA) com 1, 5, 10, 20 e 30 dias de incubação. O ensaio foi repetido três vezes. A Análise de Variância (ANOVA *One-Way*) foi utilizada como método estatístico, seguido do teste a *post hoc* de Tukey. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos da intensidade luminosa (fótons/s) média de cada microrganismo por tempo de exposição.

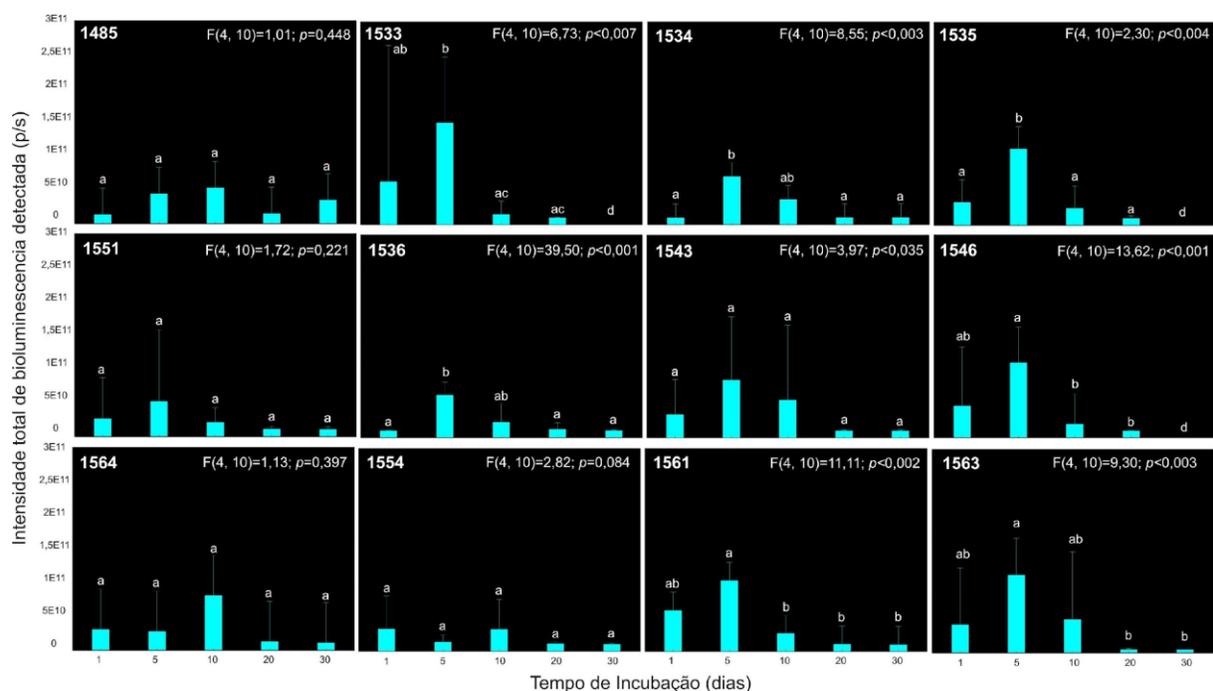


Figura 8. Microrganismos selecionados em meio sólido BA avaliados quantitativamente (fótons/s) em câmara escura (IVIS LUMINA) com até 30 dias de incubação (28° C). Letras diferentes para o mesmo microrganismo denotam diferenças significativas de intensidade luminosa entre os tempos de exposição ($p<0,05$) com 95% de confiança.

A Figura 9 apresenta a escala de intensidade luminosa (fótons/s), obtida em câmara escura pelo *software* IVIS LUMINA, para cada microrganismos com 30 dias de incubação

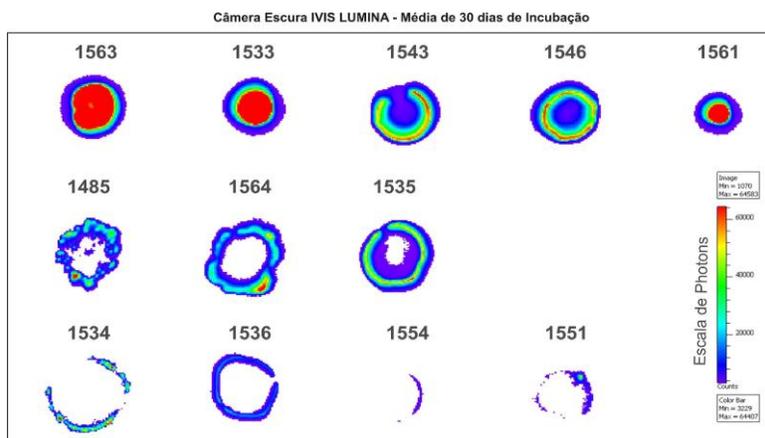


Figura 9. Microrganismos selecionados em meio sólido BA avaliados quantitativamente (fótons/s) em câmara escura (IVIS LUMINA) com 30 dias de incubação (28° C).

Um ensaio quantitativo foi realizado em meio BA líquido e avaliado com 0, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 144

e 240 h de incubação a 28°C. Para tal, os microrganismos foram repicados em meio BA sólido e após 24h de incubação foram inoculados em meio BA líquido em densidade óptica inicial (OD_{600nm}) de 0,05. O ensaio foi realizado em duplicata e as medições foram realizadas em espectrofotômetro (Agilent BioTekSynergyH1). As Tabelas 3 e 4 apresentam os dados obtidos de luminescência (fótons/s) e densidade óptica (600nm), respectivamente, para cada microrganismo.

Tabela 3. Luminescência (fótons) obtidos em espectrofotômetro.

Fótons/s	1485	1533	1534	1535	1536	1543	1546	1551	1554	1561	1563	1564
Máximo	114840	117441	128190	167879	144349	299207	123924	156982	238774	151222	198451	199541
Mínimo	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	2	2
Média	15366	12611	11895	19472	16654	34178	14172	22462	28411	14746	29066	24469
Média 0h	10253	8309	13959	510	1512	9416	2931	13012	1009	419	24709	22807
Média 2h	743	961	950	46	134	3593	586	4896	182	9	350	99
Média 4h	848	152	236	31	10	75	22	16291	8	971	63	46
Média 6h	57	3	187	4	4	3	4	443	6	9	698	723
Média 24h	8	85	3	4	12	167	102	7	4	5	4	17
Média 48h	68266	64231	53607	106514	91939	182817	77687	100017	150528	77325	126285	126276
Média 72h	40975	29421	27188	50967	41474	79833	33688	45231	74992	41898	71303	43929
Média 144h	7840	3838	4361	5600	5799	11672	4984	9974	10732	3862	15891	10669
Média 240h	5663	2838	3360	6839	4415	11542	3575	6175	12135	4299	18222	10365

Tabela 4. Densidade óptica (600nm) obtidos em espectrofotômetro.

OD (600nm)	1485	1533	1534	1535	1536	1543	1546	1551	1554	1561	1563	1564
Máximo	1,610	1,220	2,020	0,920	1,170	1,320	1,250	2,180	1,130	1,020	2,270	2,020
Mínimo	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Média	0,540	0,630	0,830	0,460	0,680	0,710	0,650	0,920	0,540	0,490	0,880	0,800
Média 0h	0,080	0,100	0,120	0,110	0,100	0,120	0,110	0,130	0,110	0,130	0,120	0,080
Média 2h	0,270	0,320	0,370	0,350	0,350	0,370	0,340	0,370	0,350	0,320	0,360	0,290
Média 4h	0,300	0,360	0,380	0,380	0,330	0,400	0,370	0,370	0,400	0,380	0,400	0,330
Média 6h	0,290	0,360	0,380	0,390	0,320	0,400	0,350	0,380	0,400	0,390	0,390	0,350
Média 24h	0,530	0,670	0,950	0,500	0,760	0,770	0,750	1,040	0,560	0,490	1,080	1,020
Média 48h	0,700	0,880	1,140	0,510	1,080	1,010	1,010	1,410	0,560	0,490	1,240	1,160
Média 72h	0,710	0,910	1,180	0,510	1,160	1,080	1,070	1,480	0,650	0,530	1,180	1,060
Média 144h	0,950	0,950	1,390	0,660	0,980	1,010	0,870	1,490	0,750	0,700	1,480	1,310
Média 240h	1,060	1,140	1,580	0,770	1,070	1,220	0,920	1,660	1,050	0,990	1,710	1,560

Foi realizada uma ANOVA *Two Way* para verificar se os ensaios seriam considerados

reprodutíveis. Foram registradas diferenças significativas entre os tempos de avaliação e entre o Ensaio 1 e o Ensaio 2 para todos os microrganismos em pelo menos um dos tempos de avaliação ($p < 0,01$).

3.3.2. Selecionar as cepas bioluminescentes de interesse e identificá-las a nível de espécie

A seleção dos microrganismos para as próximas fases foi realizada por critério de classificação (ranking para cada ensaio). As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados do ranqueamento dos microrganismos em meio sólido e líquido, respectivamente.

Tabela 5. Ranqueamento dos microrganismos bioluminescentes em relação aos ensaios em meio sólido. Valores menores denotam melhor atividade. Bri. Vis. = Brilho Visível, Lum. Cam. E. = Luminescência em Câmara Escura, Lum. Méd. Câmara E. = Luminescência Média em Câmara Escura.

Classificação - Ensaio em meio sólido								
REF#	Bri. Vis. 10d	Bri. Vis. 30d	Bri. Vis. 45d	Lum. Camara E. 10d	Lum. Camara E. 30d	Lum. Camara E. 45d	Lum. Méd. Camara E. 30d	Ranking
1485	2	1	0	1	1	1	8	2
1533	3	3	0	12	12	12	2	6,3
1534	3	3	2	3	10	10	9	5,7
1535	2	4	0	11	5	5	6	4,7
1536	4	4	0	9	7	7	11	6
1543	3	3	2	5	6	6	5	4,3
1546	3	3	0	6	11	11	4	5,4
1551	2	4	0	8	3	3	10	4,3
1554	3	4	0	4	2	2	12	3,9
1561	3	3	0	10	8	8	3	5
1563	2	3	2	2	9	9	1	4
1564	1	2	1	7	4	4	7	3,7

Tabela 6. Ranqueamento dos microrganismos em relação aos ensaios em meio líquido. Valores menores denotam melhor atividade. Bri. Vis. = Brilho Visível, Lum. Cam. E. = Luminescência em Câmara Escura, Lum. Méd. Câmara E. = Luminescência Média em Câmara Escura.

Classificação - Ensaio em meio líquido						
REF#	Int. Lum. Esp. Média 10d E1	Lum. Espc. Máx 10d E1	Lum. Espc. Tempo E1	Int. Lum. Esp. Média 10d E2	Lum. Espc. Máx 10d E2	Ranking
1485	8	10	3	6	8	7
1533	11	11	1	8	7	7,6
1534	12	12	3	7	6	8

1535	6	5	3	11	10	7
1536	7	7	3	10	9	7,2
1543	1	1	1	2	2	1,4
1546	9	8	1	12	12	8,4
1551	5	6	2	5	3	4,2
1554	3	2	3	3	4	3
1561	10	9	3	4	5	6,2
1563	2	4	3	1	1	2,2
1564	4	3	3	9	11	6

Os microrganismos selecionados baseados no ranqueamento foram: 1485, 1543, 1554, 1563 e 1564. Para fins de formulação, foi avaliada a capacidade dos microrganismos em formar biofilme. Para tal, os cinco microrganismos foram inoculados em placa multipoços escura em tréplica com OD inicial conhecida (0,05). Foi realizada a leitura de luminescência planctônica inicial, posteriormente a placa foi incubada por 24h a 28°C, sendo então realizada a leitura da luminescência planctônica final. Para leitura do biofilme luminescente, todo o sobrenadante foi removido. As cinco bactérias foram capazes de produzir biofilme luminescente (Tabela 7).

Tabela 7. Capacidade de formação de biofilme luminescente.

LUM (fótons)	1485	1543	1554	1563	1564	Controle
Luminescência Planctônica Inicial	407256	359113	257727	206036	249144	7
Luminescência Planctônica Final	750896	4848702	1524983	3912289	2875157	27
Luminescência do Biofilme	19000	32293	33501	60000	36056	8

A partir disso foi investigado por Correlação de Pearson (r) os fatores que estariam influenciando positivamente ou negativamente a atividade de bioluminescência dos microrganismos. Os fatores correlacionados foram: Brilho visível (observação em sala escura), Luminescência (leitura em espectrofotômetro), Biomassa (quantidade de microrganismos) e tempo. A Figura 10 apresenta a correlação dos fatores.

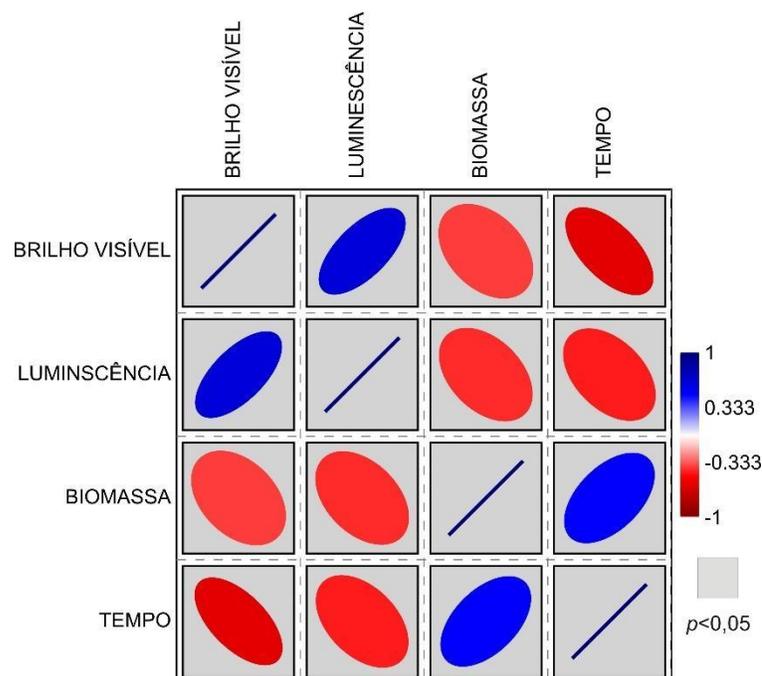


Figura 10. Correlação de Pearson entre fatores quantitativos. Elipses azuis = correlações positivas, Elipses vermelhas = correlações negativas.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) é uma medida adimensional que pode assumir valores no intervalo entre -1 e +1. O coeficiente mede a intensidade e a direção de relações lineares (Figueiredo Filho & Silva Júnior, 2009). Os resultados demonstraram que quanto maior é a Luminescência mais fácil fica a observação humana da atividade (Brilho Visível) e que quanto maior a densidade de microrganismos e o tempo de incubação, menor é o Brilho Visível e a Luminescência registradas. A densidade bacteriana e o tempo de incubação refletem diretamente na concentração de oxigênio dissolvido no meio, por esse motivo estes fatores apresentaram correlação negativa com a atividade de interesse. Isso porque a reação de bioluminescência catalisada pela luciferase requer oxigênio (Lee et al., 2019). Registros de brilho sutil visível foram registrados com um mínimo de 146 fótons. Já para um Brilho Visível intenso o mínimo registrado foi de 4277 fótons de Luminescência. Desta forma, temos que garantir uma maior manutenção da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.

Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) é uma ferramenta útil na aquicultura para aumentar a concentração de oxigênio dissolvido na água (Jordan et al., 2024). Por esse motivo, foi realizado um ensaio com os microrganismos selecionados expostos ao meio de cultivo com e sem a adição de H_2O_2 . Estes microrganismos foram então avaliados quanto a necessidade de aumentar a concentração de oxigênio dissolvido no meio ao longo do tempo, utilizando como ferramenta a adição de H_2O_2 . O ensaio

foi executado seguindo a metodologia já descrita. Nos tratamentos onde a intenção era aumentar a concentração de oxigênio dissolvido, foi adicionado 100 µL de H₂O₂ a 30% estéril a cada 5mL de meio (Jordan et al., 2024), sendo a adição realizada com 0h, 3 dias e 7 dias.

Os resultados demonstram que a adição de H₂O₂ aumentou a intensidade de bioluminescência de forma geral (Tabela 8). A densidade óptica não apresentou diferença significativa com e sem a adição de H₂O₂ (Tabela 9). O tempo máximo de luminescência não foi alterado, somente a intensidade luminosa. O pH foi mensurado ao longo de todo o ensaio ficando entre 6 e 6,5, não sendo afetado pela adição de H₂O₂. Os resultados demonstraram a importância do oxigênio para a intensidade luminosa.

Tabela 8. Luminescência (fótons) obtidos em espectrofotômetro.

Fótons/s	Sem adição de H ₂ O ₂					Com adição de H ₂ O ₂				
	1485	1543	1554	1563	1564	1485	1543	1554	1563	1564
Máximo	10864	1308	3039	3808	16260	19564	6759	2231	14007	32550
Mínimo	3	2	2	3	3	2	1	2	12	219
Média	3373	319	759	876	3637	3578	1625	534	3361	8594
Máximo	16260					32550				
Média	1793					3538				

Tabela 9. Densidade óptica (600nm) obtidos em espectrofotômetro.

OD (600nm)	Sem adição de H ₂ O ₂					Com adição de H ₂ O ₂				
	1485	1543	1554	1563	1564	1485	1543	1554	1563	1564
Máximo	1,190	0,963	0,889	1,280	1,055	0,374	0,767	0,933	1,261	1,070
Mínimo	0,484	0,854	0,734	0,873	0,721	0,099	0,558	0,601	0,783	0,979
Média	0,782	0,921	0,792	1,048	0,870	0,274	0,695	0,739	1,070	1,020
Máximo	1,280					1,261				
Média	0,883					0,760				

3.4. ETAPA 04: genoma completo

3.4.1. Extração de DNA dos microrganismos para a análise do genoma completo

O DNA de cada uma das linhagens bacterianas selecionadas (1485, 1543, 1554, 1563 e 1564) foi extraído conforme protocolo padronizado, e enviado para sequenciamento em plataforma Illumina. As leituras nucleotídicas provenientes do sequenciamento foram utilizadas para a montagem do genoma de

cada uma das linhagens, os quais suportaram a anotação funcional e classificação taxonômica (Figura 11).

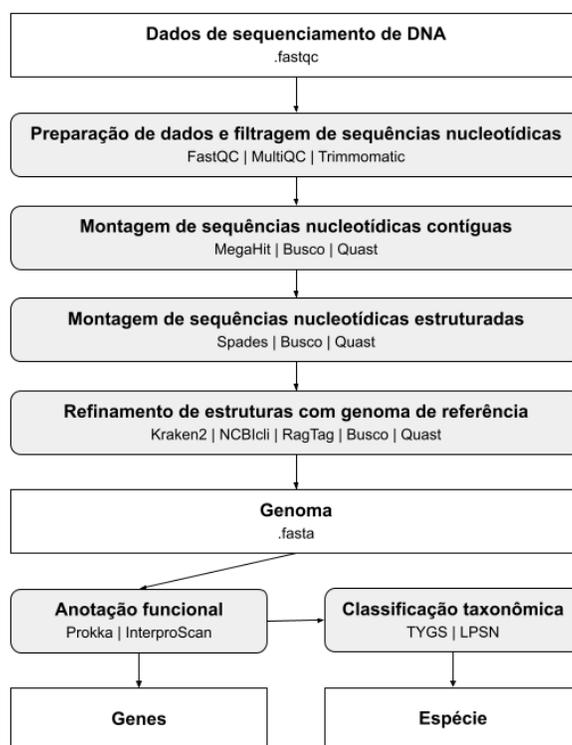


Figura 11. Esquema de pipeline de montagem e anotação de dados genômicos. *Pipeline* desenvolvido e utilizado para montagem, anotação funcional e classificação taxonômica dos genomas das linhagens bacterianas selecionadas do Banco Regenera, a partir de dados de sequenciamento de DNA pela plataforma Illumina.

3.4.2. Envio para sequenciamento do genoma

As leituras nucleotídicas provenientes do sequenciamento foram processadas e filtradas de acordo com critérios de qualidade e padrões da plataforma Illumina. Após o sequenciamento, os genomas foram montados e anotados funcionalmente, permitindo a identificação de genes canonicamente associados à bioluminescência, além da possibilidade de descoberta de novos genes relacionados a esse fenômeno.

Os princípios moleculares da bioluminescência revelam uma maquinaria molecular sofisticada, onde um conjunto de genes, coordenadamente expressos, possibilita a emissão de luz (Kasai et al., 2015; Beblawy et al., 2018; Costa et al., 2018). A expressão coordenada desses genes, regulada por diversos fatores ambientais e fisiológicos, permite que as bactérias emitam luz em resposta a estímulos

específicos, conferindo vantagens adaptativas como atração de presas ou comunicação intraespecífica (Liu et al., 2018). O operon *lux* é central nesse processo, abrigando os genes *luxA* e *luxB*, que codificam, respectivamente, as subunidades *alfa* e *beta* do heterodímero da luciferase (*alkanal monooxygenase*), a enzima responsável pela emissão de luz (Escher et al., 1989). A subunidade alfa, codificada por *luxA*, contém o sítio ativo da enzima, enquanto a subunidade beta, codificada por *luxB*, atua como suporte estrutural, estabilizando a atividade catalítica (Ng et al., 2018). A luciferase emite luz ao catalisar a oxidação da flavina mononucleotídeo reduzida e de um aldeído de cadeia longa. A síntese desse aldeído é mediada pelos produtos dos genes *luxC*, *luxD* e *luxE*, que formam um complexo enzimático responsável pela redução de ácidos graxos. A organização desses genes em um único operon, facilitam a expressão coordenada de todos os componentes necessários para a bioluminescência, otimizando a eficiência desse processo biológico.

3.4.3. Montagem do genoma

As leituras nucleotídicas com qualidade superior foram utilizadas para a montagem inicial de leituras contíguas (*contigs*) por meio da ferramenta Megahit. As leituras contíguas foram utilizadas para a montagem de estruturas genômicas de nucleotídeos (*scaffolds*) por meio da ferramenta Spades. Dado a elevada quantidade de estruturas genômicas de nucleotídeos geradas, foi necessária uma etapa adicional de refinamento estrutural, realizada por meio da ferramenta Ragtag com base em um genoma de referência. O refinamento reduziu a fragmentação das estruturas genômicas, contribuindo significativamente para uma visão genômica mais coesa e estruturalmente íntegra, ao mesmo tempo em que não alterou significativamente o comprimento total e o conteúdo GC dos genomas, indicando que as características intrínsecas das sequências nucleotídicas foram preservadas.

Os genomas das linhagens bacterianas foram anotados funcionalmente para a identificação de genes por meio da ferramenta *Prokka* e para a identificação de domínios funcionais por meio da ferramenta *InterproScan*. As linhagens REG001543, REG001554, REG001563 e REG001564 apresentaram comprimento próximo a 6 milhões de pares de base e cerca de 5500 genes, enquanto a linhagem REG001485 apresentou um comprimento de 4 milhões de pares de base e 3776 (Tabela 10), e, apesar das diferenças, todas as linhagens apresentaram, em média, 1 gene a cada 1100 pares de base. Os resultados da anotação funcional serviram como base para a análises estruturais e funcionais dos genes relacionados à bioluminescência.

Tabela 10. Comparação quantitativa de genes anotados nos genomas das linhagens bacterianas.

ID Linhagens	Genes				Quantidade total de genes	Concentração gênica
	CDSs	rRNA	tRNA	tmRNA		
REG_001485	3722	3	50	1	3776	1097
REG_001543	5380	6	60	1	5447	1102
REG_001554	5496	4	64	1	5565	1102
REG_001563	5365	5	53	1	5424	1102
REG_001564	5288	5	65	1	5359	1114

3.4.4. Análise de genes de interesse

Os genomas das linhagens bacterianas foram analisados comparativamente para identificar fatores genômicos estruturais relacionados à bioluminescência, utilizando como base a anotação funcional e a classificação taxonômica. A análise foi centrada na caracterização estrutural do operon *lux*, com ênfase na composição e organização dos genes que o compõem. Devido às variações na estrutura do operon *lux* entre espécies bacterianas, as linhagens foram comparadas com os genomas de referência das espécies correspondentes: a linhagem REG001485 foi comparada ao genoma de *Aliivibrio fischeri* ES114, enquanto as linhagens REG001543, REG001554, REG001563 e REG001564 foram comparadas ao genoma de *Vibrio jasicida* 090810c. A recuperação do operon *lux* em cada linhagem foi realizada por meio da identificação de genes co-orientados agrupados aos genes *luxA* e *luxB*, caracterizando o agrupamento gênico. Como resultado, o operon *lux* foi identificado e recuperado em todos os genomas analisados, evidenciando composições e organizações distintas entre as espécies.

A linhagem REG001485 apresentou um único operon *lux* identificado em um cromossomo homólogo ao cromossomo 2 de *Aliivibrio fischeri* ES114 (Figura 12). O operon *lux* de REG001485 é composto pelos genes *luxI*, *luxC*, *luxA*, *luxB*, *luxE* e *fre*, organizados nesta ordem. A principal diferença em relação ao operon *lux* do genoma referência é a ausência do gene *luxD*, atribuída a uma lacuna na montagem, conforme indicado pela anotação funcional. No geral, há elevada sintonia entre os dois genomas e seus respectivos operons *lux*, reforçando as similaridades de composição e organização gênica.

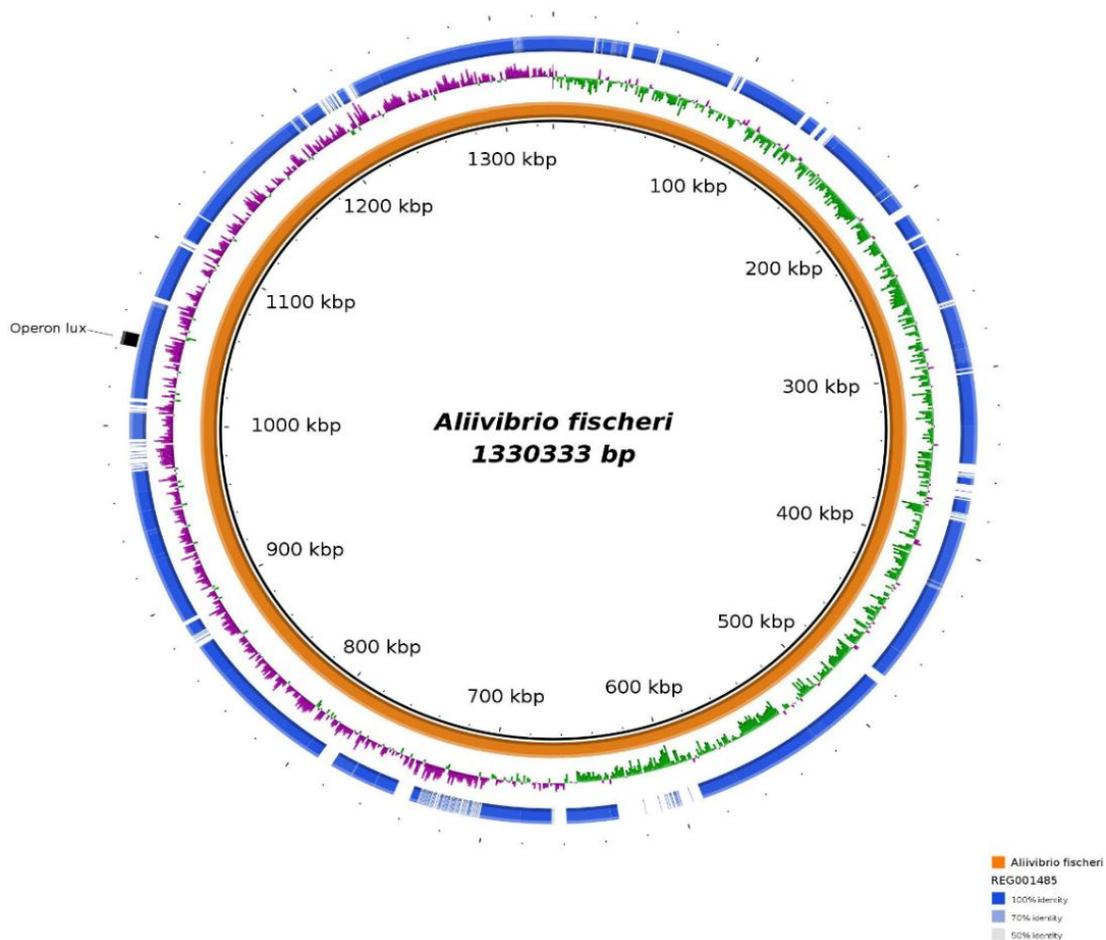


Figura 12. Identificação do operon *lux* nos genomas de REG001485 e *Aliivibrio fischeri* ES114. Representação da localização cromossômica e similaridade de sequência do operon *lux* no cromossomo 2 de REG001485 (azul) em relação ao cromossomo 2 do genoma de referência de *A. fischeri* (laranja).

Os genomas das linhagens bacterianas foram analisados para classificação taxonômica por meio da ferramenta *Type Strain Genome Server* (TYGS) e conforme padrão presente em *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature* (LPSN). As linhagens REG001543, REG001554, REG001563 e REG001564 foram preditas como pertencentes a espécie *Vibrio jasicida*, enquanto a linhagem REG001485 foi predita como potencialmente pertencente a uma nova espécie bacteriana estreitamente relacionada a espécie *Aliivibrio fischeri* (Tabela 11). Os dados referentes a esse novo registro serão publicados em um artigo científico.

Tabela 11. Identificação das espécies das linhagens bacterianas.

ID Linhagens	Espécie
REG_001485	Potencial nova espécie
REG_001543	<i>Vibrio jasicida</i>
REG_001554	<i>Vibrio jasicida</i>
REG_001563	<i>Vibrio jasicida</i>
REG_001564	<i>Vibrio jasicida</i>

As linhagens REG001543, REG001554, REG001563 apresentaram um único operon *lux* identificado em cromossomo homólogo ao cromossomo 2 de *Vibrio jasicida* 090810c. Enquanto a linhagem REG001564 apresentou dois operons *lux*: um igualmente localizado no cromossomo homólogo ao cromossomo 2 de *Vibrio jasicida* 090810c (Figura 13) e o outro localizado em um plasmídeo, potencialmente proveniente de uma cópia e translocação do operon *lux* cromossômico (*pVjLux*). Todos os operons *lux* das linhagens REG001543, REG001554, REG001563 e REG001564 são compostos pelos genes *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB*, *luxE*, *fre* e *ribB*, organizados nesta ordem. No geral, há elevada sintonia entre os genomas de todas as linhagens e do genoma de referência, assim como, de seus respectivos operons *lux*, reforçando as similaridades de composição e organização gênica, destacando como principal diferença, a presença de um operon *lux* plasmidial na linhagem REG001564.

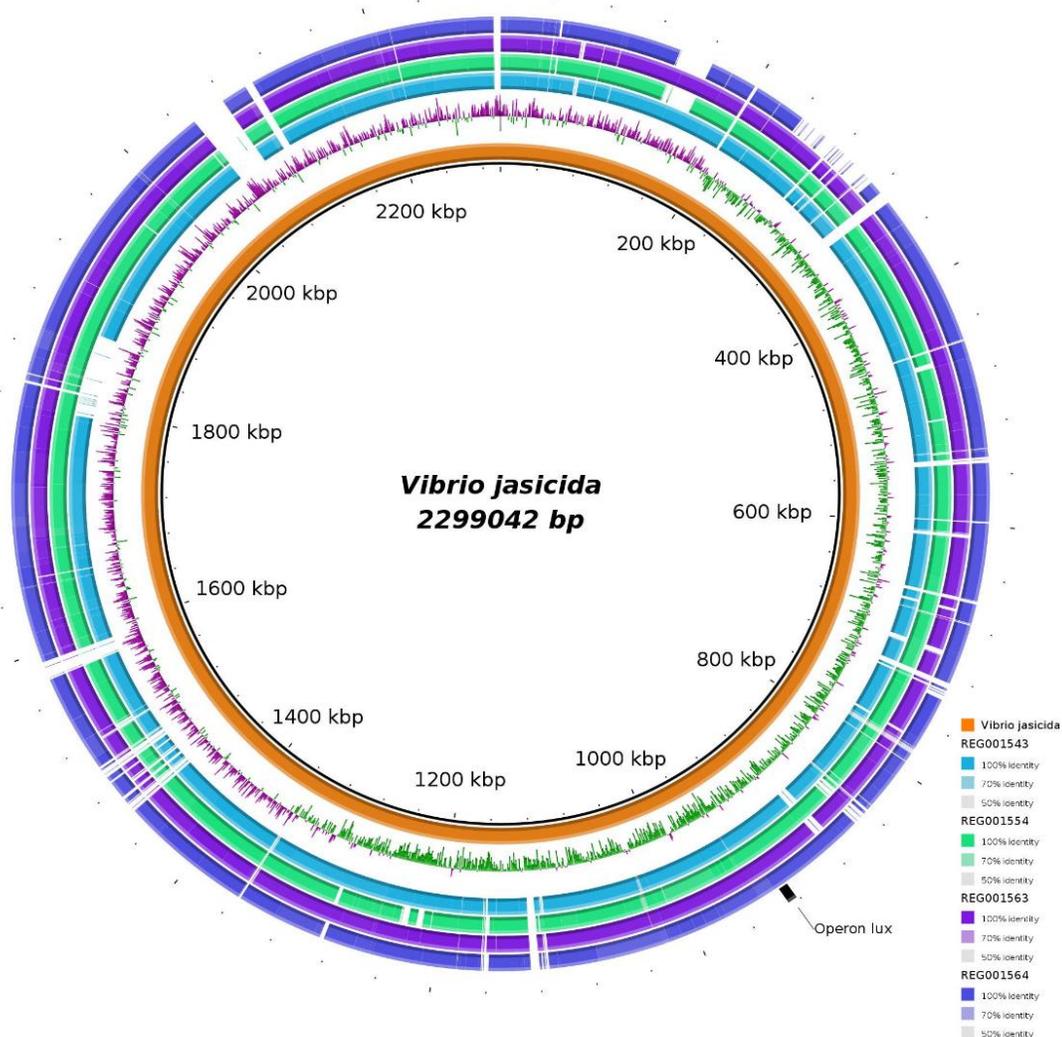


Figura 13 - Identificação do operon lux nos genomas de REG001543, REG001554, REG001563, REG001564 e *Vibrio jasicida* 090810c. Representação da localização cromossômica e similaridade de sequência do operon lux no cromossomo 2 de REG001543 (azul), REG001554 (verde), REG001563 (roxo) e REG001564 (lilás) em relação ao cromossomo 2 do genoma de referência de *V. jasicida* (laranja).

3.5. ETAPAS 05 e 06: planejamento molecular (estudo da construção do plasmídeo, escolha do vetor, amplificação do gene, clonagem) e experimental (DoE) para otimização

3.5.1. Estudo aprofundado sobre plasmídeos disponíveis

O desenvolvimento de um sistema bioluminescente eficaz e sustentável, conforme os objetivos deste projeto, requer a seleção de plasmídeos com características específicas que otimizem a expressão dos genes de luciferase. A fase de pesquisa bibliográfica e de bancos de dados genômicos focou na identificação de plasmídeos que contêm promotores fortes e indutíveis, permitindo o controle preciso da expressão gênica e a produção eficiente de luciferases. Além disso, foram avaliados plasmídeos com marcadores de seleção adequados, como genes de resistência a antibióticos, essenciais para a seleção de células transformadas. A análise incluiu uma revisão de vetores de expressão que já se mostraram eficazes em hospedeiros de interesse, como bactérias e leveduras, e a busca por plasmídeos de baixo custo e fácil manipulação, visando a escalabilidade futura do sistema.

A família de plasmídeos pET (Expression T7) é amplamente utilizada em pesquisa para a expressão de proteínas em *Escherichia coli* (*E. coli*). Eles são particularmente relevantes para a superexpressão de proteínas recombinantes, como as luciferases. Possuem o promotor T7, que é um dos mais fortes disponíveis, garantindo uma alta taxa de transcrição e, conseqüentemente, uma elevada produção de proteína (luciferase). A expressão é controlada pelo indutor IPTG, o que permite ligar a produção de luz apenas quando necessário, evitando toxicidade para a célula hospedeira. Plasmídeos como o pET-28a(+) incluem sequências para tags como a His-tag, facilitando a purificação da luciferase para estudos futuros. Em contrapartida, necessita de uma linhagem de *E. coli* que contenha a RNA polimerase T7, como a BL21(DE3), o que pode limitar a flexibilidade do sistema. Além disso, a alta expressão da proteína pode ser tóxica para a célula, levando à morte celular e à diminuição do rendimento, especialmente se a luciferase for grande ou complexa.

A família de vetores pBAD utiliza o promotor araBAD, que é induzido pela arabinose. Eles são uma alternativa popular ao sistema pET, oferecendo um controle de expressão mais "suave". A expressão pode ser controlada por diferentes concentrações de arabinose, permitindo um ajuste fino da quantidade de proteína produzida. Isso ajuda a evitar a toxicidade causada pela superexpressão. O sistema pBAD é conhecido por ter um "vazamento" de expressão (expressão não-induzida) muito baixo, o que é ideal para proteínas que são prejudiciais ao hospedeiro. Por outro lado, o promotor araBAD geralmente não é tão forte quanto o T7, o que pode resultar em um nível de expressão de luciferase mais baixo e o indutor arabinose é um açúcar, e seu metabolismo pode ser afetado por outras fontes de carbono presentes no meio de cultura, o que pode complicar a otimização da expressão.

Neste sentido, a seleção final do plasmídeo dependerá do desenvolvimento do projeto e da otimização da atividade. Para o desenvolvimento inicial do sistema bioluminescente, a alta expressão proporcionada pelo pET pode ser a melhor escolha para testar a funcionalidade da luciferase. No entanto, para um sistema mais controlado e sustentável, o pBAD pode ser uma opção mais adequada, devido à sua

capacidade de expressão gradual.

3.5.2. Estudo aprofundado sobre gene de interesse e regiões regulatórias

Os principais genes associados à bioluminescência são *luxA* e *luxB*, essenciais para a produção da luciferase bacteriana, a enzima responsável pela emissão de luz. Esses genes estão localizados no agrupamento gênico *luxCDABEG*, que controla toda a via de bioluminescência bacteriana (Zavilgelsky & Shakulov 2018). Dessa forma, o agrupamento gênico *luxCDABEG* identificado na linhagem bacteriana será selecionado para clonagem molecular em um sistema de expressão heteróloga (Seco & Fernández 2022).

A eficácia do sistema bioluminescente depende da identificação e otimização dos componentes genéticos-chave. O estudo aprofundado concentrou-se no gene de interesse, que codifica a enzima luciferase. Foram analisadas diversas variantes de luciferases de organismos como vaga-lumes (*Photinus pyralis*) e bactérias marinhas (*Aliivibrio fischeri*), considerando a eficiência quântica, a estabilidade enzimática e a emissão de luz em comprimentos de onda adequados para a sinalização. A pesquisa também se estendeu às regiões regulatórias, que controlam a expressão do gene. Isso incluiu a busca por promotores fortes e indutíveis (como T7 e araBAD) que garantem a produção massiva da luciferase, além de sequências operadoras e locais de ligação de ribossomos (RBS) que influenciam a taxa de tradução. A seleção final desses elementos foi baseada na sua compatibilidade com o hospedeiro celular escolhido e na sua capacidade de permitir um controle preciso sobre a produção de bioluminescência, o que é vital para a sustentabilidade e aplicação prática do sistema.

3.5.3. Planejamento da construção do plasmídeo e potenciais chassis

A etapa de construção do plasmídeo deve ser dividida em fases lógicas para garantir a funcionalidade e a estabilidade do sistema. Inicialmente, é preciso realizar a clonagem do gene de interesse, ou seja, a inserção do gene da luciferase em um plasmídeo vetor. Em seguida, as regiões regulatórias (como promotores e sequências operadoras) e o gene marcador (para a seleção das células) devem ser adicionados ao vetor, formando um cassete de expressão. A otimização do projeto do plasmídeo pode incluir a utilização de clonagem modular, que permite testar diferentes combinações de promotores e genes de luciferase para encontrar a que oferece a maior eficiência. A validação da construção é feita por meio de técnicas de biologia molecular, como a eletroforese em gel, a PCR e o sequenciamento de

DNA, para confirmar que todas as sequências foram inseridas corretamente.

3.5.4. Escolha do chassi para clonagem

A escolha do chassi, ou hospedeiro celular, é crítica para o sucesso do projeto. A seleção deve levar em consideração a eficiência de expressão, a viabilidade de crescimento em larga escala e a segurança biológica. Os principais candidatos para este projeto incluem bactérias e leveduras. No entanto, bactérias possuem como vantagem o crescimento rápido, são geneticamente bem caracterizadas e fáceis de manipular em laboratório. A alta taxa de replicação permite uma produção ágil de luciferase. Neste sentido, a bioluminescência será induzida pela expressão dos genes *luxCDABEG* em uma linhagem da bactéria de *Escherichia coli*, adaptada para engenharia genética e otimizada para crescimento em meios de cultivo de larga escala no laboratório (Chia et al. 2022), sendo este considerado um organismo geneticamente modificado (OGM).

A linhagem bacteriana *Vibrio jasicida* REG001564 apresentou potencial em seu genoma para produção de bioluminescência, devido à presença de um operon *lux* cromossômico e de um operon *lux* plasmidial (*pVjLux* – Figura 14). O potencial gênico do operon *lux* plasmidial será avaliado por meio da expressão heteróloga das proteínas codificadas, com objetivo de indução da bioluminescência.

Uma linhagem de *Escherichia coli* bioluminescente será criada a partir dos genes do operon *lux* plasmidial (*luxCDABE*). A *E. coli* bioluminescente será desenvolvida a partir da clonagem molecular dos genes essenciais para a bioluminescência *luxA* e *luxB*, e dos genes complementares *luxC*, *luxD* e *luxE* (Tabela 12). As sequências desses genes serão inseridas em vetores plasmidiais adequados para o sistema de expressão gênica *pET* (Figura 15). Os vetores recombinantes serão transformados em *E. coli* BL21 (DE3) para a construção de uma biblioteca de linhagens com diferentes combinações de genes do operon *lux*. Por fim, a expressão gênica do sistema *pET* será induzida para a produção das proteínas recombinantes, e a capacidade de bioluminescência das linhagens transformantes será avaliada.

Gene	Comprimento	Sequencia nucleotidica de DNA (5' para 3')
<i>LuxA</i>	1068 nucleotídeos	ATGAAATTGGAAACTTCCCTTCACCTTATCAGCCACCTGAGCTATCTCAGACCGAAGTGAAGAAGCGATTGGTTAACCTGGGCAAAAGCGCTCGAAGGTTGGGTTTCGACACAGTTTGGTTACTAGAGCATCACTTCACGGAAATTTGGGTTATTAGGGAATCCTTATGTTTCTGCGGCACACCTGTTAGGGGCAACA GAAAGGCTCAATGTTGGCACCGCTGCCATGTTATGGCCGACTGGCCATCCGGTTCGACAAAGCAGAA GACGTAACCTACTGGATCAAATGTCGAAAGGACGATCCCGCTTCGGCATTTGTCGGGGTTGAT GACAAAGATTTCCGAGTTTTGGTACAGACATGGATAACAGCCGAGCCCTTAATGGACTGTTGGTAT GACTTGTATGAAAGAAGGCTTCAAATGAAGGCTATATCCGGGGCGGATAACGAACATATTAAGTTCCCA AAAATTCACACTGAAACCCATCCGGCTTACACACAAGGTGGCGCTCCTGTTTATGTCGTCGGGAGTCA GCATCAACGACAGAAATGGGCGAGGAGGCGGCTACCAATGATTTCAAGCTGGATCATCAACACT CACGAGAAGAAAGCGCAGCTTGTATCTTTACAACGAAGTCGCGACTGAACATGGCTACGATGTGAA TAAGATTGACCCTGTTGCTTACATCACTCTGTCGACCATGACTCAAATAAAGCCAAAGATATT TGCCGCAACTTCTGGGTCATGGTACGACTCATACGTAATGCTACCAAGATTTTGGAGCTCTG ACCAAACAAAAGGTTACGACTTCAATAAAGGCCAATGGCTGTGATTTGTGTTGAAAGGTCACAAAG ACACCAATCGCCAAATGATACAGCTACGAAATCAACCCAGTAGGAAGCCGTTGAGAGTGTATCG CGATTAACCACAAAGATAATCGATGCGACAGGATTAACAAATTTTGTGTGGTTTGAAGTAAAGCG GTCTGAAAGAAAGAAATATCGCATCTATGAAGCTATTCACGATCCGATGTGATGCCATATCTCAAAG AAAACAGTGA
<i>LuxB</i>	975 nucleotídeos	ATGAAATTGGACTATCTTCTCAATTTTATGAATTCAAAGCGTCTCTGATCAAGTCATAGAAG AAATGTTAGATACCCGCACATTACGTAGATCAGTTGAAGTTTGACACGTTGGCTGTTTACGGAACCC ATTTCTCGAAACAATGGTGTAGTTGGTGGCCCATTAACCGTGGTGGTCTTTTACTGGTATGACAAA GAACGCCAAAGTGGCTTCGTTGAATCAGTCAATACCACGCATCATCCAGTACGATGAGGCAAGGA AGCGTGTCTACTCGACCAAAATGAGTGAAGTCCGTTTGTCTTGGTTTTAGTGTATGTAAGAAAGAT GCAGATATGCGCTTTTTAACCCGACCAACGGATTCTCAGTTGAGTGTTCAGTGTGTCACAAAGA TCATCAATGATGATCTACTACCGGGTACTGCCATCCAAACAATGATTTTATAGTGTCTCAAAAAT TTCCGTTAACCACACCGGCTTCACTGAAAGGCGGCTCTGCGCAATTTGTTGAAATGCGACCGGCAAGG AGTGGTTGAATGGGCGGCTAAGTTAGGGCTTCCACTCGTGTTTAAATGGGACGACTCAAAACCGCA AAGAAAAGAATACGCCGTTTTTACCACGAAAGTGTCTAGGCGCATGGTGTGATGTTAGTGGAGT CCGACACAAGCTCACACTGTTGGTTAATGAGAATGTAAATGGCGAAAAGGC AAGGATGAGGCGCC GCAATATTTGGAAGAGTTGTCGAGAAATCTTATCCAAACACCGATTTTGACGCAAAAGATGGCAG AGCTGTTATTAGAAAATGCCATCGGTAACTATCAGCAATGTACACAAGCTCGAAACCGCTTGG AAGCTGCGGTTGCTTCGAGCTGTGTGATGCTTTGAAATCGATGGAAGATAAAGCGCAACAAAGAG CGTATATCGATGTTTGAAGCGCAACACTCGTCAAAATACCACTTAA
<i>LuxC</i>	1440 nucleotídeos	ATGATTAAGGCTATCTTATGATCAATGGTGTTTAAGTGTGATTAACGTTAGTAATGAATTTTC ACGAAAATAAATTCGGTGTAAATTAATTCATGATCTAGTTTAGATACCTTGAAGTGAAGAAAATA ATTAGATGAAGAAGTATGTTTAAATATAGTGTAAATCAGATAGTAAATTTTATACAGGTTGGT CAACGTTGGGAGAGTGAAGAGTATCAAGGCGGAGGGGTTATATTCGGTCTTGATTAATCACTTGG GGTATTCACCAACAATGGGAAACTAGAAGCAATTTGGATTGCAATGCTTCTTGTGTTCAAGAT GCCTTACGACATATTTGATACTGAACTGGTCTACCCACATACAAGATGAGTGGTTACCGCAGG GTGAGTGTATGTTGAGAGCTTCTTAAAGGACGCAAGATGATTTGCTTGGCGGCAACGTTCTCT CTCCGGTGGGACTCAATACCTGGGAGCCATCTGACAAAGAACCAGTGTATTTGCAAGATGTGTC ATCCGATCTTTACTGGCCATGGCTAGCGATGAGCTTTGTTGATGTCGATCCGAAATCATCTTATTT CTCTGTTCACTCCGATATGATATGGCTCATAACTCGGATACGACACTGCTGAAGAAATTAACA GTCATATGGATGCGGTAGTGTCTGGGGGGGAGGATGCCATTGATGGGCGGCTTAAGCATCTC CTTCGATATGATGTTTTGAAGTTTGGTCAAGAAGAGTTTTACTGTTCTGACCATCAATCGA CTTAGAAGAAGCTGCTCGGGTGTGCTCATGACATTTGTTCTATGATCAAAAATGGCTGTTTCTTA CTCAGAATATTTACTTTTGGAGGTAAGTATGAAGAATTTAAATCAAAAGCTGTTGAAAGCTTCTTA ATCTATATCAAGAGATATTAACAAGGTCAAAGCAAGCTTTGATGATGAAGCTTTGTTTCAATAC TCGTTTGGAAATGTCAGTTTTCTGGATTGAATGTTATATCTGAAACCGAAAATCACTGGATGATC GAGTCAGAGCCCGGGGTTGAATATAACCATCCATTAAGTCGATGTTGTTATATCCCAAGGATAAAC TCTGTGATGATGTTGTTCAATATATAGAAAACATCAAAACAAACGATTTCTTTTATCCATGGG AATCTCCAAAATAATCGAGATGCTATCCCGTAAAAGGAGTAGAAAAGATCGTTGAAATCTGGGA TGAATAATATATTAAGGCGGGTGGTGCACATGATTTCCATGCGCCCTTCAACGTTTATGTTGAT TCTCTCTCATGAGAGACCATATAATTTCACTACTAAGGATGATCTGTAGAAATAGAGCAAAACCG CTTTCTGAAAGAGATAAGTCTTGGTTTTCGTCCTTAA
<i>LuxD</i>	918 nucleotídeos	ATGAGTAATCAATGCAAGACTATGACACAGTGTGCGGGTGAACAATAGTCAGAAAATTCACATC TGGGAAACCGCCCCAAAAGAAAATGTGGCTTCAAAAATAGCACCAATTTAAATGCTTCTGGTTTTG CCGAAGAAATGGATCACTTTGCTGGGTTGGCCGAGTATCTATCTGAAAAATGGTTCACATGTTCCG TATGACTCTTCAATCAATGTTGGGCTCAGCTCCGGGTCGATGATGAAATTCACCAATGACGAGCGGC AAAAATAGTTTGGCACTGTTTATCACTGGCTGCAGACCAAGGGTACAAAACATTTGGCTGATT GCGGCAAGTCTCTCAGCTCGTGTGGCTATGAAGTTACTCTGATCTGGAGCTATCTTTCTGATTA CTGCGGTTGGTGTGGTGAACCTGCGTGACACATAGAAAAGGCGCTGGTTTTGATTAACCTCAGTTT ACCATATCGATGAGCTGCCAAACGATCTGATTTTGAAGGCCATAAGCTGGTTCGAAAGTGTCCGTT CCGTACTGCTTCGAGCACCAATGGGATACCTTAGATTTACTCTCGACAAAAGTAGCCAATACCTCG GTTCTTTAATAGCGTTTCCGCTAACACCGATGATGGGTTAAGCAAGGAGTCTATGACATGACATG TTAGCGCATATTCGACGGGCAATGCAAGCTCTACTCTTGTGTTGGTAGCTCTATGACATGGGTTG AAAACTTGGTGTGTTACGTAATTTCTACCAATCCGTCACCAAAAGCCCATCGCAATGGACGGAG GCAGCTTAGAAAATCGACGCTGACTTTATCGAGCTTGAATTTGAACAACCTCACCAATCGGACTGGA ATGAACGTTCCGTTGAAAGCGGAAATGAAAGCCGTGCGCCAGAGTTGGCTTAG
<i>LuxE</i>	1158 nucleotídeos	ATGGACGACTTTCAGCGGTTAAGCAGGAAACATCCGCGGAGCACAGAAATCGATGACTTGATT TTCATGGAACTCTCAGCAATGGTCAATGCAAGAAACAAAACCTGACATCTCGCTTGTAAA GGGGCAATCAATACCCTACACAAATAATGATGACTATCGTCACTTCTCCAGGTTGGGAGTCC GGAGAGATGGTGAAGATCTCAACGAGATCCCGTTTTTCCCTACTCTATTTTAAAGTTGAAGACCC TATTAACATTTGGACGATGACGAGGTTGAGAATCGCTTTACTAGCAGTGGTACTAGTGGCATCAAAA GATATGTCGACAGATAGACTCAGTATGAGGCGACTTCTTGGCTGTGAAAATTTGGGATGAAATTA CGTAGGTGATTGGTTTGACCATCAGATGGAGTTGGTGAACCTAGGCCAGATCGCTTAAATGCCAA CAATATTTGGTCAAGTACGTCATGAGCTTAGTCGAGCTCTTTATCCGACCGTATTTACTGTCACT GAGGATGAGATCGAATTTGAGGCGACGCTAAGTAAATGAAATCGTATTAAGCATTCTGGTAAAAAC ATTGTCTTATCGGCCCTCTTATTTATCTATTAAGTGTGCTGTTTATGTCGCGGAGCAAGGTCAAA CTTCAATGGTGGTCCGATCTTTACATCACTACGCGCGCGGCTGGAAAAGATCAAGATCAATTC GCTCGATGAGAGCAGGTTCAACCAACTTTTGTGTGAGACTTTTACCTAGAAAAGCCAGAGGAGAT TCGAGACACATTTAATCAAGTTGAACGAAACCTGCTTTTGAAGATACAGAAACAAAGG TGAACCTCCCTGGGCTTTGCAAGAGCTAGGATCTTAAAACATTAAGTCCCTTCCGCAATGGAAA CCGGAGCTGATGAGCTATATGATGCTTCCGCGTCAAGTATCCATGCTTTCTAGTACGAGTGA CATTTGATATGTTGCGAAGAAAGAGGGGCGAGGCGCCCGGACTACGTTGAGATTTGCTGATAGG TTAGTTCTCGTCTCTTAMGGGTTGCTTTAAGTATGTCGCAAGTATTTCAACTACCGGAAAGGA GAAATTAGGAAATGTTGCTGTGCAAGTTGA

específica. A diferença entre as T_a dos dois primers (forward e reverse) deve ser mínima, idealmente inferior a 5°C . (iv) O conteúdo de guanina e citosina (GC) dos primers deve estar na faixa de 40% a 60% para garantir estabilidade. A presença de um C ou G nas extremidades 3' (GC-clamp) aumenta a eficiência da ligação. (v) Os primers devem ter entre 18 e 25 nucleotídeos para uma hibridização eficiente.

A partir da sequência do gene da luciferase, os primers são desenhados da seguinte forma: Primer Forward iniciaria com uma sequência contendo o sítio de restrição escolhido (por exemplo, *NdeI*), seguida pela sequência inicial do gene da luciferase e o Primer Reverse conteria um sítio de restrição diferente na sua extremidade 5' (por exemplo, *XhoI*), seguido pela sequência complementar à extremidade final do gene.

A inclusão de uma tag (como a His-tag) para purificação da proteína pode ser feita diretamente no primer forward, permitindo que a proteína expressa já tenha a tag para os próximos estudos. A validação do desenho é feita usando softwares bioinformáticos, que verificam a especificidade, a formação de estruturas secundárias indesejadas e a compatibilidade dos primers com o gene-alvo.

3.5.6. Estudo sobre amplificação do gene

Após a etapa de desenho dos primers, o próximo passo crucial no desenvolvimento do sistema bioluminescente é a amplificação do gene de interesse, ou seja, o gene que codifica a luciferase. Essa amplificação é realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica fundamental na biologia molecular que permite a criação de milhões de cópias de um segmento de DNA a partir de uma pequena amostra.

O processo de PCR envolve ciclos repetidos de três etapas principais: Desnaturação: A dupla fita de DNA é aquecida a uma temperatura elevada (geralmente $94-98^\circ\text{C}$) para separar as fitas. Anelamento: A temperatura é reduzida para permitir que os primers desenhados se liguem (anelem) às sequências complementares nas extremidades do gene e Extensão: A enzima DNA polimerase (geralmente a *Taq* polimerase) sintetiza uma nova fita de DNA a partir do primer, usando a fita original como molde. Para garantir a eficiência da amplificação, diversos parâmetros devem ser otimizados, incluindo a concentração dos reagentes (primers, dNTPs), a quantidade de DNA molde e, principalmente, a temperatura de anelamento (T_a). A T_a ideal assegura que os primers se liguem especificamente ao gene de interesse, evitando amplificações inespecíficas.

3.5.7. Estudo sobre a Construção do vetor

A fase de construção do vetor é um passo central no projeto, pois é nela que o gene da luciferase — já amplificado e validado — será inserido em um plasmídeo de expressão. Essa etapa, também conhecida como clonagem molecular, é fundamental para garantir que o gene seja corretamente incorporado e possa ser expresso de forma eficiente no organismo hospedeiro.

O processo se inicia com a digestão do DNA, tanto do plasmídeo quanto do gene de interesse. A digestão é realizada por enzimas de restrição que reconhecem e cortam o DNA em locais específicos, criando "extremidades pegajosas" ou "extremidades cegas". Como os primers foram desenhados com os mesmos sítios de restrição, a digestão do gene e do plasmídeo resulta em extremidades complementares. Após a digestão, o gene purificado é misturado ao plasmídeo linearizado. A enzima DNA ligase atua como uma "cola molecular", unindo as extremidades do gene ao plasmídeo, formando uma molécula de DNA circular e recombinante, que agora é o nosso vetor de expressão.

A validação da construção do vetor é feita, novamente, por meio da eletroforese em gel de agarose. Após a digestão do plasmídeo, é possível verificar se ele foi cortado com sucesso. Depois da ligação, a presença de uma banda de DNA com o tamanho esperado (somatória do tamanho do plasmídeo e do gene) é um forte indicativo de que a ligação foi bem-sucedida.

Para confirmar que a inserção do gene ocorreu corretamente e que não há mutações na sequência, a etapa final e mais rigorosa de validação é o sequenciamento de DNA. Essa técnica fornece a sequência exata de nucleotídeos, permitindo comparar o DNA construído com a sequência de referência. O sequenciamento garante a integridade e a funcionalidade do gene da luciferase no vetor. Essa fase da construção do vetor representa a transição do planejamento para a realização, criando a ferramenta biológica que permitirá a produção da bioluminescência. A partir daqui o foco do projeto se voltará para a inserção desse vetor nas células hospedeiras e o estudo da expressão do gene.

Ressalta-se que o uso de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) podem resultar em riscos como toxicidade, alergenicidade, e alterações nutricionais e, por isso, necessitam de um processo regulatório longo, o que poderia impactar o seu uso em sinalizações bioluminescentes, objetivo do atual projeto. No Brasil, a Lei nº 11.105/05 estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização para atividades envolvendo OGM. Por isso, optamos por realizar tentativas de consórcio entre os microrganismos, bem como estímulo à conjugação e transferência natural do plasmídeo da 1564 para a 1485, mas sem sucesso. Então, realizamos um Planejamento Experimental (DoE), a fim de melhorar a performance dos nossos microrganismos sem a necessidade de fazer modificações genéticas.

3.5.8. DoE

A partir dos dados genômicos foram selecionados os microrganismos 1485, 1563 e 1564 para otimização de meio de cultivo por meio de Planejamento Experimental (DoE) (Rodrigues & Iemma, 2005). O objetivo foi estudar o efeito de vários fatores nutricionais em relação à variável resposta – atividade de bioluminescência.

Para tal, foi realizado um DoE fracionado com 8 variáveis (fatores) independentes ($2^{8-3}+2pc$), sendo calculado os efeitos principais e indicações dos fatores que deveriam ser incluídas no planejamento seguinte e as novas faixas a serem avaliadas para cada fator (Tabelas 13, 14 e 15).

Tabela 13. Fatores avaliados no Planejamento Experimental (DoE – 1) a fim de otimizar a atividade de bioluminescência dos microrganismos 1485, 1563 e 1564.

Fatores	-1	0	1
Peptona Bacteriológica (g/L)	5	10	15
Extrato de Levedura (g/L)	2,5	5	7,5
Triptona (g/L)	5	10	15
Glicerol (mL/L)	0	3	6
NaCl (g/L)	0	15	30
H2O mar	0	500	1000
B2 (g/L)	0	0,02	0,04
H2O2 (ml/L)	0	15	30

Tabela 14. Planejamento Experimental (DoE – 1) fracionado para as linhagens 1585, 1563 e 1564.

Ensaio	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.	NaCl	H2Omar	B2	H ₂ O ₂
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1
8	1	1	1	-1	-1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1

10	1	-1	-1	1	-1	1	-1	-1
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
13	-1	-1	1	1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1
15	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1	-1	1	1	-1
17	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
18	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
19	-1	1	-1	-1	1	1	1	1
20	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1
21	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
22	1	-1	1	-1	1	-1	1	1
23	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1
24	1	1	1	-1	1	1	-1	-1
25	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1
26	1	-1	-1	1	1	1	-1	1
27	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1
28	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
29	-1	-1	1	1	1	1	1	-1
30	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
31	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
32	1	1	1	1	1	1	1	1
33	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 15. Planejamento Experimental (DoE – 1) fracionado para as linhagens 1585, 1563 e 1564, com detalhamento das concentrações (g/L e mL/L) de cada fator para cada ensaio (tratamento).

Ensaio	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.	NaCl	H20mar	B2	H ₂ O ₂
1	5	2,5	5	0	0	0	0	30
2	15	2,5	5	0	0	1000	0,04	30
3	5	7,5	5	0	0	1000	0,04	0
4	15	7,5	5	0	0	0	0	0

5	5	2,5	15	0	0	1000	0	0
6	15	2,5	15	0	0	0	0,04	0
7	5	7,5	15	0	0	0	0,04	30
8	15	7,5	15	0	0	1000	0	30
9	5	2,5	5	6	0	0	0,04	0
10	15	2,5	5	6	0	1000	0	0
11	5	7,5	5	6	0	1000	0	30
12	15	7,5	5	6	0	0	0,04	30
13	5	2,5	15	6	0	1000	0,04	30
14	15	2,5	15	6	0	0	0	30
15	5	7,5	15	6	0	0	0	0
16	15	7,5	15	6	0	1000	0,04	0
17	5	2,5	5	0	30	0	0	0
18	15	2,5	5	0	30	1000	0,04	0
19	5	7,5	5	0	30	1000	0,04	30
20	15	7,5	5	0	30	0	0	30
21	5	2,5	15	0	30	1000	0	30
22	15	2,5	15	0	30	0	0,04	30
23	5	7,5	15	0	30	0	0,04	0
24	15	7,5	15	0	30	1000	0	0
25	5	2,5	5	6	30	0	0,04	30
26	15	2,5	5	6	30	1000	0	30
27	5	7,5	5	6	30	1000	0	0
28	15	7,5	5	6	30	0	0,04	0
29	5	2,5	15	6	30	1000	0,04	0
30	15	2,5	15	6	30	0	0	0
31	5	7,5	15	6	30	0	0	30
32	15	7,5	15	6	30	1000	0,04	30
33	10	5	10	3	15	500	0,02	15
34	10	5	10	3	15	500	0,02	15

Resultados positivos de atividade de bioluminescência foram considerados quando os valores de fótons ultrapassaram 1000. Os resultados apontaram diferenças entre os tratamentos (ensaios) e entre os microrganismos. Para o microrganismo 1485, a bioluminescência foi registrada até o último dia de

avaliação, totalizando 30 dias, sendo os ensaios 5 (22136 fótons) e 17 (18530 fótons) detentores da maior bioluminescência média, enquanto que o ensaio 10 (8166 fótons) foi detentor do maior tempo de bioluminescência (30 dias). Em comum, esses meios continham Peptona Bacteriológica, Extrato de Levedura, Triptona, diluídos em água do mar e o tratamento 10 continha glicerol. Para o microrganismo 1563, o tratamento 10 (9867 fótons) foi o detentor da melhor relação tempo e intensidade luminosa. Por outro lado, para o microrganismo 1564, o ensaio 18 (14325 fótons) apresentou a melhor relação entre tempo e intensidade luminosa, que além de conter Peptona Bacteriológica, Extrato de Levedura, Triptona, diluídos em água do mar, ainda continha NaCl. O tempo máximo de bioluminescência registrado para os microrganismos 1563 e 1564 foi de 23 dias. Os resultados para cada microrganismos estão detalhados nas Tabelas 16, 17, 18.

Tabela 16. Resultados do DoE – 1 para o microrganismos 1563, sendo apresentado os valores de luminescência (fótons) para cada ensaio (composição de diferentes fatores) entre 0h e 30 dias.

Ensaio	Pept. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.	NaCl	H2Omar	BZ	H2O2	0h	2d	5d	7d	9d	12d	14d	16d	19d	21d	23d	26d	28d	30d
1	5	2,5	5	0	0	0	0	30	25	5	4	4	4	7	7	4	5	5	5	6	7	3
2	15	2,5	5	0	0	1000	0,04	30	47588	4	7	7	3	8	8	6	3	3	7	7	7	3
3	5	7,5	5	0	0	1000	0,04	0	46239	6240	19	10655	139	74	74	89	6	4	6	4	7	4
4	15	7,5	5	0	0	0	0	0	4182	5	8	6	4	6	6	3	8	5	6	3	6	4
5	5	2,5	15	0	0	1000	0	0	81904	5	8	4	26	19	19	344	16	28	15	7	14	8
6	15	2,5	15	0	0	0	0,04	0	4039	6	8	3	3	5	5	3	6	5	9	4	6	4
7	5	7,5	15	0	0	0	0,04	30	2574	4	9	4	4	9	9	4	3	4	6	8	10	3
8	15	7,5	15	0	0	1000	0	30	35830	4	7	4	12	5	5	5	5	7	12	3	4	2
9	5	2,5	5	6	0	0	0,04	0	31	3	4	2	5	4	4	3	3	5	7	6	11	5
10	15	2,5	5	6	0	1000	0	0	67595	11227	23609	14404	3	54	54	6966	1482	6323	5374	586	198	264
11	5	7,5	5	6	0	1000	0	30	55125	3	6	4	3	5	5	4	6	6	7	4	6	13
12	15	7,5	5	6	0	0	0,04	30	2927	5	7	4	2	7	7	3	5	7	5	6	9	4
13	5	2,5	15	6	0	1000	0,04	30	38966	2	8	4	5	8	8	7	5	5	5	5	6	3
14	15	2,5	15	6	0	0	0	30	4881	6	3	4	2	9	9	5	3	5	4	6	9	4
15	5	7,5	15	6	0	0	0	0	3338	2	9	2	3	6	6	5	7	6	7	6	8	3
16	15	7,5	15	6	0	1000	0,04	0	25269	1630	1470	10323	5	8	8	2	4	68	54	33	29	15
17	5	2,5	5	0	30	0	0	0	47622	4	7	6	5	6	6	3	3	5	10	6	4	3
18	15	2,5	5	0	30	1000	0,04	0	19686	3	4	7	10	7	7	2	11	5	6	6	8	5
19	5	7,5	5	0	30	1000	0,04	30	11637	2	5	4	4	6	6	5	3	3	6	14	8	2
20	15	7,5	5	0	30	0	0	30	39192	5	7	5	2	11	11	2	4	7	14	7	5	4
21	5	2,5	15	0	30	1000	0	30	14678	3	5	3	3	10	10	2	6	6	10	8	5	5
22	15	2,5	15	0	30	0	0,04	30	3974	3	6	3	5	7	7	2	3	5	8	3	7	7
23	5	7,5	15	0	30	0	0,04	0	22971	6	9	6	4	8	8	8	6	6	6	6	5	3
24	15	7,5	15	0	30	1000	0	0	9888	1666	2849	3694	192	44	44	14	10	6	25	5	10	5
25	5	2,5	5	6	30	0	0,04	30	33523	4	11	4	4	4	4	3	3	4	5	5	6	3
26	15	2,5	5	6	30	1000	0	30	16494	8	4	4	6	6	6	2	4	5	8	8	8	5
27	5	7,5	5	6	30	1000	0	0	15074	4	6	5	12	14	14	17	3	14	76	8	7	4
28	15	7,5	5	6	30	0	0,04	0	33544	3	4	3	2	7	7	2	7	8	8	6	9	7
29	5	2,5	15	6	30	1000	0,04	0	14750	3978	3920	3912	10	48	48	23	4	6	164	13	38	17
30	15	2,5	15	6	30	0	0	0	34617	1519	4725	889	2	5	5	5	3	4	8	6	9	2
31	5	7,5	15	6	30	0	0	30	27133	3	7	7	3	5	5	4	11	4	5	6	7	5
32	15	7,5	15	6	30	1000	0,04	30	7475	2	6	2	9	9	9	8	11	5	6	5	7	3
33	10	5	10	3	15	500	0,02	15	43849	3	4	5	2	5	5	6	4	7	7	5	8	3
34	10	5	10	3	15	500	0,02	15	45712	1277	4	3	2	5	5	3	4	5	6	4	16	4

Tabela 17. Resultados do DoE – 1 para o microrganismos 1485, sendo apresentado os valores de luminescência (fótons) para cada ensaio (composição de diferentes fatores) entre 0h e 30 dias.

Ensaio	Pop. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.	NaCl	H2Omar	BZ	H2O2	0h	2d	5d	7d	9d	12d	14d	16d	19d	21d	23d	26d	28d	30d
1	5	2,5	5	0	0	0	0	30	9	3	4	5	3	4	5	5	3	7	4	5	4	4
2	15	2,5	5	0	0	1000	0,04	30	1101	33231	12510	398	10	3	5	3	3	5	4	4	7	7
3	5	7,5	5	0	0	1000	0,04	0	9681	21934	32756	48105	20704	2564	1024	2430	677	48	13051	6240	19	10655
4	15	7,5	5	0	0	0	0	0	2512	5	4	4	5	5	4	4	2	8	3	5	8	6
5	5	2,5	15	0	0	1000	0	0	17152	46638	176126	49856	14403	2788	1375	1228	117	198	9	5	8	4
6	15	2,5	15	0	0	0	0,04	0	2936	5	7	4	6	2	3	3	5	6	3	6	8	3
7	5	7,5	15	0	0	0	0,04	30	1927	4	7	5	4	6	4	8	2	5	4	4	9	4
8	15	7,5	15	0	0	1000	0	30	12535	1719	9674	441	3	2	7	6	4	6	4	4	7	4
9	5	2,5	5	6	0	0	0,04	0	15	2	3	7	10	4	6	3	4	6	2	3	4	2
10	15	2,5	5	6	0	1000	0	0	14565	1696	3882	2331	3042	849	2768	1504	1059	16971	16410	11227	23609	14404
11	5	7,5	5	6	0	1000	0	30	11857	6546	446	6	8	5	7	4	7	6	3	3	6	4
12	15	7,5	5	6	0	0	0,04	30	1939	8	6	6	5	3	5	8	3	5	5	5	7	4
13	5	2,5	15	6	0	1000	0,04	30	13990	39752	4417	37	6	6	145	36990	5	6	9	2	8	4
14	15	2,5	15	6	0	0	0	30	3091	6	6	4	3	4	5	4	9	9	3	6	3	4
15	5	7,5	15	6	0	0	0	0	2765	3	4	3	7	5	4	3	2	9	3	2	9	2
16	15	7,5	15	6	0	1000	0,04	0	8074	965	66	155	148	492	6554	9783	3917	6992	7320	1630	1470	10323
17	5	2,5	5	0	30	0	0	0	12221	232061	8431	1724	622	91	29	8	9	19	482	4	7	6
18	15	2,5	5	0	30	1000	0,04	0	442	14091	22063	20779	12284	667	82	15	4	5	3	3	4	7
19	5	7,5	5	0	30	1000	0,04	30	338	2595	6711	40238	13	2	3	3	4	3	4	2	5	4
20	15	7,5	5	0	30	0	0	30	10384	40682	7	3	6	6	4	8	3	6	2	5	7	5
21	5	2,5	15	0	30	1000	0	30	322	8693	17205	11579	11	3	5	5	3	4	4	3	5	3
22	15	2,5	15	0	30	0	0,04	30	2731	3	4	4	7	4	3	4	4	6	3	3	6	3
23	5	7,5	15	0	30	0	0,04	0	6176	42333	8660	4617	16504	2129	700	33	4	3	4	6	9	6
24	15	7,5	15	0	30	1000	0	0	211	592	111	71	48	21	7	6	3	6	774	1666	2849	3694
25	5	2,5	5	6	30	0	0,04	30	8124	64089	13759	9	3	6	4	4	4	3	3	4	11	4
26	15	2,5	5	6	30	1000	0	30	212	891	6	6	4	2	5	7	2	4	4	8	4	4
27	5	7,5	5	6	30	1000	0	0	255	529	51	20	9	4	6	7	4	5	5	4	6	5
28	15	7,5	5	6	30	0	0,04	0	5678	2640	418	37	8	4	5	4	2	9	3	3	4	3
29	5	2,5	15	6	30	1000	0,04	0	217	2941	934	170	49	13	196	771	4677	3513	4924	3978	3920	3912
30	15	2,5	15	6	30	0	0	0	8752	4331	1316	2572	670	89	1076	1068	1139	1779	860	1519	4725	889
31	5	7,5	15	6	30	0	0	30	7758	915	4	7	4	5	3	4	3	6	2	3	7	7
32	15	7,5	15	6	30	1000	0,04	30	197	616	5	8	8	4	4	4	4	4	4	2	6	2
33	10	5	10	3	15	500	0,02	15	8949	1707	54	4	16	39	6	5999	4420	4	4	3	4	5
34	10	5	10	3	15	500	0,02	15	8517	1165	17	4	4	3	7	455	2712	8515	3369	1277	4	3

Tabela 18. Resultados do DoE – 1 para o microrganismos 1564, sendo apresentado os valores de luminescência (fótons) para cada ensaio (composição de diferentes fatores) entre 0h e 30 dias.

Ensaio	Pop. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.	NaCl	H2Omar	BZ	H2O2	0h	2d	5d	7d	9d	12d	14d	16d	19d	21d	23d	26d	28d	30d
1	5	2,5	5	0	0	0	0	30	11	5	5	5	2	2	4	17	3	7	5	3	7	6
2	15	2,5	5	0	0	1000	0,04	30	76590	10607	4	5	6	3	6	3	5	6	5	2	8	4
3	5	7,5	5	0	0	1000	0,04	0	71757	5865	4	1101	642	126	57	37	9	13	8	3	10	3
4	15	7,5	5	0	0	0	0	0	2394	8	7	4	4	4	5	3	3	4	3	6	6	5
5	5	2,5	15	0	0	1000	0	0	98864	4381	981	613	262	87	29	13	6	9	3	4	8	4
6	15	2,5	15	0	0	0	0,04	0	3118	5	11049	4	7	4	8	3	4	7	4	11	5	8
7	5	7,5	15	0	0	0	0,04	30	1455	11	4	5	6	6	4	4	4	5	4	11	6	5
8	15	7,5	15	0	0	1000	0	30	44047	2998	3	3	7	8	3	9	7	9	4	3	4	4
9	5	2,5	5	6	0	0	0,04	0	10	4	7	7	3	3	5	2	3	4	5	3	5	4
10	15	2,5	5	6	0	1000	0	0	94564	4	5	3	6	2	5	9	4	5	4	2	4	7
11	5	7,5	5	6	0	1000	0	30	76719	12	74	5	9	9	5	6	3	3	2	3	4	3
12	15	7,5	5	6	0	0	0,04	30	1650	11	239	3	5	5	15	3	5	6	5	9	5	8
13	5	2,5	15	6	0	1000	0,04	30	55041	6426	4	6	7	3	6	5	5	3	3	7	4	2
14	15	2,5	15	6	0	0	0	30	4005	6	867	6	6	3	6	7	5	7	2	3	6	6
15	5	7,5	15	6	0	0	0	0	2440	5	579	6	3	5	3	3	4	8	4	5	6	4
16	15	7,5	15	6	0	1000	0,04	0	36477	35	2	28	211	3	4	6	3	7	3	18	38	27
17	5	2,5	5	0	30	0	0	0	67470	51906	504	6312	1852	326	138	90	23	18	10	9	5	5
18	15	2,5	5	0	30	1000	0,04	0	16431	13536	5	37282	45235	18922	34689	13380	5379	11679	3329	389	44	243
19	5	7,5	5	0	30	1000	0,04	30	9805	6463	47	4	5	4	5	4	3	5	6	3	5	8
20	15	7,5	5	0	30	0	0	30	60582	627	343	5	6	5	3	3	6	5	3	4	5	2
21	5	2,5	15	0	30	1000	0	30	12352	3315	6	4	5	2	9	2	3	7	3	6	6	3
22	15	2,5	15	0	30	0	0,04	30	2949	6	3	9	5	3	7	3	5	8	4	4	8	2
23	5	7,5	15	0	30	0	0,04	0	32196	595	4	90	58	26	17	16	6	17	4	3	8	6
24	15	7,5	15	0	30	1000	0	0	8544	2385	7	261	202	70	42	73	8	8	4	2	9	3
25	5	2,5	5	6	30	0	0,04	30	66540	30	2	3	6	3	4	5	3	7	5	3	6	3
26	15	2,5	5	6	30	1000	0	30	13666	13487	2	554	2256	4	4	3	6	4	5	2	5	5
27	5	7,5	5	6	30	1000	0	0	12894	8558	2	261	41	7	12	5	5	50	30	22	16	7
28	15	7,5	5	6	30	0	0,04	0	52935	54	4	7	3	6	3	2	4	345	242	13	61	2
29	5	2,5	15	6	30	1000	0,04	0	14676	4287	3	194	68	10	5	8	23	20	6	5	8	4
30	15	2,5	15	6	30	0	0	0	38996	82	3	260	2	3	7	0	0	0	6	2	9	3
31	5	7,5	15	6	30	0	0	30	34354	29	3	6	5	3	4	0	2	1	8	4	5	4
32	15	7,5	15	6	30	1000	0,04	30	7051	1849	5	142	62	47	5	1	1	2263	2725	6088	4309	
33	10	5	10	3	15	500	0,02	15	57696	39	4	20	15	878	340	1401	1194	7580	11	3	5	4
34	10	5	10	3	15	500	0,02	15	59104	38	6	4	3	3	7	2	5	6	5	3	5	4

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados os microrganismos 1485 e 1564 para a realização de um segundo DoE, contendo os fatores significativos selecionados a partir do DoE - 1. Devido aos resultados obtidos no planejamento anterior, foram utilizadas abordagens diferentes entre os

microrganismos 1485 e 1564. Para a bactéria 1485 foi utilizado um planejamento de fracionado. Para tal, foi realizado um DoE fracionado com 4 variáveis independentes ($2^{5-1}+4pc$) (Tabelas 19, 20 e 21).

Tabela 19. Fatores avaliados no Planejamento Experimental (DoE – 2) a fim de otimizar a atividade de bioluminescência do microrganismo 1485.

Variáveis	-1	0	1
Peptona Bacteriológica (g/L)	5	10	15
Extrato de Levedura (g/L)	0	1,25	2,5
Triptona (g/L)	0	2,5	5
Glicerol (mL/L)	0	3	6

Tabela 20. Planejamento Experimental (DoE – 2) fracionado para a linhagem 1485.

Ensaio	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.
1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	-1
3	1	1	1	-1
4	1	1	1	1
5	-1	1	1	1
6	1	-1	1	1
7	-1	1	-1	1
8	1	-1	1	-1
9	1	1	-1	1
10	-1	1	1	-1
11	-1	-1	1	1
12	1	-1	-1	1
13	-1	1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1
15	-1	-1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Tabela 21. Planejamento Experimental (DoE – 2) fracionado para a linhagem 1485 com detalhamento das concentrações (g/L e mL/L) de cada fator para cada ensaio (tratamento).

Ensaio	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.
1	15	0	0	0
2	15	2,5	0	0
3	15	2,5	5	0
4	15	2,5	5	6

5	5	2,5	5	6
6	15	0	5	6
7	0	2,5	0	6
8	15	0	5	0
9	15	2,5	0	6
10	5	2,5	5	0
11	5	0	5	6
12	15	0	0	6
13	5	2,5	0	0
14	5	0	5	0
15	5	0	0	6
16	5	0	0	0
17	10	1,25	2,5	3
18	10	1,25	2,5	3
19	10	1,25	2,5	3
20	10	1,25	2,5	3

Para a bactéria 1564 foi utilizado um planejamento de fracionado. Para tal, foi realizado um DoE fracionado com 6 variáveis independentes ($2^{6-2}+4pc$) (Tabelas 22, 23 e 24).

Tabela 22. Fatores avaliados no Planejamento Experimental (DoE – 2) a fim de otimizar a atividade de bioluminescência do microrganismo 1564.

Variáveis	-1	0	1
Peptona Bacteriológica (g/L)	5	10	15
Extrato de Levedura (g/L)	0	1,25	2,5
Triptona (g/L)	0	2,5	5
NaCl (g/L)	0	15	30
H2Omar (mL)	0	500	1000
B2 (mg/L)	0	0,04	0,08

Tabela 23. Planejamento Experimental (DoE – 2) fracionado para a linhagem 1564.

Ensaio	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	NaCl	mar	B2
1	1	-1	-1	-1	1	-1
1	1	1	-1	-1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1
4	1	1	1	1	-1	-1
5	-1	1	1	1	1	-1
6	1	-1	1	1	1	1
7	-1	1	-1	1	1	1
8	1	-1	1	-1	1	1
9	1	1	-1	1	-1	1
10	-1	1	1	-1	1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1

12	1	-1	-1	1	1	-1
13	-1	1	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Tabela 24. Planejamento Experimental (DoE – 2) fracionado para a linhagem 1564 com detalhamento das concentrações (g/L e mL/L) de cada fator para cada ensaio (tratamento).

Ensaio	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	NaCl	mar	B2
1	15	0	0	0	1000	0
2	15	2,5	0	0	0	0,08
3	15	2,5	5	0	0	0
4	15	2,5	5	30	0	0
5	5	2,5	5	30	1000	0
6	15	0	5	30	1000	0,08
7	5	2,5	0	30	1000	0,08
8	15	0	5	0	1000	0,08
9	15	2,5	0	30	0	0,08
10	5	2,5	5	0	1000	0
11	5	0	5	30	0	0,08
12	15	0	0	30	1000	0
13	5	2,5	0	0	1000	0,08
14	5	0	5	0	0	0,08
15	5	0	0	30	0	0
16	5	0	0	0	0	0
17	10	1,25	2,5	15	500	0,04
18	10	1,25	2,5	15	500	0,04
19	10	1,25	2,5	15	500	0,04
20	10	1,25	2,5	15	500	0,04

Para o microrganismo 1485, os resultados demonstraram que o ensaio 1 contendo 15g/L de Peptona Bacteriológica diluída em H₂O do mar foi a que obteve o maior tempo de atividade (84 dias) com uma luminescência máxima de 28352 fótons (Tabela 25).

Tabela 25. Resultados do DoE – 2 para o microrganismos 1485, sendo apresentado os valores de luminescência (fótons) para cada ensaio (composição de diferentes fatores) entre 1 e 95 dias.

1485	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	Glic.	Salinidade	Brix	1d	3d	8d	15d	22d	29d	36d	43d	50d	64d	71d	76d	84d	95d
1	15	0	0	0	50	5,9	34425	78053	41512	26089	39566	22192	34041	16235	27499	5551	10996	4076	12779	38
2	15	2,5	0	0	52	6	44861	377961	137894	20074	6701	97	6	50	14	4	4	3	3	3
3	15	2,5	5	0	56	6,2	341646	583424	49758	15321	39072	6928	39	43	4	2	2	4	4	4
4	15	2,5	5	6	62	7	11	24	4	9	10	6	3	4	10	3	3	2	2	2
5	5	2,5	5	6	52	6	6	7	5	7	6	6	4	2	2	4	4	2	2	2
6	15	0	5	6	60	7	6	8	4	7	6	4	3	3	15	2	4	4	4	4
7	5	2,5	0	6	42	4,9	7	14	5	8	8	11	5	4	3	4	2	2	2	2
8	15	0	5	0	56	6,2	96129	401787	32994	51356	6662	279	11	109	29	2	3	3	3	3
9	15	2,5	0	6	57	6,3	8	69	5	7	6	5	4	3	2	3	4	2	2	2
10	5	2,5	5	0	47	5,2	155879	439183	154394	20767	422	57	7	6	5	4	2	3	3	3
11	5	0	5	6	50	5,9	6	17	14	5	5	6	3	4	3	2	2	4	4	4
12	15	0	0	6	54	6,1	4	4	2	4	4	4	4	2	5	2	4	2	2	2
13	5	2,5	0	0	41	4,8	65024	99470	16912	546	53	14	2	3	4	3	2	2	2	2
14	5	0	5	0	46	5	65403	120454	87044	32114	780	160	16	14	3	3	3	4	4	4
15	5	0	0	6	45	5	12	20	5	11	9	5	5	3	4	4	4	2	2	2
16	5	0	0	0	42	4,3	27722	20725	11365	7661	9073	4948	22010	4079	2310	55	82	4	4	5
17	10	1,25	2,5	3	50	5,9	6	8	4	6	6	9	4	3	2	4	4	3	2	2
18	10	1,25	2,5	3	50	5,9	6	10	4	5	7	7	4	3	2	2	2	3	2	2
19	10	1,25	2,5	3	50	5,9	7	6	4	7	8	7	2	5	4	3	3	2	4	4
20	10	1,25	2,5	3	50	5,9	7	15	5	6	8	3	3	3	4	4	4	2	2	2

Para o microrganismo 1564, os resultados demonstraram que o ensaio 12 contendo 15g/L de Peptona Bacteriológica + 5 g/L de Triptona + 30 g/L de NaCl, diluídos em H₂O do mar foi a que obteve o maior tempo de atividade (22 dias) com uma luminescência máxima de 136375 fótons (Tabela 26).

Tabela 26. Resultados do DoE – 2 para o microrganismos 1564, sendo apresentado os valores de luminescência (fótons) para cada ensaio (composição de diferentes fatores) entre 1 e 50 dias.

1564	Pep. Bact.	Ext. Lev.	Tript.	NaCl	mar	B2	1d	3d	8d	15d	22d	29d	36d	43d	50d
1	15	0	0	0	1000	0	28253	20423	18323	2990	590	157	367	99	3
2	15	2,5	0	0	0	0,08	6	7	4	8	7	8	4	3	3
3	15	2,5	5	0	0	0	8	5	5	16	4	8	3	3	2
4	15	2,5	5	30	0	0	52228	7906	137	22	9	10	5	2	5
5	5	2,5	5	30	1000	0	13090	42085	1184	516	70	94	10	6	3
6	15	0	5	30	1000	0,08	34681	111526	7526	1127	637	152	5	32	2
7	5	2,5	0	30	1000	0,08	87053	76458	12324	617	117	14	34	5	6
8	15	0	5	0	1000	0,08	43119	2956	897	163	98	85	124	87	7
9	15	2,5	0	30	0	0,08	155705	65076	753	86	21	8	39	2	5
10	5	2,5	5	0	1000	0	21146	2763	230	102	36	5	3	15	7
11	5	0	5	30	0	0,08	66516	41075	665	15	11	9	3	5	3
12	15	0	0	30	1000	0	60679	136375	29990	2245	1363	881	391	201	7
13	5	2,5	0	0	1000	0,08	53592	12840	380	52	12	7	8	5	2
14	5	0	5	0	0	0,08	7	8	4	6	9	5	2	3	5
15	5	0	0	30	0	0	10	4	4	8	9	6	4	2	3
16	5	0	0	0	0	0	6	7	3	4	4	4	3	6	2
17	10	1,25	2,5	15	500	0,04	66175	6554	607	118	36	8	21	7	7
18	10	1,25	2,5	15	500	0,04	64945	6806	391	115	17	6	5	5	5
19	10	1,25	2,5	15	500	0,04	65030	6803	448	221	119	13	7	7	7
20	10	1,25	2,5	15	500	0,04	64945	6554	391	8	36	4	4	3	5

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados os microrganismos 1485 e 1564 para a realização de um terceiro DoE, contendo os fatores significativos selecionados a partir do DoE - 2.

Para ambas as bactérias foi utilizado um planejamento CCDR. Para tal, foi realizado um DoE com 2 variáveis independentes (2²+3pc+4axiais), diluídos em H₂O do mar (Tabelas 27, 28 e 29).

Tabela 27. Fatores avaliados no Planejamento Experimental (DoE – 3) a fim de otimizar a atividade de bioluminescência dos microrganismos 1485 e 1564.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Peptona Bacteriológica (g/L)	0	4,4	15	25,6	30
NaCl (g/L)	0	8,8	30	51,2	60

Tabela 28. Planejamento Experimental (DoE – 3) para as linhagens 1485 e 1564.

Ensaio	Peptona	NaCl
1	1	1
2	1	-1
3	-1	1
4	-1	-1
5	1,41	0
6	-1,41	0
7	0	1,41
8	0	-1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 29. Planejamento Experimental (DoE – 3) para as linhagens 1485 e 1564 com detalhamento das concentrações (g/L e mL/L) de cada fator para cada ensaio (tratamento).

Ensaio	Pep. Bact.	NaCl
1	25	51,2
2	25	8,8
3	5	51,2
4	5	8,8
5	30	30
6	0	30
7	15	60
8	15	0
9	15	30
10	15	30
11	15	30

Para o microrganismo 1485, os resultados demonstraram o potencial em manutenção da atividade por 84 dias com uma luminescência máxima de 334177 fótons. O meio desenvolvido foi chamado de BO1485 e encontra-se sob segredo industrial. Para o microrganismo 1564, os resultados

demonstraram o potencial de manutenção da atividade por 55 dias, com uma luminescência máxima de 9449 fótons. O meio desenvolvido foi chamado de BO1564 e encontra-se sob segredo industrial.

Com o desenvolvimentos dos meios de cultivo, tanto o microrganismo 1485, quanto o 1564 estão aptos a serem empregados diretamente na formulação final, sem uso de manipulação genética. No entanto, o microrganismo 1485 foi selecionado por ter apresentado resultados mais promissores e por ser uma espécie nova para a literatura.

3.5.9. Validação

Para validar os resultados obtidos até o momento, foram avaliados diferentes faixas de parâmetros ambientais (meios de cultivo, temperatura, pH, salinidade) e, posteriormente, testados de forma integrada de forma estática e sob agitação (180 rpm).

As faixas de concentração de NaCl para crescimento foram determinadas em meio TS suplementado com NaCl em concentrações variando de 0% a 12% (0, 0,5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12%). O crescimento em diferentes temperaturas (4, 10, 20, 30, 37, 45, 60°C) e níveis de pH tamponado (4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10) foi determinado em meio MD. Os ensaios apresentaram densidade óptica inicial de 0,05 a 600 nm e foram incubados com agitação (180 rpm) a 30°C. A biomassa (OD_{600nm}) e a emissão de luz (LUM) foram estimadas em 6h, 24h, 48h, 72h e 168h usando um espectrofotômetro. A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 30. Crescimento (Biomassa_{600 nm}) e emissão de luz (Lum) da bactéria 1485 (180 rpm, 30 °C) expostos a diferentes meios de cultura, concentrações de NaCl, temperaturas (°C) e níveis de pH.

Meio de Cultura	Biomassa			Luminescência		
	Mínimo	Máximo	Nédia	Mínimo	Máximo	Média
MD	0,270	0,863	0,634	207	12058	5567
BO1485	0,787	1,073	0,914	603	33847	14925
TS	0,104	0,663	0,2635	3	47530	7740

NaCl (%)	Biomassa			Luminescência		
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
0	0,137	0,663	0,271	3	2195	443
0,5	0,369	0,826	0,580	2	2200	456
2	0,601	0,953	0,793	411	10486	6083
3	0,601	1,141	0,974	780	59440	14263
4	0,419	0,904	0,688	2	8231	4258
6	0,277	0,415	0,283	12	5851	1691

8	1,161	1,213	0,353	2	43	10
9	0,069	0,135	0,081	2	65	11
10	0,07	0,134	0,082	2	41	9
11	0,065	0,127	0,081	2	52	11
12	0,061	0,133	0,081	3	83	14

Temperatura (°C)	Biomassa		Luminescência			
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
4	0,171	0,712	0,375	273979	940258	544166
10	0,270	0,653	0,510	193127	1212214	629521
20	0,417	0,905	0,716	43565	842167	293614
30	0,604	0,784	0,700	207	12058	5178
37	0,279	0,715	0,399	3	52	15
45	0,161	0,234	0,1816	4	6	4
60	0,151	0,230	0,176	2	8	5

pH	Biomassa		Luminescência			
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
4,5	0,092	0,155	0,110	2	30	9
5	0,414	0,544	0,475	1462	294863	65567
5,5	0,542	1,136	0,727	2475	327829	73354
6	0,699	0,879	0,799	4384	322808	73429
6,5	1,187	1,303	1,244	6522	420324	90345
7	1,216	1,438	1,3222	1537	298674	68017
7,5	1,185	1,439	1,323	1472	373805	84112
8	1,128	1,574	1,446	4953	378799	95969
8,5	0,590	0,793	0,680	62	400265	102449
9	0,618	0,820	0,705	3	716271	160225
9,5	0,636	0,893	0,760	185	733411	148143
10	0,754	0,945	0,845	124	632072	127419

A cepa bacteriana cresceu melhor em BO1485, seguido por MD e TS. Para emissão de luz por luminescência, o meio BO1485 foi mais eficaz, validando o DoE. O 1485 foi capaz de crescer em concentrações de NaCl variando de 0 a 8%, com uma concentração ótima para crescimento entre 0,5 a 4%. Por outro lado, para emissão de luz, a concentração ótima de NaCl foi de 3%. A bactéria foi capaz de crescer em temperaturas de 4 a 37 °C, com crescimento ótimo ocorrendo em 20 °C e 30 °C. No entanto, para emissão de luz, as temperaturas ótimas estavam entre 4 °C e 10 °C. A cepa também cresceu em níveis de pH de 5 a 10, com crescimento ótimo em pH 6,5 a 8. Para emissão de luz, não foram observadas diferenças no pH de 5 a 10.

Para avaliar a emissão de luz da bactéria 1485 em diferentes parâmetros de composição, com base

nos resultados dos parâmetros individuais, um ensaio foi realizado em dois meios de cultura, MD e BO1485. As culturas foram expostas a condições estáticas (0 rpm) e agitadas (180 rpm) em pH 6,5 ou 9 a 10°C. N-acetil-D-glucosamina (NAG) foi adicionada no tempo 0 (300 µL 15 mL⁻¹) – substrato de carbono previamente avaliado em Biolog EcoPlate, representando as condições ideais de crescimento com base em resultados anteriores. O ensaio durou 100 dias, com análises de biomassa e luminescência (em tubo Falcon de 50 mL contendo 15 mL de inóculo). A OD₆₀₀ inicial foi de 0,05 e o ensaio teve duração de 100 dias.

O meio BO1485 apresentou efeito significativo na luminescência a longo prazo, enquanto o MD parece estimular a emissão de luz de forma mais significativa na primeira semana. O mesmo foi observado para a biomassa. Em relação ao pH, entre 48h e 7 dias, o pH 9 parece estimular mais a luminescência. A partir de 14 dias, seu estímulo é semelhante ao pH 6,5. No entanto, um pH mais ácido permitiu que a luminescência fosse mantida até 100 dias. Para a biomassa, o pH 6,5 foi mais positivo, exceto no último momento de amostragem. Em relação ao tipo de incubação, maior luminescência foi registrada para culturas agitadas nas primeiras 48h. No entanto, após esse período, observou-se que culturas estáticas beneficiam a emissão de luz. Sua biomassa, no entanto, se beneficia da agitação.

3.6. ETAPA 07: formulação

3.6.1. Teste de diferentes formulações bioluminescentes

Para avaliar a capacidade do microrganismos 1485 em sobreviver a diferentes ingredientes de uma formulação, foi realizado um teste de toxicidade com os seguintes potenciais ingredientes: glicerol (confere aumento de flexibilidade, Tween 80 (confere aumento de adesão), óleo de soja (confere barreira contra a água), cloreto de cálcio (confere firmeza e barreira contra a água), goma xantana, alginato e siliconte (utilizado como base – reduz a perda de água). O ensaio foi realizado em placas multipoços contendo diferentes concentrações dos ingredientes, sendo avaliada a bioluminescência após 72h de exposição. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos.

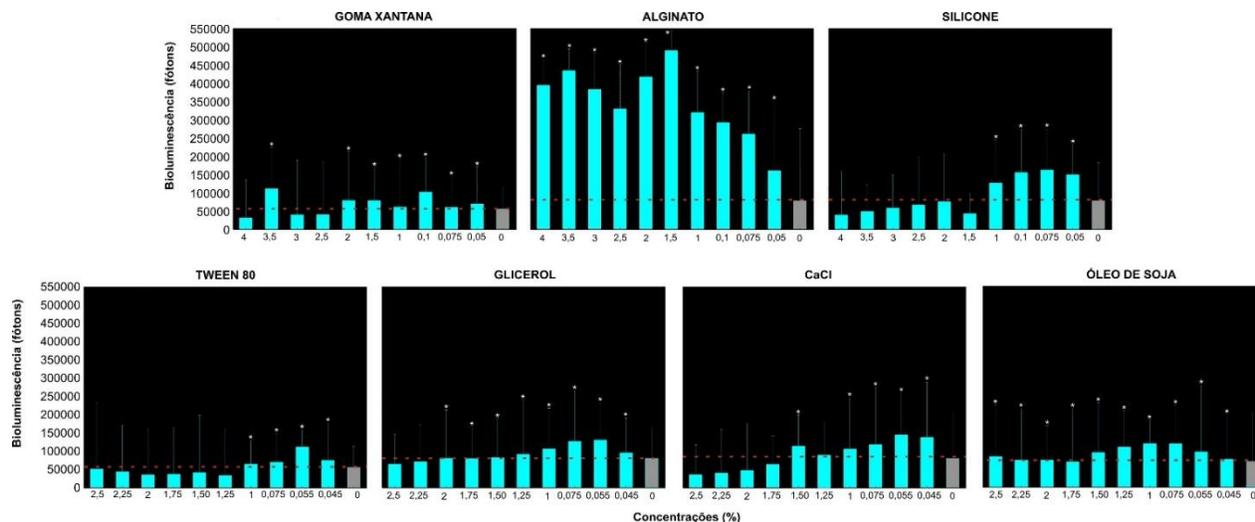


Figura 16. Avaliação toxicológica de diferentes ingredientes de formulação, usando como endpoint a produção de bioluminescência pelo microrganismo 1485.

Todos os ingredientes em pelo menos quatro concentrações apresentaram resultados seguros para aplicação em formulação bioluminescente. No entanto, a base alginato foi a que apresentou resultados mais significativos de incremento de bioluminescência, auxiliando na intensidade luminosa do microrganismo.

Foi avaliada a capacidade do microrganismo em sobreviver ao contato com o asfalto com e sem formulação, sendo verificado que o substrato é tóxico, independentemente dos ingredientes utilizados para minimizar o contato. A bioluminescência é inativada, quase que instantaneamente ao contato. Desta forma, a formulação deve ser isolada do contato com o asfalto.

3.6.2. Definição da formulação

Com base nos resultados obtidos e nos protótipos idealizados, foram desenvolvidas duas opções de formulação:

- a. Ingredientes: BO1485 + CaCl₂ 2% + Alginato 3,5% + Água do Mar + Microrganismo 1485

Tipo de Formulação: Esferas

Processo: uma base contendo o meio BO1485 + Alginato 3,5% é preparada em plataforma magnética agitadora aquecida (30°C). Após completa homogeneização e dissolução do alginato, resfria-se a formulação para adição dos microrganismos na concentração $>1 \times 10^6$ em fótons para obter uma concentração final $>1 \times 10^5$ em fótons (10% de inóculo em relação

à formulação). Posteriormente, pipeta-se com auxílio de uma agulha a formulação em solução de CaCl_2 2% diluído em H_2O do mar sob agitação, para a formação de microesferas bioluminescentes (Figura 17).

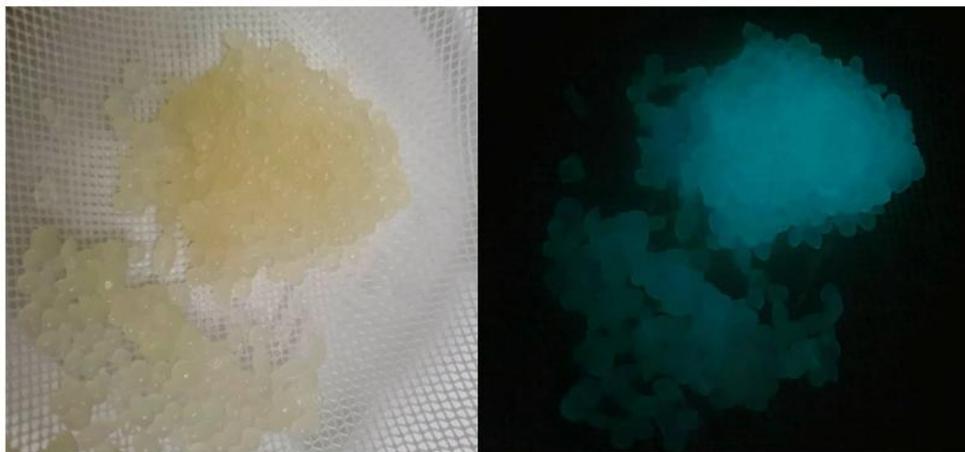


Figura 17. Formulação bioluminescente com o microrganismos 1485 por meio de processo de esferificação.

b. Ingredientes: BO1485 + NAG + Alginato 3,5% + Microrganismo 1485

Tipo de Formulação: Líquida

Processo: Produção em reator do microrganismo em meio BO1485 (inóculo inicial 0,05) por 6 horas (pH 6,5, temperatura 10°C , com oxigenação, estático), adição de Alginato 3,5% (30% do volume total do reator) + NAG ($1\text{mL } 50\text{mL}^{-1}$). Após 2h a formulação está pronta (Figura 18).

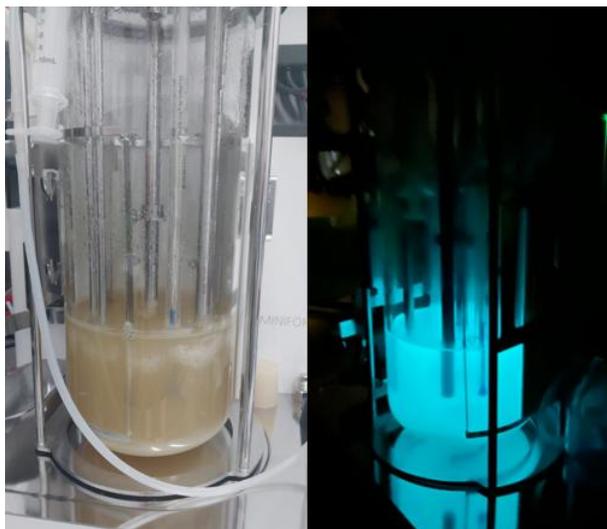


Figura 18. Formulação bioluminescente com o microrganismos 1485 por meio de processo em reator.

3.7. ETAPA 08: desenvolvimento do protótipo e teste em campo

3.7.1. Desenvolvimento do protótipo

Os protótipos bioluminescentes desenvolvidos se basearam na aplicação das formulações (esferas e líquida). O objetivo foi a validação em ambiente relevante (TRL 5) do potencial de aplicação na sinalização de rodovias e EPIs. Para tal, foram projetados dois protótipos para cada formulação, para a sinalização de rodovias e sinalização de EPI em dois testes em campo.

Identificação dos Protótipos – Teste 1: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)

Descrição do Protótipo: O protótipo PBOL001r emprega duas mangueiras caneladas de 3,20 metros de comprimento para a demarcação de acostamentos e faixas. A formulação inovadora consiste em bactérias bioluminescentes encapsuladas em esferas de alginato de sódio (3,5%) com nutriente (Peptona Bacteriológica) e sal (H₂O do mar), as quais são depositadas nas canaletas das mangueiras. Este design oferece uma solução inovadora e potencialmente autoiluminada para a sinalização de segurança viária. O protótipo PBOL001e é um capacete de EPI com a formulação de esferas inserida na frente capacidade em fita transparente e maleável (Figura 19). Abaixo uma imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL001r e PBOL001e (Figura 20).

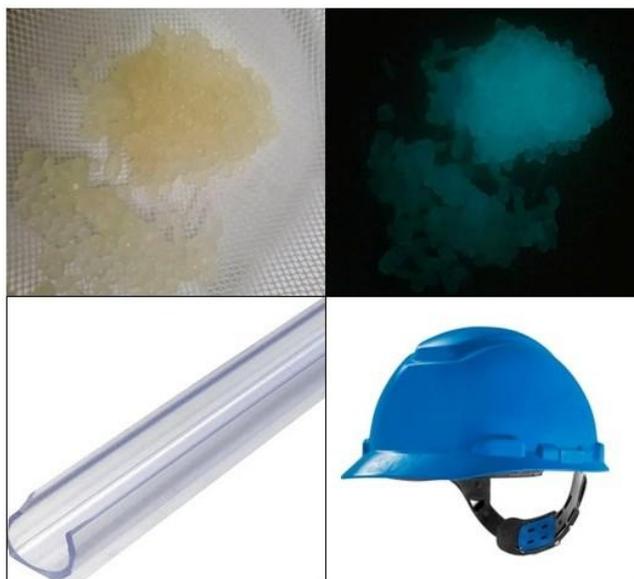


Figura 19. Componentes utilizados para a construção dos protótipos bioluminescentes com formulação composta por esferas de alginato de sódio (imagens acima) e pelos sistemas escolhidos para a inserção da formulação PBOL001r (embaixo a esquerda) e PBOL001e (embaixo a direita).



Figura 20. Imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL001r (esquerda) e PBOL001e (direita).

Identificação dos Protótipos – Teste 2: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

Descrição do Protótipo: O protótipo PBOL002r é sistema emprega duas mangueiras transparentes de 20 mm internos de 10 metros de comprimento para a demarcação de acostamentos e faixas. A formulação inovadora consiste em bactérias bioluminescentes em meio viscoso (27% de alginato de sódio a 3,5%), composto por nutrientes (Peptona bacteriológica) e sal (H_2O do mar), sendo a produção realizada em biorreator. Este design oferece uma solução inovadora e potencialmente autoiluminada para a sinalização de segurança viária. O protótipo PBOL002e é um capacete de EPI com a formulação inserida em 50% da capacidade de mangueira transparente e maleável de 1 cm de diâmetro (Figura 21). Abaixo uma imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL002r e PBOL002e (Figura 22).



Figura 21. Componentes utilizados para a construção dos protótipos bioluminescentes com formulação viscosa (imagens acima) e pelos sistemas escolhidos para a inserção da formulação PBOL002r (embaixo a esquerda) e PBOL002e (embaixo a direita).



Figura 22. Imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL002r (esquerda) e PBOL002e (direita).

3.7.2. *Produção de biomassa em biorreator dos tratamentos a serem testados nas rodovias*

O escalonamento da produção de microrganismos é uma etapa crucial para transformar uma descoberta de laboratório em um produto viável industrialmente. O processo exige uma transição cuidadosa, partindo de pequenos volumes em frascos de Erlenmeyer para sistemas controlados e de maior volume, como o biorreator de bancada Minifors 2 (INFORS HT).

O processo em biorreator representa a passagem para uma cultura mais controlada para replicar as condições ideais de crescimento, mas em um volume significativamente maior. A principal vantagem é o controle preciso de parâmetros críticos de processo, como, temperatura, agitação, pH (através de aeração, agitação, acidez controladas). Manter um ambiente constante e ideal é fundamental para maximizar a viabilidade celular, o crescimento (biomassa) e a produção do produto de interesse (bioluminescência). Ainda, o sistema de agitação e aeração do biorreator garante uma mistura consistente de nutrientes e oxigênio, minimizando os gradientes que são comuns em Erlenmeyer grandes.

O experimento de cultivo durou 18 dias, utilizando o meio BO1485 com um inóculo inicial de 0,05 (OD) (Figura 23). A temperatura foi fixada em 28°C (para estimular a biomassa). O pH não foi controlado, permitindo a observação da variação natural da cultura e do perfil metabólico do microrganismo. A agitação (20 min^{-1}) e a aeração ($0,5 \text{ L min}^{-1}$ de O_2 a 21%) foram ajustadas para níveis mínimos. Essa estratégia operacional visa entender o comportamento do microrganismo sob condições menos otimizadas (limitação de O_2). O processo no reator foi monitorado em paralelo com cultivos em escalas menores (20, 50, 200, 400 e 800 mL) para avaliar a transferência de escala. Durante o período, foram retiradas amostras para avaliação da biomassa e da luminescência.

Os resultados demonstraram um pico de bioluminescência entre 6 e 96h de processo em reator, sendo inversamente proporcional a biomassa, que teve o seu pico com 168h. O pH sofreu um declínio, tornando a cultura mais ácida, subindo com 24h. Durante o bioprocessamento, o pH variou entre 6,5 e 9,0. O oxigênio foi consumido nas primeiras 6h, indicando o uso para a reação de bioluminescência (Figura 24).



Figura 23. Bioprocesso do microrganismo 1485 em reator Minifors 2 (INFORS HT).

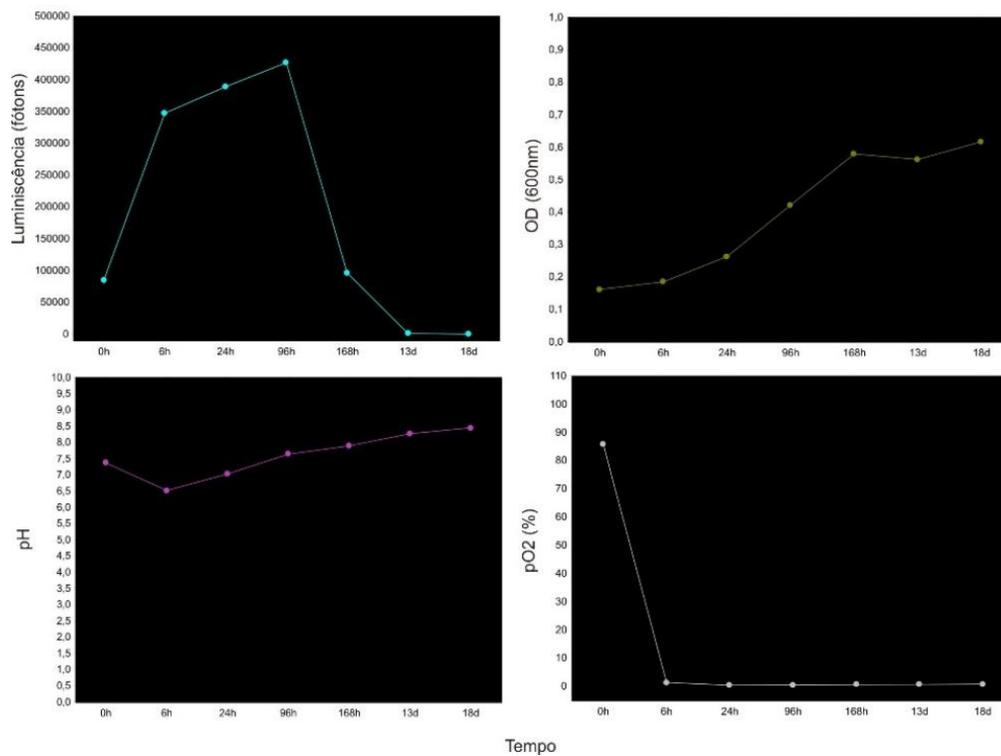


Figura 24. Parâmetros monitorados durante o bioprocesso do microrganismo 1485 em reator Minifors 2 (INFORS HT).

Em relação ao escalonamento, não foram verificadas diferenças significativas (ANOVA One-way) entre os diferentes volumes (Figura 25).

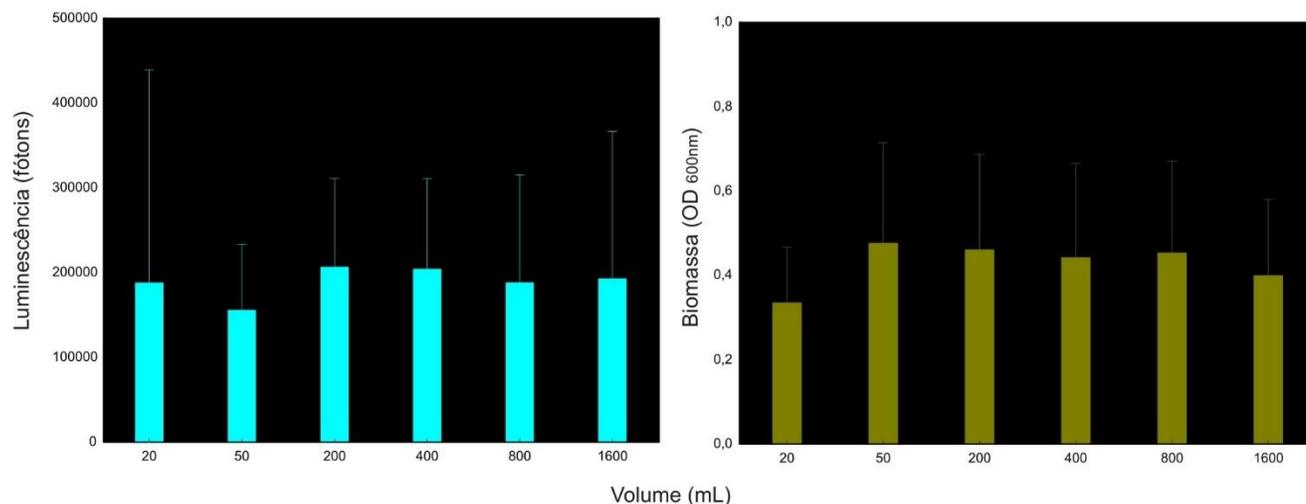


Figura 25. Resultado de bioluminescência (fótons) e biomassa (OD_{600nm}) do escalonamento do microrganismos 1485.

3.7.3. Aplicação simulando o campo

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 01

ID: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)

MICRORGANISMO: 1485

VOLUME: 4L

DATA DA ESFERIFICAÇÃO: 22/07/2025

AGULHA: Hipodérmica 30x0,70mm 22G1 1/4

AGITAÇÃO PA: 1300 rpm

TEMPERATURA PA: 10°C

VELOCIDADE DE GOTEJAMENTO: 20 mL/min (BP LeadFluid BT601L)

LAVAGEM: NÃO

LUM DAS EFERAS:

Lote 1 – Hora: 10h52 42806 60275 47377

Lote 2 – Hora: 11h18 67991 91717 59110

Lote 3 – Hora: 12h05 65844 94440 93343

Lote 4 – Hora: 12h50 78966 171385 35552 121963 50918 4533

Lote 5 – Hora: 13h33 17463 16662 114866 134441 115212 69296

Lote 6 – Hora: 14h 11159 11885 6316 63042 69307 107895

Lote 7 – Hora: 14h35 131272 10328 166804 59859 175290 78055

Lote 8 – Hora: 15h15 161514 7202 5327 157411 47835 196756

Lote 9 – Hora: 16h15 138352 308605 91557 5793 4027 9048

HORA DE FINALIZAÇÃO: 16h15

T° AMBIENTE: 22,4

UMIDADE: 49%

COMPROVAÇÃO EM SALA ESCURA: SIM

DATA DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 22/07/2025

HORÁRIO DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 19h00

Local Exato do Teste:

Campus do Vale – UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil - 30°03'59.6"S 51°07'21.7"W

Tipo de via: Chão batido

Condições da Via:

Seca

Úmida

Molhada

Poças

Nível de Iluminação Natural: 1 (lua)

Temperatura Ambiente (°C): 14,1

Umidade Relativa do Ar: 86%

Condição do Céu:

Ensolarado

Noturno

Nublado

Chuvoso

Garoa

Neblina

Temporal

Velocidade do Vento: 6Km/h

Descrição do Tempo: Dia de sol com algumas nuvens e névoa ao amanhecer. Noite com poucas nuvens. Temperatura entre 9 e 22°C, sem chuva. Vento com direção NNW, umidade do ar entre 69 e 97%.

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 02

ID: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

MICROORGANISMO: 1485

VOLUME: 7L

DATA DA FORMULAÇÃO: 14/08/2025

LUM E OD DA PRODUÇÃO:

Lote 1 – 12/08 - Hora: 17h00 – 225131, 289899, 241908 – 28°C

0,257, 0,254, 0,256

Lote 2 – 13/08 - Hora: 9h00 – 186892, 188053, 181024 – 28°C

0,689, 0,686, 0,689

Lote 3 – 13/08 - Hora: 12h05 – 681962, 827484, 664796 – 10°C

0,772, 0,769, 0,757

Lote 4 – 13/08 - Hora: 16h50 – 221899, 257821, 237861 – 10°C

0,749, 0,752, 0,753

Lote 5 – 14/08 - Hora: 08h45 – 59024, 61846, 62978 – 20°C

1,012, 1,028, 1,022

Lote 6 – 14/08 - Hora: 9h20 – 38956, 40454, 41755 – 20°C+Alg

0,936, 0,936, 0,973

Lote 7 – 14/08 - Hora: 11h – 48565, 48768, 49225 – 10°C

0,932, 0,917, 0,924

Lote 8 – 14/08 - Hora: 12h30 – 79595, 82242, 81181 – 10°C

0,954, 0,980, 0,961

Lote 9 – 14/08 - Hora: 14h45 – 69604, 63709, 65875 – 10°C

0,992, 1,007, 0,999

Lote 10 – 14/08 - Hora: 16h00 – 79604, 80709, 81875 – 10°C - NAG

1,002, 1,007, 1,006

T° AMBIENTE: 10°C

UMIDADE: 100%

COMPROVAÇÃO EM SALA ESCURA: SIM

DATA DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 14/08/2025

HORÁRIO DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 19h30

Local Exato do Teste:

Campus do Vale – UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil - 30°03'59.6"S 51°07'21.7"W

Tipo de via: Chão batido

Condições da Via:

Seca

Úmida

Molhada

Poças

Nível de Iluminação Natural: 1 (lua)

Temperatura Ambiente (°C): 9,4

Umidade Relativa do Ar: 76%

Condição do Céu:

Ensolarado

Noturno

Nublado

Chuvoso

Garoa

Neblina

Temporal

Velocidade do Vento: 10Km/h

Descrição do Tempo: Dia de sol com muitas nuvens durante o dia. Noite com muitas nuvens. Temperatura entre 10 e 15°C, com 40% de probabilidade de chuva (3 mm). Vento com direção S, umidade do ar entre 66 e 90%.

3.7.4. Definição da qualificação dos parâmetros

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 01

Identificação do Protótipo: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)

Tempo para Instalação do Protótipo em Campo: 30 min

Tempo do Teste em Campo: 60 min

Variação da Luz Emitida: Registro da intensidade luminosa (em fótons) ao longo do tempo a 4-10° C em sistema fechado. Os protótipos tiveram durabilidade de 8 dias, após a montagem, embora a bioluminescência tenha diminuído significativamente após 2 dias.

Lote 11 – Data: 22/07 - 75512 64223 15244 60834

Lote 12 – Data: 23/07 –12482 18545 4127 1905

Lote 13 – Data: 24/07 - 36064 56492 33145 45193

Lote 14 – Data: 25/07 - 8888 8552 3520 1404

Lote 15 – Data: 28/07 - 4285 2081 13212 9982

Lote 16 – Data: 30/07 - 11636 305 1046 3674

Lote 17 – Data: 01/08 - 51 124 62 252

Lote 18 – Data: 06/08 - 7 445 467 2297

Lote 19 – Data: 11/08 - 14 6 6 428

Status Visual do Protótipo: Durante o período de teste, não foram observadas mudanças visíveis na estrutura ou nos componentes.

Umidade Interna do Protótipo: 55%

pH Interno do Protótipo: 6-7

Temperatura interna do Protótipo: 21,9

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 02

Identificação do Protótipo: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

Tempo para Instalação do Protótipo em Campo: 10 min

Tempo do Teste em Campo: 60 min

Variação da Luz Emitida: Registro da intensidade luminosa (em fótons) e biomassa ao longo do tempo (diário/semanal) a 4-10° C em sistema fechado. Os protótipos tiveram durabilidade de 6 dias, após a montagem, embora a bioluminescência tenha diminuído significativamente após 1 dia, devido à ausência de entrada de oxigênio.

Lote 11 – Data: 15/08 – 34379, 343344, 35244, 36826

0,933, 0,966, 0,969, 0,965

Lote 12 – Data: 18/08 – 8725, 8443, 3104, 2872

1,169, 1,176, 1,185, 1,188

Lote 13 – Data: 20/08 – 987, 890, 602, 611

1,116, 1,107, 1,072, 1,086

Status Visual do Protótipo: Durante o período de teste, não foram observadas mudanças visíveis na estrutura ou nos componentes.

Umidade Interna do Protótipo: 100%

pH Interno do Protótipo: 8

Temperatura interna do Protótipo: 10°C

3.7.5. Análise estatísticas dos dados observados

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 01

Identificação do Protótipo: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)

Estabilidade da Sinalização (Luminosidade/Intensidade ao Longo do Tempo): Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve estabilidade da luminosidade e intensidade. No entanto, como já é conhecida a degradação, com o tempo deverá haver perda da intensidade luminosa produzida.

Gradação da Intensidade Luminosa: A intensidade da luz varia ao longo do tempo, demonstrando degradação. No entanto, há um incremento na bioluminescência entre 1 e 6 dias, sendo inversamente proporcional à biomassa. A durabilidade da luminosidade está diretamente relacionada ao consumo de nutrientes/substrato e a concentração de oxigênio dissolvido.

Consumo de Nutrientes/Substrato: O protótipo depende de substrato para a produção de luz. Este substrato é consumido com o tempo e também sofre variação de pH a partir do metabolismo dos microrganismos, o que pode levar a perda de bioluminescência, mesmo com a quantidade de nutrientes disponível. Para o microrganismo em questão, ele tolera bem a maioria dos pH, no entanto a sua maior produção de bioluminescência ocorre nos pH 9 e 6,5.

Tempo Gasto na Instalação do Protótipo: Entre o repique e produção das esferas para construção do protótipo foram registradas 32 horas. Para produção de 2L de esferas foram necessárias 7 horas. Para

instalação no local, 30 minutos.

Recursos Necessários para Instalação: Para instalação foi necessária mangueiras caneladas, esferas produzidas, espátulas, pregos e martelo. Duas pessoas participaram na instalação.

Observações sobre a Facilidade de Manutenção: Não apresentou facilidade de limpeza para reaproveitamento das mangueiras, o que dificultaria um recarregamento, já que as esferas degradadas deverão ser removidas para adição de novas esferas, devendo ter componentes prontos montados para substituição ágil.

Estimativa de tempo entre manutenções: Com o protótipo atual, a cada 2 dias.

Uniformidade da Sinalização: Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve uniformidade da sinalização.

Resistência à Corrosão (ISO 9227): O sistema não apresenta componentes metálicos e conexões elétricas, não aplicando-se testes de névoa salina. Mangueiras - Quando de materiais poliméricos (PVC, borracha, etc.), a maioria apresenta boa resistência à corrosão da névoa salina. No entanto, é importante verificar se há degradação superficial, perda de flexibilidade ou alterações na estrutura da canaleta que possam comprometer a retenção das esferas. Esferas de Alginato e Microrganismos - Este é o ponto mais crítico. O alginato de sódio é um polímero biodegradável. Em um ambiente salino, é provável que ocorra uma degradação acelerada das esferas. Essa degradação liberaria os microrganismos, que, por sua vez, seriam diretamente expostos ao ambiente hostil da névoa salina. A viabilidade e a atividade bioluminescente das bactérias seriam severamente comprometidas, resultando na perda da funcionalidade de iluminação do sistema. Seriam necessárias formulações de alginato mais robustas ou encapsulamento adicional para mitigar essa questão.

Resistência à Vibração (ANSI C136.31): O protótipo foi transportado em veículo automotivo (0,1 a 0,3g) sem danos aparente, no entanto não foi exposto a testes de vibração ANSI C136.31. As mangueiras, por serem flexíveis, teriam uma boa capacidade de absorver e dissipar as vibrações. O principal ponto de atenção seria a integridade da fixação das mangueiras ao leito da estrada e a retenção das esferas dentro das canaletas sob vibração contínua. Pequenas esferas soltas poderiam indicar um problema. As esferas,

sendo pequenas e contidas nas canaletas, estariam sujeitas a impactos e atrito contínuos devido à vibração. Isso poderia levar à fratura ou abrasão das esferas, liberando os microrganismos. Embora as bactérias em si sejam resilientes microscopicamente, a integridade de seu revestimento (a esfera) é vital para sua retenção e funcionalidade no sistema. A capacidade de manter a bioluminescência sob estresse vibracional constante também precisaria ser avaliada, pois o estresse mecânico pode afetar a saúde celular.

Proteção de Entrada (Classificação IP, IEC 60529): O protótipo não foi avaliado segundo a IEC 60529. No entanto, mangueiras de polímeros robustos (como poliuretano de alta densidade ou borrachas específicas) podem ter boa resistência ao impacto, absorvendo energia. No entanto, um impacto direto e forte (por exemplo, de um objeto caindo ou de um pneu passando sobre ela de forma agressiva) pode levar à deformação permanente, rachaduras ou até ruptura, comprometendo a estrutura que retém as esferas. As esferas de alginato são naturalmente frágeis ao impacto mecânico. Um impacto direto sobre a mangueira onde as esferas estão contidas provavelmente causaria a ruptura de muitas delas. Isso resultaria na liberação e morte dos microrganismos, e conseqüentemente, na perda da capacidade bioluminescente na área afetada. A capacidade de "autorreparo" ou preenchimento de áreas danificadas seria um fator crítico para a longevidade do sistema.

Degradação UV de Materiais: A radiação UV solar é um fator crítico para a longevidade de materiais expostos ao ambiente externo. Se as mangueiras forem feitas de polímeros comuns (como PVC ou borracha sem aditivos UV), elas seriam altamente suscetíveis à degradação UV. Isso se manifestaria em perda da pigmentação original, o que pode afetar a visibilidade diurna, o material se tornaria quebradiço e propenso a rachaduras, especialmente com o estresse mecânico do tráfego, bem como perda de propriedades mecânicas como diminuição da flexibilidade, resistência à tração e ao impacto, comprometendo a integridade estrutural e a capacidade de reter as esferas. Para mitigar isso, as mangueiras precisariam ser fabricadas com polímeros estabilizados contra UV ou revestimentos protetores. As esferas de alginato, por serem orgânicas, seriam diretamente afetadas pela radiação UV. A luz UV é conhecida por ser germicida e danificar o DNA. Portanto, mesmo que as esferas não se degradem visivelmente como um plástico, a radiação UV penetraria no alginato e inativaria ou mataria os microrganismos bioluminescentes, resultando na perda total da funcionalidade de iluminação ao longo do tempo. A proteção UV das esferas (por meio de opacificantes no alginato ou um design de mangueira que as sombreie) seria essencial.

Ciclo de Temperatura e Estresse Térmico (-20°C a +40°C): O protótipo não foi exposto a esta variação de temperatura. No entanto, a -20°C a mangueira pode se tornar rígida e quebradiça, aumentando o risco de rachaduras sob impacto ou vibração. A flexibilidade necessária para acomodar as esferas e o movimento da estrada pode ser comprometida. Já exposta a temperaturas superiores a 40°C, o material pode amolecer, perder rigidez e, em casos extremos, deformar-se. Isso poderia afetar a geometria da canaleta e a retenção das esferas. Em ciclos de temperatura, a expansão e contração repetidas (fadiga térmica) podem levar a rachaduras e falhas no material ao longo do tempo. A escolha de um polímero com ampla faixa de temperatura de operação e boa resistência à fadiga térmica é crucial. As esferas podem sofrer alterações estruturais devido à expansão/contração diferencial em relação à mangueira, ou mesmo pela formação de cristais de gelo em baixas temperaturas, o que poderia danificar a estrutura e liberar os microrganismos. A bactéria em questão foi avaliada quando exposta a um gradiente de temperatura. Em relação à biomassa a temperatura ótima é entre 10 e 30°C, já em relação à luminescência, entre 4 e 20°C.

Compatibilidade de Materiais: É fundamental garantir que o material da mangueira não contenha plastificantes ou outros aditivos que possam migrar e reagir com o alginato ou com o meio de cultura das bactérias, causando sua degradação ou inibição. O alginato e qualquer outro componente dentro da esfera (nutrientes para as bactérias) devem ser biocompatíveis e não tóxicos para os microrganismos, garantindo sua viabilidade e atividade bioluminescente a longo prazo. Deve-se evitar qualquer combinação de materiais que possa gerar subprodutos tóxicos, acelerar a degradação de um dos componentes ou comprometer a emissão de luz.

Integridade da Fiação e Conexões: No protótipo desenvolvido não há fiação ou conexões. Mas pelo fato de a formulação estar exposta nesse protótipo a água doce em excesso tem a capacidade de inativar a bioluminescência. O protótipo desenvolvido não possui fiação ou conexões, o que simplifica a análise de integridade elétrica. No entanto, a informação crítica é que a formulação (esferas com microrganismos) está exposta e a água doce em excesso tem a capacidade de inativar a bioluminescência. Em relação à projeção, em um ambiente rodoviário, a exposição à chuva é constante e o acúmulo de água nas canaletas das mangueiras é uma possibilidade real, especialmente em áreas de baixa drenagem ou após chuvas intensas. A inativação da bioluminescência por água doce em excesso sugere um problema de osmose ou diluição. As bactérias vivem em um ambiente osmótico específico dentro das esferas. A entrada de água doce em grande volume (hipotônica) pode fazer com que a água entre nas células bacterianas por osmose, causando seu inchaço e ruptura (lise celular), matando-as. A água doce pode diluir os nutrientes essenciais

para as bactérias ou os sinalizadores químicos que regulam a bioluminescência, comprometendo a reação. Isso significa que, após cada evento de chuva significativa ou em locais com drenagem deficiente, o sistema de demarcação perderia sua capacidade bioluminescente, tornando-se ineficaz como sinalização noturna. A recuperação da bioluminescência dependeria da capacidade das bactérias remanescentes de se recuperar e se reproduzir, o que levaria tempo e exigiria condições ideais, ou da substituição das esferas. Desta forma, a sensibilidade à água doce em excesso é uma vulnerabilidade crítica para a aplicação em ambiente rodoviário. Para que o sistema seja viável, seria absolutamente necessário desenvolver uma solução de encapsulamento ou um design de mangueira que proteja as esferas da intrusão de água doce, ou uma formulação de microrganismos que seja resistente a essas condições osmóticas. Sem isso, a funcionalidade do sistema seria intermitente e altamente dependente das condições climáticas. Por ser uma bactéria de origem marinha, o impacto da umidade/chuva pode levar à inativação da atividade. Por este motivo, foi avaliada a sensibilidade da bactéria a um gradiente de salinidade (0 a 12%), a fim de identificar o comportamento frente a uma possível diluição ou evaporação. Para a manutenção da viabilidade das células bacterianas, o teor de sal deve se manter idealmente entre 0 e 3%. Já para viabilidade da emissão de luminescência, o teor de sal deve manter-se entre 2 e 4%. A luminescência resistiu na ausência de sal, durante apenas 6h, devido à baixa biomassa registrada, permitindo uma maior concentração de oxigênio dissolvido disponível.

Intensidade Luminosa: As normas brasileiras, como as da ABNT NBR 5101 (para iluminação pública) e os manuais de sinalização de órgãos como o DNIT e DERs, estabelecem os requisitos.

1. Sinalização Ativa (Luminárias, Dispositivos Luminosos):

- Para a iluminação pública em rodovias, a ABNT NBR 5101:2012 (Iluminação Pública – Procedimento) estabelece valores mínimos de iluminância média (lux) e uniformidade para diferentes classes de vias. Por exemplo, vias coletoras de Classe A2 podem ter uma iluminância média de 20 lux. Trevos em vias rurais podem exigir níveis de iluminância 50% superiores aos da via principal.
- No caso do seu protótipo com bactérias bioluminescentes, ele seria uma fonte de luz ativa. Não há uma norma específica em lux para "bioluminescência como sinalização de demarcação", mas ele precisaria atingir uma luminância mínima percebida pelo motorista que o tornasse eficaz. Para painéis luminosos ou dispositivos auxiliares, as especificações geralmente focam na intensidade luminosa e na uniformidade.

2. Sinalização Passiva (Retrorefletiva - Películas e Tintas):

- A maior parte da sinalização rodoviária (placas, demarcações horizontais) utiliza materiais retrorrefletivos. Para esses materiais, as normas (como a do DER-SP mencionada em sua pesquisa) estabelecem coeficientes mínimos de retrorrefletividade em candelas por lux por metro quadrado ($\text{cd}\cdot\text{lx}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) para diferentes tipos de película (Tipo I, Tipo II, Tipo III), ângulos de observação e de entrada. Esses valores são críticos para garantir que a luz dos faróis dos veículos seja refletida de volta ao motorista de forma eficiente.

O sistema de mangueiras com bactérias bioluminescentes é único por gerar sua própria luz, ao invés de apenas refletir a luz externa. Isso significa que ele funcionaria mais como uma sinalização ativa. Para ser considerado eficiente em rodovias, ele precisaria - Atingir uma Luminância Mínima: A luz emitida pelas esferas bioluminescentes deve ser suficiente para ser claramente visível pelos motoristas a uma distância segura, tanto em noites sem iluminação externa quanto sob condições de baixa visibilidade (chuva leve, neblina). Essa "visibilidade" é avaliada em termos de luminância (cd/m^2). Não há um valor padrão específico para bioluminescência, mas precisaria comparar a luminância gerada com a de outros dispositivos de sinalização ativos (como LEDs de baixa intensidade ou luzes de balizamento). A distribuição da luz ao longo da mangueira deve ser uniforme, evitando pontos muito brilhantes e pontos "mortos" que possam confundir o motorista, mantendo a cor e contraste. A cor da luz emitida não é consistente com os padrões de sinalização viária (geralmente branco ou amarelo), mas possui contraste adequado com o pavimento.

Biodegradação/Impacto Ambiental no Local: Embora a proposta seja sustentável e não tenha apresentado degradação ambiental local durante o teste em campo, é importante observar se há algum resíduo ou impacto no solo e na flora local a longo prazo devido aos componentes dos protótipos.

Custo-Benefício (Estimativa Preliminar): A estimativa inicial do custo de material deste protótipo de iluminação sustentável, sem nenhum tipo de atualização, em 1 km de rodovia é de R\$ 18.077,00, discriminado na Tabela 31.

Tabela 31. Estimativa de custo de material para aumento de escala do protótipo para 1 Km de rodovia. Não estão incluídos os custos com transporte, instalação, batelada em biorreator, mão de obra ou sistema otimizado para produção de esferas.

Material	Quantidade e Unidade	Valor
Mangueira cristal ø2cm	2.000 m	R\$ 9.000,00
Placas de petri	1.000	R\$ 588,00
Peptona Bacteriológica	3,5 Kg	R\$ 2.380,00
Sais Marinhos	40 Kg	R\$ 1.600,00
Alginato de Sódio	24 Kg	R\$ 4.320,00
CaCl ₂	13,5 Kg	R\$ 189,00
TOTAL		R\$ 18.077,00

Análise do Fluxo de Resíduos: O protótipo apresentado gerou cerca de 5 Kg de resíduos biológicos sólidos e líquidos em 3 metros de estrada.

Tempo de Atividade e Inatividade do Sistema: Não é possível estimar nesse momento.

Percepção Visual por Pedestres

Número de Observadores: 2

Pedestres Observadores: Graziela Rigo, Rafael Castro

Distância Mínima de Detecção Visual: 0 m

Distância Máxima de Detecção Visual: 15 m

Clareza da Sinalização: A sinalização é nítida e os limites são bem definidos.

Ofuscamento: Os pedestres observadores não se sentiram ofuscados pela própria sinalização em ocorrência de faróis de veículos acionados.

Percepção de Cor e Forma:

Houve percepção de cor (azul esverdeado) e forma (linha) do sinalizador pelos pedestres observadores.

Feedback Subjetivo do Pedestre:

Rafael Castro - *A sinalização, no escuro, pôde ser identificada facilmente durante o percurso na via. O brilho é confortável à visão, facilitando o deslocamento no período noturno. Com 15 metros de proximidade, já é claramente identificável que a via está sinalizada.*

Graziela Rigo - *Ao observar o protótipo com bactérias bioluminescentes, notei que a luz gerada foi suficiente para tornar o trajeto visível, inclusive permitindo a visualização de elementos ao redor. A tonalidade da luz era suave, não causou ofuscamento e proporcionou uma experiência visual confortável.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a

perturbação.

Simulação de Detecção por Veículo

Motorista e Carona Observadores: Vanessa Agostini – Motorista, Rafael Castro – Carona

Distância Máxima de Detecção por Veículo: 15 m

Condição do Veículo: parado

Ofuscamento pelos Faróis do Veículo: Não é possível identificar a emissão de luz com o uso de faróis ou lanterna. A bioluminescência só é detectada em total escuridão.

Farol baixo – não houve ofuscamento – 10 m

Farol alto – não houve ofuscamento – 10 m

Lanterna – não houve ofuscamento – 10 m

Distância de Detecção de Objeto/Pedestre: A sinalização não permite a identificação de objetos ou pedestres próximos a uma distância de 10 m

Distância de Reconhecimento: 3 m

Feedback Subjetivo do Motorista e Carona:

Vanessa Agostini - *De dentro do carro, a sinalização é nítida de coloração esverdeada em com contraste com o pavimento. Não foi causado desconforto ou ofuscamento. É necessário o breu total para que a bioluminescência seja perceptível ao motorista.*

Rafael Castro - *De dentro do carro, a sinalização da faixa é eficiente em situações em que não há qualquer outro tipo de iluminação, sendo prontamente visualizada, sem qualquer desconforto ou ofuscamento. Na presença de outras luzes, a sinalização não se destaca.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Avaliação Qualitativa da Poluição Visual: 1

Registros realizados em campo: Figuras 26, 27, 28

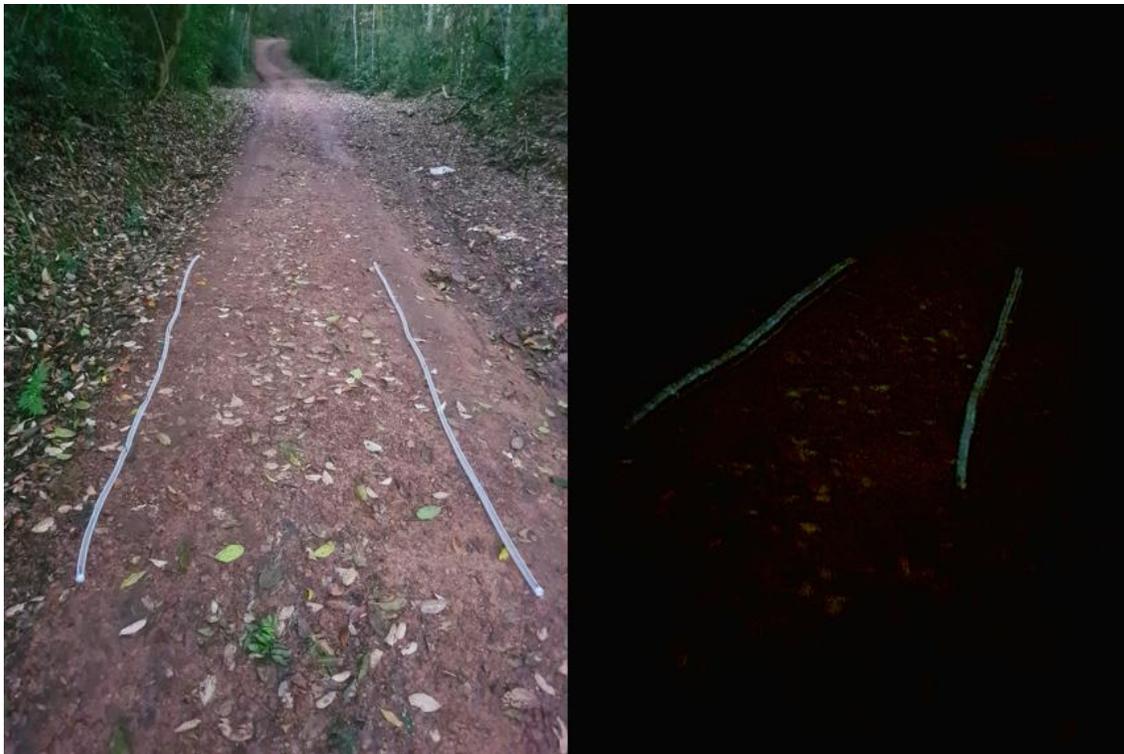


Figura 26. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL001r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno.

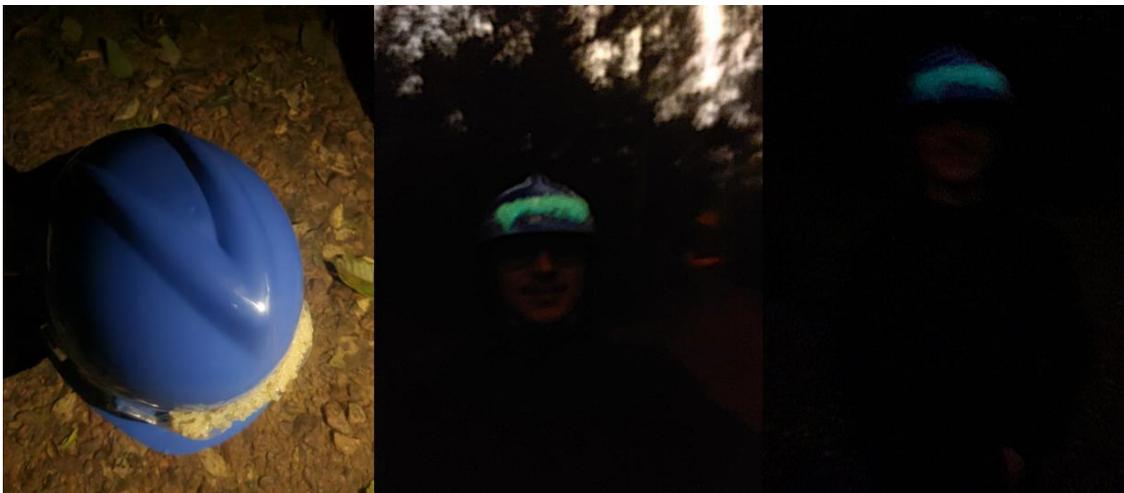


Figura 27. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL001e em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Foto do centro e da direita: protótipo em ambiente noturno.



Figura 28. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL001r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente noturno com lanterna de veículo acesa. Foto do centro: protótipo em ambiente noturno com farol baixo de veículo aceso. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno com farol alto de veículo aceso.

Apesar da fácil instalação do modelo testado, a sua manutenção parece dispendiosa (tanto para rodovia, quanto para o EPI), devido a necessidade de troca geral dos componentes e ao não reaproveitamento dos mesmos. Além disso, a produção de esferas se tornaria onerosa para uso em larga escala. Sugere-se o teste com mangueiras fechadas e com uma formulação líquida viscosa em constante circuito como alternativa, saindo e um local fixo de abastecimento (e.g., estação ou central de abastecimento).

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 02

Identificação do Protótipo: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

Estabilidade da Sinalização (Luminosidade/Intensidade ao Longo do Tempo): Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve estabilidade da luminosidade e intensidade. No entanto, como já é conhecida a degradação, com o tempo deverá haver perda da intensidade luminosa produzida.

Gradação da Intensidade Luminosa: A intensidade da luz varia ao longo do tempo, demonstrando degradação. No entanto, há um incremento na bioluminescência entre 1 e 6 dias, sendo inversamente proporcional à biomassa. A durabilidade da luminosidade está diretamente relacionada ao consumo de

nutrientes/substrato e a concentração de oxigênio dissolvido.

Consumo de Nutrientes/Substrato: O protótipo depende de substrato para a produção de luz. Este substrato é consumido com o tempo e também sofre variação de pH a partir do metabolismo dos microrganismos, o que pode levar a perda de bioluminescência, mesmo com a quantidade de nutrientes disponível. Para o microrganismo em questão, ele tolera bem a maioria dos pH, no entanto a sua maior produção de bioluminescência ocorre nos pH 9 e 6,5.

Tempo Gasto na Instalação do Protótipo: Entre o repique e produção em reator para construção do protótipo foram registradas 72 horas (7 L). No entanto, foi verificado que é possível diminuir esse tempo para 30h.

Recursos Necessários para Instalação: Para instalação foi necessárias mangueiras transparentes preenchidas com a formulação. Duas pessoas participaram na instalação.

Observações sobre a Facilidade de Manutenção: Apresentou facilidade de limpeza para reaproveitamento das mangueiras.

Estimativa de tempo entre manutenções: Em fluxo contínuo, não seriam necessárias manutenções frequentes, somente em caso de rompimento das mangueiras.

Uniformidade da Sinalização: Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve uniformidade da sinalização, desde que a formulação fosse oxigenada, por isso a necessidade de fluxo contínuo.

Resistência à Corrosão (ISO 9227): O sistema não apresenta componentes metálicos e conexões elétricas, não aplicando-se testes de névoa salina. Mangueiras - Quando de materiais poliméricos (PVC, borracha, etc.), a maioria apresenta boa resistência à corrosão da névoa salina. No entanto, é importante verificar se há degradação superficial, perda de flexibilidade ou alterações na estrutura da canaleta que possam comprometer o protótipo ao longo do tempo. Essa degradação liberaria os microrganismos, que, por sua vez, seriam diretamente expostos ao ambiente hostil da névoa salina. A viabilidade e a atividade bioluminescente das bactérias seriam severamente comprometidas, resultando na perda da funcionalidade de iluminação do sistema.

Resistência à Vibração (ANSI C136.31): O protótipo foi transportado em veículo automotivo (0,1 a 0,3g) sem danos aparentes, no entanto não foi exposto a testes de vibração ANSI C136.31. As mangueiras, por serem flexíveis, possuem uma boa capacidade de absorver e dissipar as vibrações. O principal ponto de atenção seria a integridade da fixação das mangueiras ao leito da estrada. A capacidade de manter a bioluminescência sob estresse vibracional é considerada positiva, visto que a vibração auxilia na dissipação do oxigênio, necessário para a ocorrência da reação que produz a bioluminescência.

Proteção de Entrada (Classificação IP, IEC 60529): O protótipo não foi não avaliado segundo a IEC 60529. No entanto, mangueiras de polímeros robustos (como poliuretano de alta densidade ou borrachas específicas) podem ter boa resistência ao impacto, absorvendo energia. No entanto, um impacto direto e forte (por exemplo, um acidente veicular) pode levar à deformação permanente, rachaduras ou até ruptura, comprometendo a estrutura que retém a formulação. Isso resultaria na liberação dos microrganismos, e conseqüentemente, na perda da capacidade bioluminescente. A capacidade de "autorreparo" ou preenchimento de áreas danificadas seria um fator crítico para a longevidade do sistema.

Degradação UV de Materiais: A radiação UV solar é um fator crítico para a longevidade de materiais expostos ao ambiente externo. Se as mangueiras forem feitas de polímeros comuns (como PVC ou borracha sem aditivos UV), elas seriam altamente suscetíveis à degradação UV. Isso se manifestaria em: Desbotamento da cor - perda da pigmentação original, o que pode afetar a visibilidade diurna, Fragilização - o material se tornaria quebradiço e propenso a rachaduras, especialmente com o estresse mecânico do tráfego, Perda de propriedades mecânicas - diminuição da flexibilidade, resistência à tração e ao impacto, comprometendo a integridade estrutural e a capacidade de reter a formulação. A luz UV é conhecida por ser germicida e danificar o DNA. Portanto, mesmo que a formulação não se degrade visivelmente como um plástico, a radiação UV penetraria no alginato e inativaria ou mataria os microrganismos bioluminescentes, resultando na perda total da funcionalidade de iluminação ao longo do tempo. Para mitigar isso, as mangueiras precisariam ser fabricadas com polímeros estabilizados contra UV ou revestimentos protetores.

Ciclo de Temperatura e Estresse Térmico (-20°C a +40°C): O protótipo não foi exposto a esta variação de temperatura. No entanto, a -20°C a mangueira pode se tornar rígida e quebradiça, aumentando o risco de rachaduras sob impacto ou vibração. A flexibilidade necessária para acomodar a formulação e o

movimento da estrada pode ser comprometida. Já exposta a temperaturas superiores a 40°C, o material pode amolecer, perder rigidez e, em casos extremos, deformar-se. Em ciclos de temperatura, a expansão e contração repetidas (fadiga térmica) podem levar a rachaduras e falhas no material ao longo do tempo. A escolha de um polímero com ampla faixa de temperatura de operação e boa resistência à fadiga térmica é crucial. A bactéria em questão foi avaliada quando exposta a um gradiente de temperatura. Em relação à biomassa, a temperatura ótima é entre 10 e 30°C, já em relação à luminescência entre 4 e 20°C.

Compatibilidade de Materiais: É fundamental garantir que o material da mangueira não contenha plastificantes ou outros aditivos que possam migrar e reagir com o alginato ou com o meio de cultura das bactérias, causando sua degradação ou inibição. Deve-se evitar qualquer combinação de materiais que possa gerar subprodutos tóxicos, acelerar a degradação de um dos componentes ou comprometer a emissão de luz.

Integridade da Fiação e Conexões: No protótipo desenvolvido não há fiação ou conexões. Mas pela formulação estar exposta nesse protótipo a água doce em excesso tem a capacidade de inativar a bioluminescência. O protótipo desenvolvido não possui fiação ou conexões, o que simplifica a análise de integridade elétrica. Em relação à projeção, em um ambiente rodoviário, a exposição à chuva é constante e o acúmulo de água no interior do protótipo não é uma possibilidade real, mesmo em áreas de baixa drenagem ou após chuvas intensas, pois o sistema é fechado. A inativação da bioluminescência por água doce em excesso só aconteceria através de um rompimento do sistema devido a um problema de osmose ou diluição. As bactérias vivem em um ambiente osmótico específico dentro da formulação. A entrada de água doce em grande volume (hipotônica) pode fazer com que a água entre nas células bacterianas por osmose, causando seu inchaço e ruptura (lise celular), matando-as. Desta forma, a sensibilidade à água doce é uma vulnerabilidade crítica para a aplicação desse protótipo em ambiente rodoviário. Por ser uma bactéria de origem marinha, o impacto da umidade/chuva pode ser a inativação da atividade em caso de acidente rodoviário com rompimento do sistema. Por este motivo, foi avaliada a sensibilidade da bactéria a um gradiente de salinidade (0 a 12%), a fim de identificar o comportamento frente a uma possível diluição ou evaporação. Para a manutenção da viabilidade das células bacterianas, o teor de sal deve se manter idealmente entre 0 e 3%. Já para viabilidade da emissão de luminescência, o teor de sal deve manter-se entre 2 e 4%. A luminescência resistiu na ausência de sal, durante apenas 6h, devido à baixa biomassa registrada, permitindo uma maior concentração de oxigênio dissolvido disponível.

Intensidade Luminosa: As normas brasileiras, como as da ABNT NBR 5101 (para iluminação pública) e os manuais de sinalização de órgãos como o DNIT e DERs, estabelecem os requisitos.

1. Sinalização Ativa (Luminárias, Dispositivos Luminosos):

- Para a iluminação pública em rodovias, a ABNT NBR 5101:2012 (Iluminação Pública – Procedimento) estabelece valores mínimos de iluminância média (lux) e uniformidade para diferentes classes de vias. Por exemplo, vias coletoras de Classe A2 podem ter uma iluminância média de 20 lux. Trevos em vias rurais podem exigir níveis de iluminância 50% superiores aos da via principal.
- No caso do seu protótipo com bactérias bioluminescentes, ele seria uma fonte de luz ativa. Não há uma norma específica em lux para "bioluminescência como sinalização de demarcação", mas ele precisaria atingir uma luminância mínima percebida pelo motorista que o tornasse eficaz. Para painéis luminosos ou dispositivos auxiliares, as especificações geralmente focam na intensidade luminosa e na uniformidade.

2. Sinalização Passiva (Retrorefletiva - Películas e Tintas):

- A maior parte da sinalização rodoviária (placas, demarcações horizontais) utiliza materiais retrorrefletivos. Para esses materiais, as normas (como a do DER-SP mencionada em sua pesquisa) estabelecem coeficientes mínimos de retrorrefletividade em candelas por lux por metro quadrado ($\text{cd} \cdot \text{lx}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) para diferentes tipos de película (Tipo I, Tipo II, Tipo III), ângulos de observação e de entrada. Esses valores são críticos para garantir que a luz dos faróis dos veículos seja refletida de volta ao motorista de forma eficiente.

O sistema de mangueiras com bactérias bioluminescentes é único por gerar sua própria luz, ao invés de apenas refletir a luz externa. Isso significa que ele funcionaria mais como uma sinalização ativa. Para ser considerado eficiente em rodovias, ele precisaria atingir uma luminância mínima. A luz emitida pela formulação bioluminescente deveria ser suficiente para ser claramente visível pelos motoristas a uma distância segura, tanto em noites sem iluminação externa quanto sob condições de baixa visibilidade (chuva leve, neblina). Essa "visibilidade" é avaliada em termos de luminância (cd/m^2). Não há um valor padrão específico para bioluminescência, mas precisaria comparar a luminância gerada com a de outros dispositivos de sinalização ativos (como LEDs de baixa intensidade ou luzes de balizamento). Além disso, a uniformidade é um parâmetro importante. A distribuição da luz ao longo da mangueira deve ser uniforme, evitando pontos muito brilhantes e pontos "mortos" que possam confundir o motorista, bem

como manter a cor e contraste. A cor da luz emitida deve ser consistente com os padrões de sinalização viária (geralmente branco ou amarelo e no caso do protótipo azul esverdeado), o que mudaria o padrão usado atualmente, mantendo um contraste adequado com o pavimento. Ainda, como discutido anteriormente, a capacidade de manter a bioluminescência ao longo do tempo, sob condições ambientais adversas (UV, temperatura, água doce), é fundamental para sua eficácia contínua.

Biodegradação/Impacto Ambiental no Local: Embora a proposta seja sustentável e não tenha apresentado degradação ambiental local durante o teste em campo, é importante observar se há algum resíduo ou impacto no solo e na flora local a longo prazo, em caso de rompimento do sistema.

Custo-Benefício (Estimativa Preliminar): A estimativa inicial do custo de instalação deste protótipo de iluminação sustentável, sem nenhuma atualização, em 1 km de rodovia é de R\$ 16.304,00, discriminado na Tabela 32.

Tabela 32. Estimativa de custo de material para aumento de escala do protótipo para 1 Km de rodovia. Não estão incluídos os custos com transporte, instalação, batelada em biorreator, central de bombeamento, circuito contínuo e mão de obra.

Material	Quantidade e Unidade	Valor	
Mangueira cristal \varnothing 2cm	2.000 m	R\$	9.000,00
Placas de petri	500	R\$	244,00
Peptona Bacteriológica	7,5 Kg	R\$	5.100,00
Sais Marinhos	40 Kg	R\$	1.600,00
Alginato de Sódio	2 Kg	R\$	360,00
TOTAL		R\$	16.304,00

Análise do Fluxo de Resíduos: O protótipo apresentado gerou cerca de 7 Kg de resíduos biológicos sólidos e líquidos. No entanto, o projeto prevê um sistema contínuo, com ciclagem dos resíduos.

Percepção Visual por Pedestres

Número de Observadores: 3

Pedestres Observadores: Bryan Tavares, Jéssica Scherer, Gabriel Stracke

Distância Mínima de Detecção Visual: 0 m

Distância Máxima de Detecção Visual: 25 m

Clareza da Sinalização: A sinalização é nítida e os limites são bem definidos.

Ofuscamento: Os pedestres observadores não se sentiram ofuscados pela própria sinalização em ocorrência de faróis de veículos acionados.

Percepção de Cor e Forma:

Houve percepção de cor (azul esverdeado) e forma (linha) do sinalizador pelos pedestres observadores.

Feedback Subjetivo do Pedestre:

Jéssica Scherer - *A sinalização bioluminescente proporcionou excelente visibilidade no escuro, demarcando o trajeto de forma eficaz, bem como, o EPI utilizado no protótipo. A tonalidade verde-azulada oferece um efeito visual confortável, sendo claramente perceptível a cerca de 15 metros de distância.*

Bryan Tavares - *A sinalização bioluminescente era imperceptível sob a luz natural do dia, mas, à medida que a claridade diminuía, tornava-se progressivamente mais evidente. No ambiente escuro, a via pôde ser identificada com facilidade graças às faixas bioluminescentes, que emitiam um brilho azul suave delineando com precisão seu contorno. Tanto as faixas quanto o capacete com sinalizações bioluminescentes permaneciam visíveis mesmo a distâncias superiores a 15 metros, um alcance em que, normalmente, o olho humano não distinguiria nada além da escuridão absoluta.*

Gabriel Oliveira - *Durante a noite, a sinalização tem um brilho agradável aos olhos, que permite a fácil identificação das marcações e ao mesmo tempo não ofusca a visão da estrada, evitando assim, possíveis acidentes de trânsito.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Simulação de Detecção por Veículo

Motorista e Carona Observadores: Vanessa Agostini – Motorista, Rafael Castro - Carona

Distância Máxima de Detecção por Veículo: 25 m

Condição do Veículo: parado

Ofuscamento pelos Faróis do Veículo: Não é possível identificar a emissão de luz com o uso de faróis ou lanterna. A bioluminescência só é detectada em total escuridão.

Farol baixo – não houve ofuscamento – 15 m

Farol alto – não houve ofuscamento – 15 m

Lanterna – não houve ofuscamento – 15 m

Distância de Detecção de Objeto/Pedestre: A sinalização não permite a identificação de objetos ou pedestres próximos a uma distância de 15 m

Distância de Reconhecimento: 5 m

Feedback Subjetivo do Motorista:

Vanessa Agostini - *De dentro do carro, a sinalização é nítida de coloração esverdeada com contraste com o pavimento. Não foi causado desconforto ou ofuscamento. É necessário o breu total para que a bioluminescência seja perceptível ao motorista.*

Rafael Castro - *De dentro do carro, a sinalização da faixa é eficiente em situações em que não há qualquer outro tipo de iluminação, sendo prontamente visualizada, sem qualquer desconforto ou ofuscamento. Na presença de outras luzes, a sinalização não se destaca.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Avaliação Qualitativa da Poluição Visual: 1

Registros realizados em campo: Figuras 29, 30, 31



Figura 29. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL002r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Fotos do centro e da direita: protótipo em ambiente noturno.



Figura 30. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL002e em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno.



Figura 31. Imagens do protótipo de bioeletroatividade PBOL002r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente noturno com lanterna de veículo acesa. Foto do centro: protótipo em ambiente noturno com farol baixo de veículo aceso. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno com farol alto de veículo aceso.

4. ETAPAS DA ABORDAGEM BIOELETRATIVIDADE

4.1. ETAPA 01: ativação, validação e seleção de tratamentos no contexto de bioeletroatividade

4.1.1. Ativação dos microrganismos potenciais pré-selecionadas dos ensaios de eletroatividade do BANCO REGENERA por meio de técnicas de microbiologia realizadas na Regenera Moléculas do Mar

Os 22 microrganismos selecionados na Fase I do projeto (Tabela 33) por apresentar potencial de produção de bioeletroatividade foram ativados em meio sólido específico.

Tabela 33. Lista de microrganismos com potencial de bioeletroatividade selecionados na Fase I do projeto.

Código	Espécie
0077	<i>Brevibacterium casei</i>
0091	<i>Bacillus piscis</i>
0270	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>
0299	<i>Staphylococcus warneri</i>
0332	<i>Bacillus pumilus</i>
0445	<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i>

0479	<i>Bacillus aerophilus</i>
0532	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>
0632	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>
0797	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>
0835	<i>Bacillus aerophilus</i>
0848	<i>Shewanella</i> sp.
0858	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
0864	<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i>
0866	<i>Bacillus stratosphericus</i>
0873	<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i>
1087	<i>Bacillus stratosphericus</i>
1171	<i>Bacillus siamensis</i>
1177	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
1272	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>
1276	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>
1278	<i>Pseudoalteromonas donghaensis</i>

4.1.2. Avaliação da viabilidade dos microrganismos e reposição do estoque para ampliação da longevidade das linhagens

Após incubação de 72h a 28°C, o fenótipo dos microrganismos foi confirmado macroscopicamente e microscopicamente (análise de Gram). Novos estoques foram feitos, garantindo a viabilidade das próximas etapas do projeto.

Inicialmente foi realizado o aprimoramento das células eletroquímicas para os testes de bioeletroatividade das células microbianas. O conceito das novas células eletroquímicas foi baseado nos dispositivos utilizados anteriormente (Figura 32), mais especificamente, um dispositivo single chamber (Figura 32A) foi transformado em um dispositivo Dual Chamber (Figura 32B) ou em um dispositivo Single Chamber com membrana. Os protótipos desses dispositivos estão respectivamente apresentados na Figura 33 e na Figura 34.

Em resumo, o protótipo Dual Chamber é composto por partes estruturais de acrílico com diferentes funções: tampas para fechamento da célula, suporte para membrana separadora e 2 câmaras com abertura superior para preenchimento dos eletrólitos. No modelo Single Chamber o suporte para membrana

separadora e a câmara para eletrólito são mesclados em uma única peça. Além disso o protótipo conta com dois eletrodos de carbono que tem a função de cátodo e ânodo. Esses eletrodos possuem ponteira que serve como contato elétrico para o circuito externo. A membrana separadora é composta agar preparado em solução aquosa de NaCl. O sistema conta com anéis de vedação o-ring entre as diferentes peças do dispositivo. A célula é fechada com o auxílio de 4 parafusos.

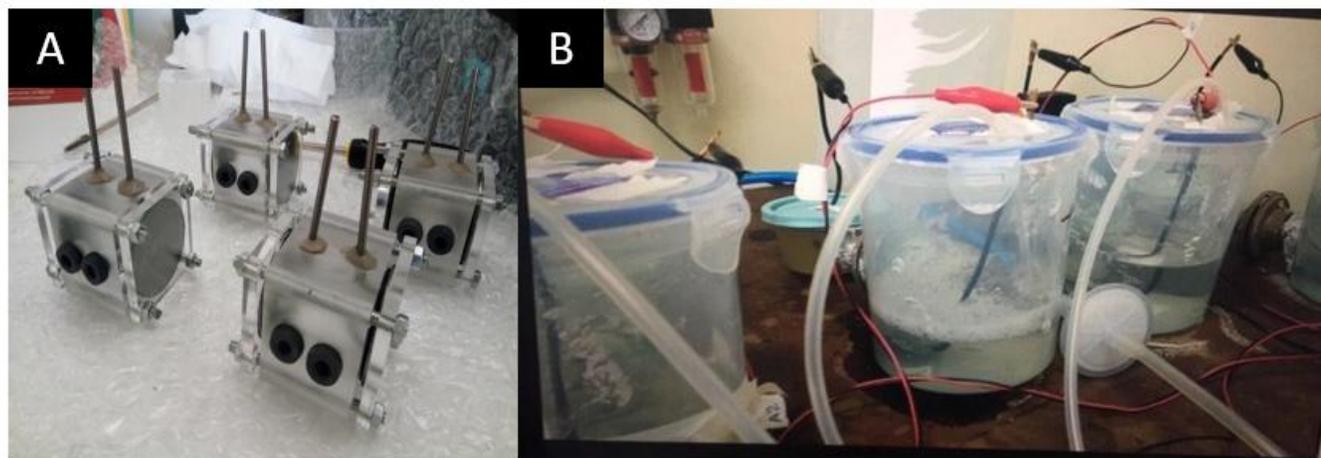


Figura 32. Primeiras versões do protótipo de captação de energia produzida por microrganismos: A: Single chamber, B: dual chamber.

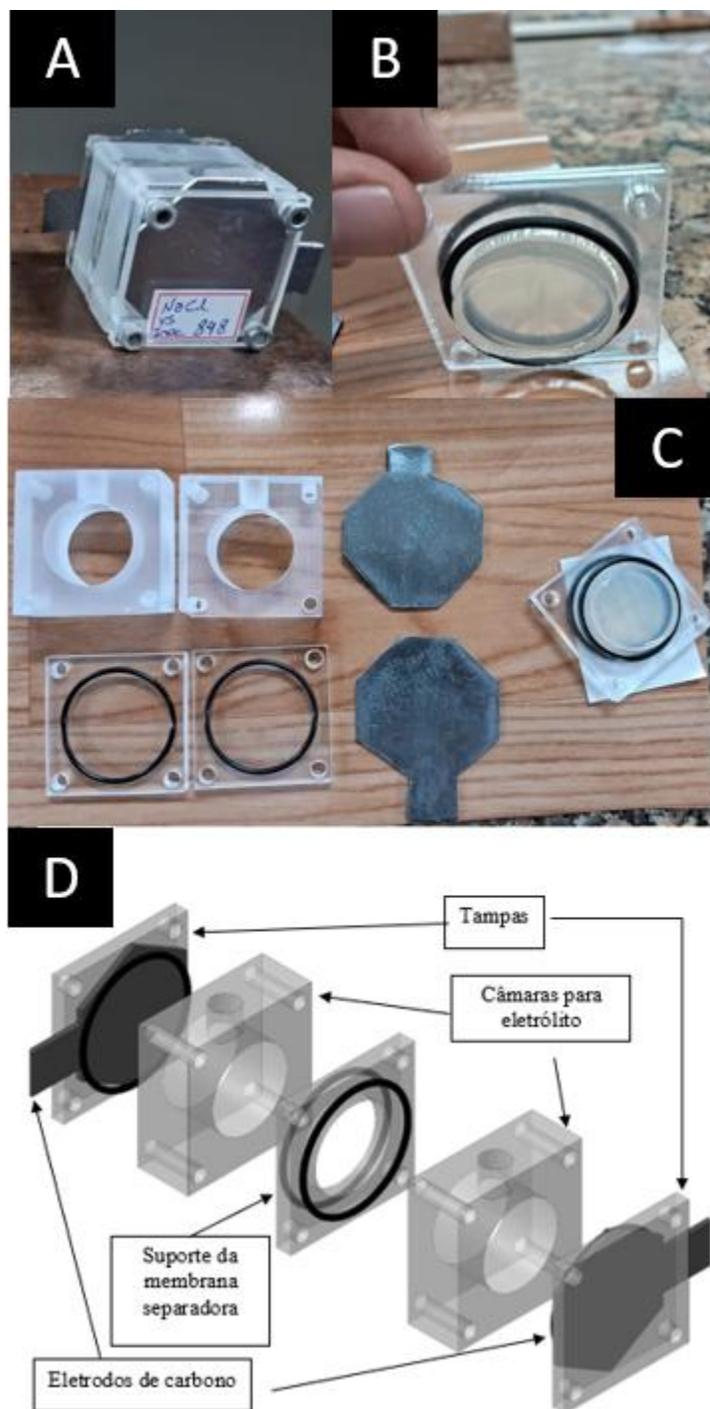


Figura 33. Dispositivo Dual Chamber para captação de energia produzida por microrganismos. A: dispositivo montado; B: detalhe da membrana separadora; C: partes do dispositivo; D: projeto do protótipo.

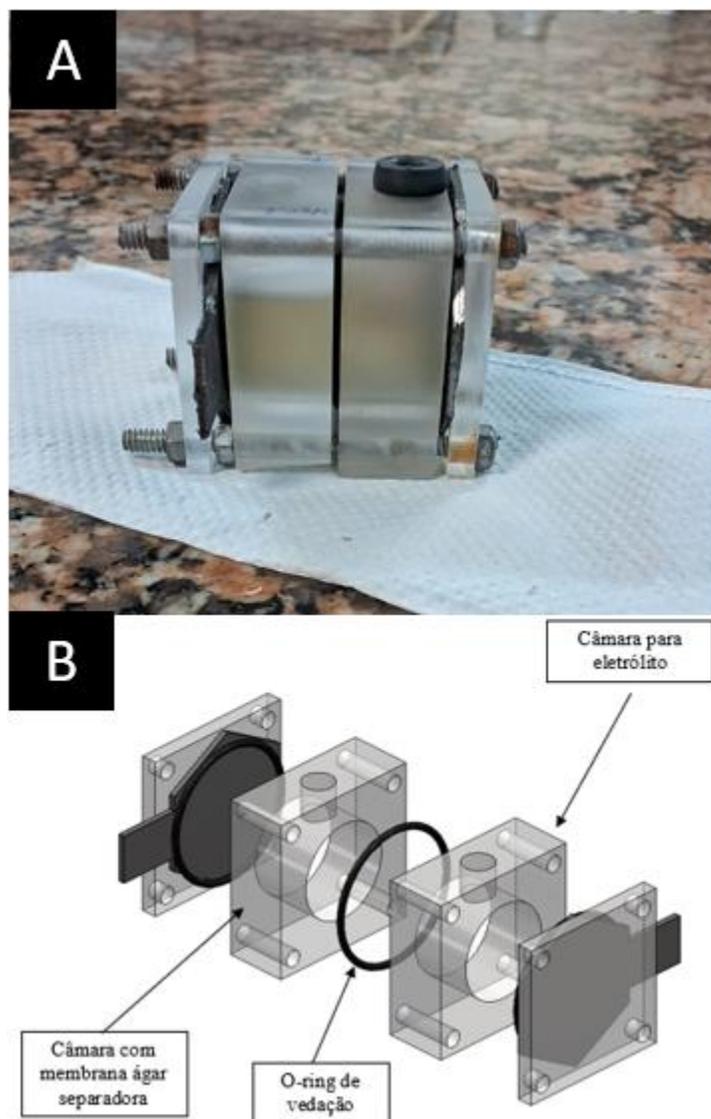


Figura 34. Dispositivo Single Chamber para captação de energia produzida por microrganismos. A: dispositivo montado; B: projeto do protótipo.

Preparo dos eletrodos

Inicialmente os eletrodos foram cortados nas dimensões apropriadas conforme o projeto apresentado na Figura 33. Em seguida foram lixados com lixa com granulometria 220. Por fim os eletrodos foram lavados em banho ultrassônico durante 15 minutos em detergente neutro e em seguida em álcool. Por fim, foram deixados secando em estufa à 40° C.

Preparo dos eletrólitos

NaCl: A solução de NaCl 3.56% em peso foi preparada de acordo com a norma ASTM: G61. Para tal, 3.4 gramas de NaCl da marca Synth foram dissolvidos em 92 mL de água ultrapura Milli-Q.

Descrver MD: Meio marinho artificial (BD Marine Both)

Descrver INOC 848: Inóculo da bactéria 848 em meio MD

Preparo da membrana

No preparo de membrana 2 gramas de ágar foram diluídos em 100 mL de solução aquosa de NaCl 3,56% em peso. Em seguida essa solução foi aquecida e mantida sob agitação até atingir homogeneidade. Por fim, a solução ainda líquida foi colocada no suporte da membrana separadora, deixando secar até apresentar estabilidade mecânica.

Atualização do Datalogger

O Datalogger (Figura 35) tem como finalidade o monitoramento da potência de MFCs (Microbial Fuel Cells – Células Combustíveis Microbianas - CCM). Este instrumento realiza medidas de tensão, intervaladas por 30 minutos, em resistências conhecidas e registra os dados em um cartão SD e na plataforma online ThingSpeak. Para registro na plataforma ThingSpeak, é necessário conexão com a internet. Todavia, caso não for possível, o datalogger realizará as medidas normalmente, tendo o cartão SD como backup.



Figura 35. Datalogger para aquisição de dados das CCMs (Células Combustíveis Microbianas).

Na atualização do hardware, durante testes com uma tensão constante, percebeu-se que o

datalogger estava com um alto ruído nas medidas. Após o teste de algumas hipóteses, chegou-se na conclusão de que um filtro nos módulos de entrada, composto por dois resistores e um capacitor, colocado antes do sinal chegar ao ADC, estava prejudicando a medida, resultado em um ruído maior. Para solucionar esse problema, em cada módulo de entrada, foram soldados jumpers entre a trilha antes dos resistores R1 e R2, até o capacitor C5, efetivamente pulando esses resistores no circuito (Figura 36). O mesmo foi feito para os resistores R3 e R4 para o capacitor C6. Com isso, as medidas atingiram uma estabilidade muito maior.



Figura 36. Jumpers evitando o filtro no Módulo de Entrada.

Teste de Produção de Energia com os microrganismos

Os ensaios eletroquímicos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (<https://www.ufrgs.br/lapec/>).

A leitura da diferença de potencial (ddP) entre os eletrodos foi feita em um potenciostato potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N (Metrohm) com aquisição dos dados pelo software Nova 2.1.6 (Metrohm). O monitoramento foi realizado ao longo de pelo menos 4 dias, sendo que cada leitura diária da ddP foi feita em um tempo de pelo menos 10 minutos.

A primeira rodada de testes consistiu na validação da célula eletroquímica proposta, ou seja, foi verificado se de fato a leitura indicada no equipamento era resultante da influência das Biomoléculas. Para tal, a variável objeto de análise foi o eletrólito. Nessa primeira configuração de célula eletroquímica, é

onde as bactérias estavam presentes. Três sistemas foram testados:

- Sistema 1: NaCl nos dois compartimentos de eletrólito:
- Sistema 2: NaCl no compartimento do eletrodo de referência e MD no compartimento do eletrodo de trabalho.
- Sistema 3: NaCl no compartimento do eletrodo de referência e INOC 848 no compartimento do eletrodo de trabalho.

A Figura 37 apresenta os resultados do monitoramento da diferença de potencial (ddP) dos três sistemas testados. No sistema com a presença das biomoléculas (NaCl vs INOC 848) é possível verificar que há um aumento gradual na diferença de potencial entre os eletrodos ao longo dos dias, chegando a um valor máximo registrado de ddp de -121 mV no terceiro dia. O mesmo não ocorre para os outros dois sistemas, os quais tem valor de ddp que varia no máximo em torno de ± 10 mV. A influência de variáveis como diferença entre os eletrodos (Sistema NaCl vs NaCl) e influência do meio de cultivo (Sistema NaCl vs MD) puderam ser descartadas. Dessa forma, os resultados indicam a validação da célula eletroquímica proposta, uma vez que a variável que originou a ddP com valor relevante foi o sistema com a presença das Biomoléculas.

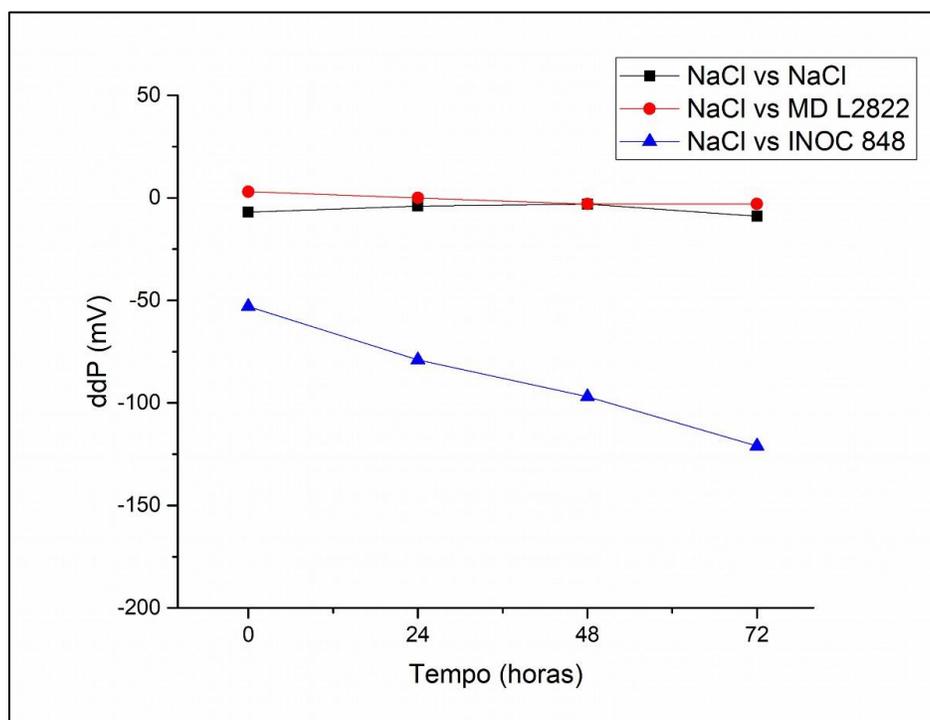


Figura 37. Resultados do monitoramento da diferença de potencial (ddP) dos três sistemas testados – Dual Chamber.

A segunda rodada de testes consistiu na avaliação de uma segunda configuração referente ao método de distribuição das biomoléculas. Ao contrário do sistema anterior, onde as biomoléculas estavam dispersas no meio de cultivo MD, nesse sistema as bactérias foram colocadas diretamente sobre o eletrodo de trabalho, e a câmara de eletrólito foi preenchida com MD. Esses ensaios foram realizados em duplicata.

Para a aplicação das biomoléculas no eletrodo, o microrganismo 848 foi repicado em meio MD sólido e incubado por 24h a 28°C. Posteriormente, foi feita a raspagem das colônias e um esfregaço direto no eletrodo.

A partir dos resultados da Figura 38 é possível constatar que da mesma forma que o sistema anterior, a presença das biomoléculas causou uma diferença de potencial considerável, entretanto o aumento observado nesse sistema foi bem mais pronunciado, chegando a um valor máximo de ddP de -164 mV em apenas 24 horas para a amostra B, e de -146 mV em 48 horas para a amostra C. A partir de 72 horas, as duas amostras apresentam valores bem semelhantes de diferença de potencial, demonstrando uma boa reprodutibilidade entre os sistemas. Cabe destacar que esses valores encontrados em 72 horas (-131 mV para amostra B e -125 mV para amostra C) são bem semelhantes aos encontrados para a amostra que utilizou as biomoléculas em solução (-121 mV). A partir desse ponto, as amostras apresentam uma tendência de queda nos valores de ddP.

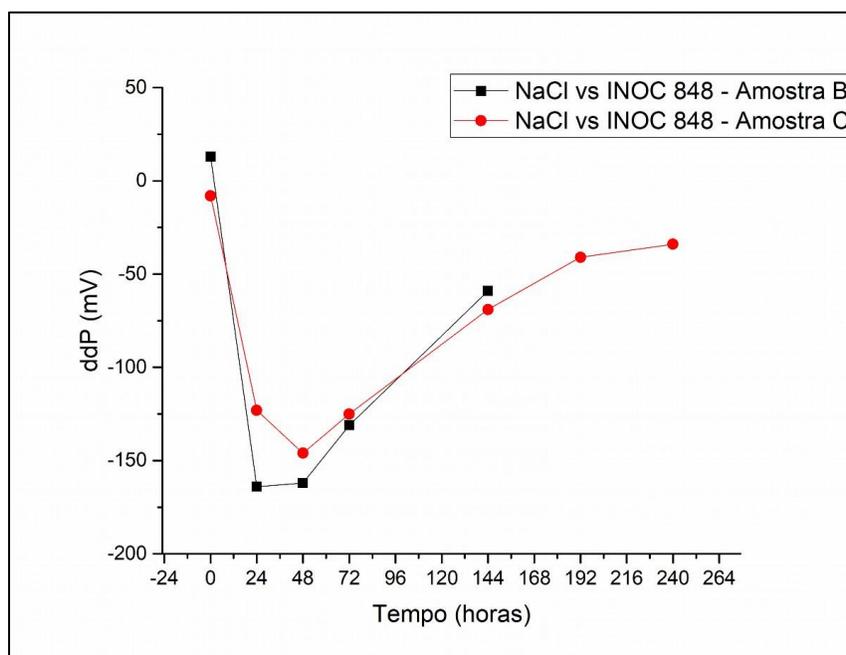


Figura 38. Resultados do monitoramento da diferença de potencial (ddP) para a configuração em que as bactérias foram colocadas diretamente sobre o eletrodo de trabalho.

Por fim cabe mencionar que aparentemente o lado preenchido com NaCl foi sendo contaminado ao longo dos dias. Ainda não foi possível constatar o que causou essa contaminação, se foi a migração das bactérias, apenas o meio de cultivo ou até mesmo a degradação da membrana separadora. A Figura 39 apresenta fotografias de uma membrana separadora aberta após os ensaios de longa duração. Na imagem da Figura 39A está apresentado o lado que ficou exposto para solução NaCl, onde não foi possível verificar nenhuma contaminação. Já na imagem da Figura 39B está apresentado o lado que ficou exposto para solução contendo as biomoléculas, pode-se observar partes esbranquiçadas na membrana. Cabe ressaltar que essas imagens são da configuração em que as bactérias foram colocadas diretamente sobre o eletrodo de trabalho.

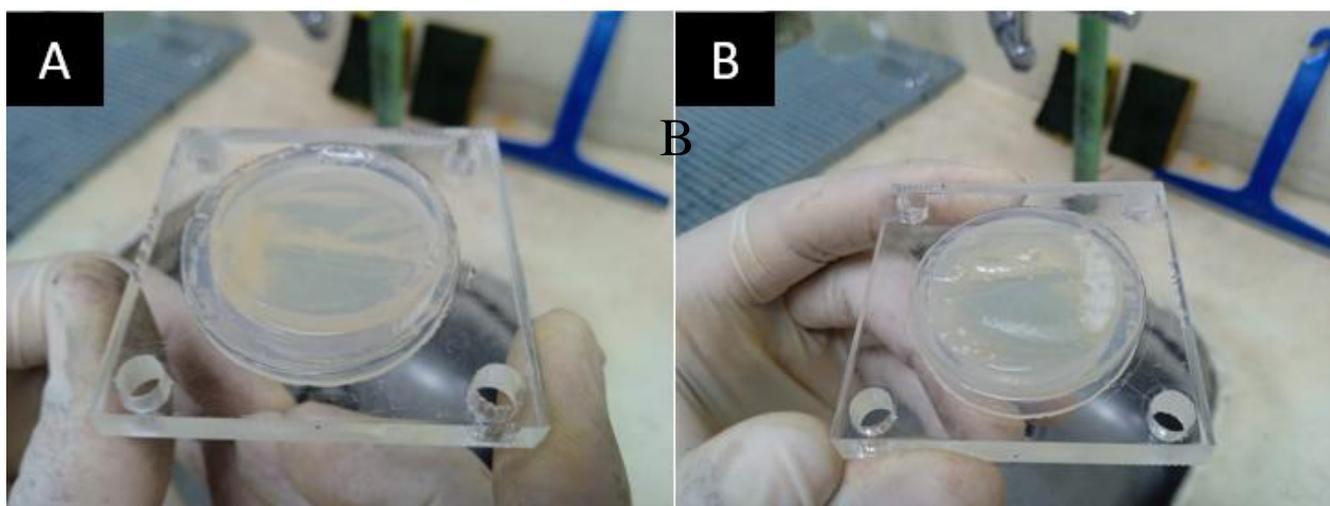


Figura 39. Membrana após testes de longa duração da célula com configuração em que as bactérias foram colocadas diretamente sobre o eletrodo de trabalho. A: lado que ficou exposto para solução NaCl; B: lado que ficou exposto para solução contendo as biomoléculas.

Levando em conta esses resultados, foi desenvolvido um sistema de Single Chamber, onde apenas uma das câmaras foi preenchida com eletrólito. A outra câmara foi preenchida com a membrana separadora de ágar. Três configurações foram testadas:

- Sistema 1: Membrana de ágar e INOC 848 no compartimento do eletrodo de trabalho.
- Sistema 2: Membrana de ágar e INOC 848 no compartimento do eletrodo de trabalho, com papel separador entre as câmaras.
- Sistema 3: Membrana de ágar e meio de cultivo MD no compartimento do eletrodo de trabalho.

A Figura 40 apresenta os resultados do monitoramento da diferença de potencial (ddP) dos três sistemas testados para o dispositivo Single Chamber. No sistema sem a presença das biomoléculas

(Sistema 3 - Membrana de ágar e meio de cultivo MD) é possível verificar que há um aumento na diferença de potencial entre os eletrodos, porém esse valor tende a cair rapidamente ao longo dos dias, chegando a um valor de ddp de -42 mV no sexto dia. No sistema com biomoléculas e com papel separador entre a Membrana de ágar e o INOC 848 a diferença de potencial entre os eletrodos tende a oscilar em um valor médio de aproximadamente -40 mV. Já no sistema Membrana de ágar e INOC 848 há um considerável aumento da diferença de potencial entre os eletrodos, chegando a um valor máximo de aproximadamente -290 mV no sétimo dia. Apesar de haver um decaimento nos dias seguintes, os valores de estabilização da ddp alcançados por esse sistema (~ -150 mV) se mostram bem superiores aos valores do sistema Dual Chamber (~ -50 mV).

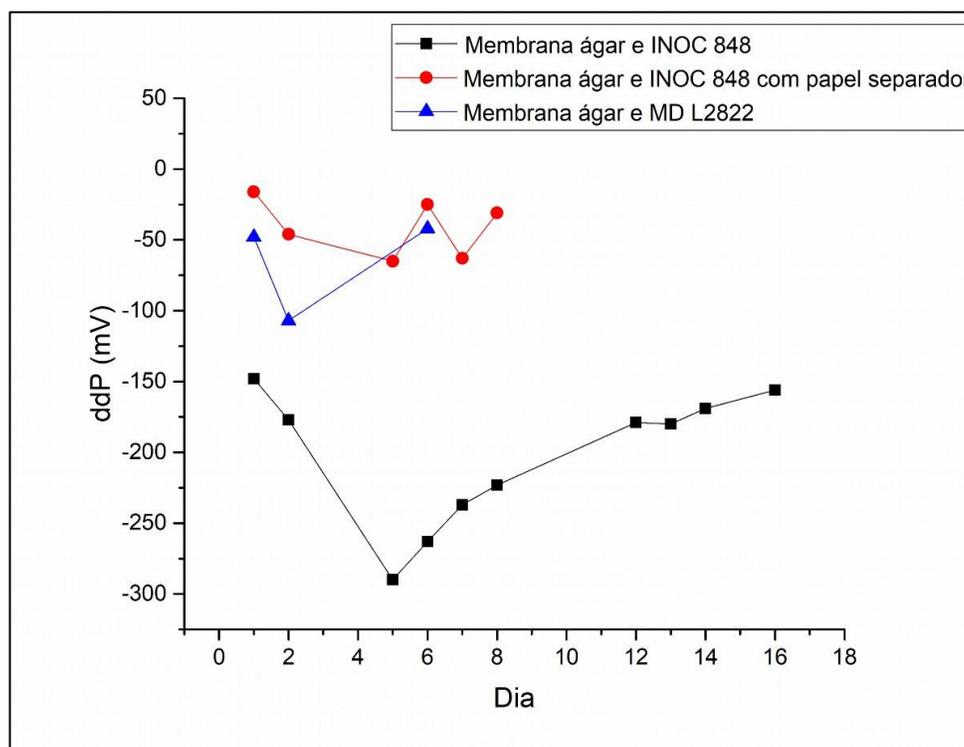


Figura 40. Resultados do monitoramento da diferença de potencial (ddP) dos três sistemas testados – Single Chamber.

4.2. ETAPA 02: investigação do genoma completo das cepas associadas a eletroatividade

4.2.1. Extração de DNA do(s) microrganismo(s) para a análise do genoma completo

Os princípios moleculares da bioeletroatividade bacteriana estão associados a uma maquinaria molecular sofisticada, onde um conjunto de genes, coordenadamente expressos, possibilita o carreamento extracelular de elétrons (Zavilgelsky & Shakulov, 2018; Chia et al., 2022; Seco et al., 2022). Esse carreamento de elétrons é associado aos processos de respiração celular, metabolismo energético e comunicação intracelular, os quais dependem de uma grande diversidade de proteínas como canais iônicos, transportadores transmembranares e enzimas de oxirredução (Vannier et al., 2020). A expressão dos genes *mtr* são centrais nesse processo, pois codificam proteínas redutoras de metal, como citocromos c multi-heme e transportadores de membrana externa, que atuam nas transferências de elétrons das quinonas no interior da célula para os minerais extracelulares, conectando o metabolismo respiratório ao ambiente externo (Brodli et al., 2018; Lawan et al., 2022). Além da importância biológica para as bactérias, ao serem capazes de explorar fontes alternativas de energia, esse processo de carreamento extracelular de elétrons pode ser aproveitado na biotecnologia para desenvolvimento de sistemas de produção de bioenergia.

A linhagem bacteriana identificada como REG000848 do Banco Regenera foi selecionada para avaliação genômica do seu potencial de bioeletroatividade. O DNA da linhagem selecionada foi extraído conforme protocolo padronizado, e enviado para sequenciamento na plataforma Illumina.

4.2.2. Envio para sequenciamento do genoma

As leituras nucleotídicas provenientes do sequenciamento foram utilizadas para a montagem do genoma, os quais suportaram a anotação funcional e classificação taxonômica. O genoma da linhagem bacteriana foi anotado funcionalmente para a identificação de genes por meio da ferramenta Prokka e para a identificação de domínios funcionais por meio da ferramenta InterproScan. A linhagem REG000848 apresentou comprimento próximo a 5 milhões de pares de base, cerca de 4045 genes e, em média, 1 gene a cada 1174 pares de base (Tabela 41). Os resultados da anotação funcional serviram como base para a análises estruturais e funcionais dos genes relacionados à bioluminescência.

Tabela 41. Comparação quantitativa de genes anotados nos genomas das linhagens bacterianas.

ID Linhagem	Genes				Quantidade total de genes	Concentração gênica
	CDSs	rRNA	tRNA	tmRNA		
REG_000848	4011	2	31	1	4045	1174

4.2.3. Montagem do genoma

Os genomas das linhagens bacterianas foram analisados para classificação taxonômica por meio da ferramenta *Type Strain Genome Server* (TYGS) e conforme padrão presente em *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature* (LPSN). A linhagem REG000848 foi predita como potencialmente pertencente a uma nova espécie bacteriana estreitamente relacionada à espécie *Shewanella pealeana*. Os dados referentes a esse novo registro serão publicados em um artigo científico.

O genoma da linhagem REG000848 foi analisado comparativamente ao genoma de referência de *Shewanella pealeana* ATCC 700345 para avaliação da composição de genes *mtr* relacionados à bioeletroatividade, com base na anotação funcional e na classificação taxonômica. A análise foi centrada na identificação dos genes *mtrA*, *mtrB*, *mtrC* e *omcA*. Assim, a recuperação dos genes *mtr* foi realizada por meio da identificação dos genes e/ou por domínios funcionais anotados.

4.2.4. Análise de genes de interesse

Como resultado, foram identificados domínios funcionais relacionados aos genes *mtr* em sequência de 11 genes codificadores de proteínas hipotéticas. A composição dos genes *mtr* entre os genomas comparados foi idêntica, e as anotações foram semelhantes às do genoma de referência. Entretanto, a identidade média das sequências ficou em torno de 70%, o que pode ser explicado por diferenças intrínsecas entre as espécies. Além disso, devido ao fato de *mtrC* e *omcA* serem genes parálogos, com domínios funcionais compartilhados (denominados *mtrC/omcA*), não foi possível discriminar com precisão entre esses dois genes. Contudo, é possível afirmar que os genes *mtrA*, *mtrB*, *mtrC* e *omcA* estão presentes no genoma da linhagem REG000848 (Figura 42). No geral, a presença completa da via *mtr* sugere que a linhagem possui os genes necessários para funcionamento do mecanismo de carreamento extracelular de elétrons.

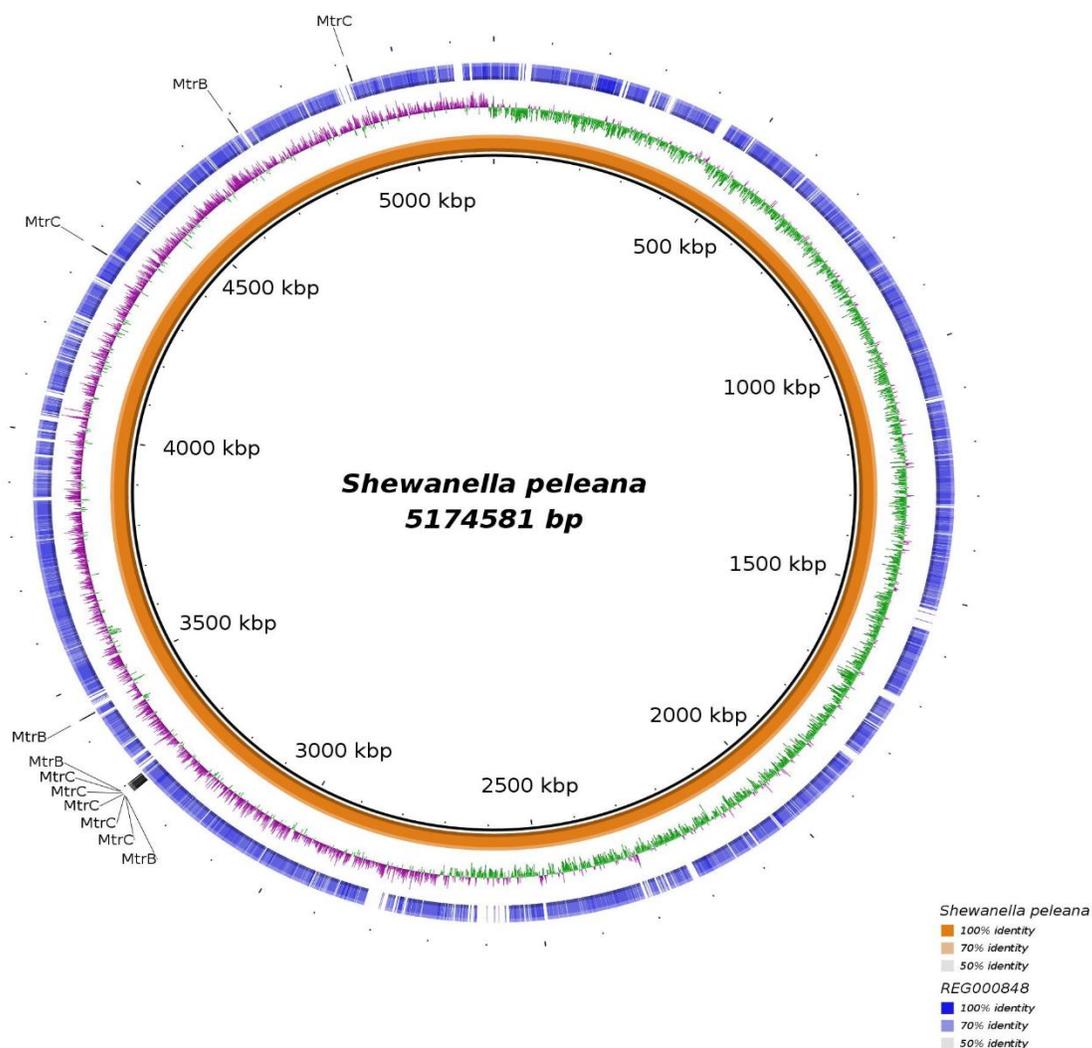


Figura 42. Identificação dos genes da via Mtr nos genomas de REG000848 e *Shewanella pealeana* ATCC 700345. Representação da localização cromossômica e similaridade de sequência dos genes Mtr no cromossomo de REG000848 (azul) e em relação ao cromossomo do genoma de referência de *Shewanella pealeana* ATCC 700345 (laranja).

4.2.5. Otimização

Inicialmente foi realizado o projeto para simplificação da célula eletroquímica levando em consideração três objetivos principais: diminuição dos dispositivos de fixação, suporte da membrana mais estável e facilidade de acesso aos componentes construtivos da célula eletroquímica microbiana. Esses objetivos foram alcançados com o uso de componentes hidráulicos convencionais como nipel roscável, cap roscável e anéis de vedação, montados conforme mostra a Figura 43 e a Figura 44.



Figura 43. Componentes da Célula eletroquímica CCM (protótipo).



Figura 44. Célula eletroquímica CCM (protótipo) montada.

Com o intuito de verificar o comportamento dos inóculos na nova célula eletroquímica proposta, foi realizado o screening de 22 microrganismos do BANCO REGENERA. A Tabela 33 abaixo apresenta os resultados de ddP dos sistemas avaliados no dia seguinte à montagem e após 05 dias da montagem. Na Tabela 33 é possível constatar que após cinco dias os sistemas contendo os inóculos 858, 866, 848, 479, 835, 1171 e 1278 apresentaram os valores de diferença de potencial mais elevados, avaliado por multímetro (BOM-6007-BOMVINK), sendo os sistemas 866 e 848 selecionados para testes adicionais (Figura 45). Além disso, os sistemas de controle preenchidos apenas com MD tiveram resultados relativamente baixos de ddP, o que pode ser um indicativo de validação do protótipo.

Tabela 33. Diferença de potencial ddp (mV) e densidade óptica (OD) microbiana dos sistemas avaliados.

Sistema (Inóculo)	ddp dia 1	ddp dia 5	OD (600nm)	
			inicial	final
MD 1 controle	-25	-34	0,048	0,074
MD 2 controle	-48	-60	0,049	0,063
77	-24	-38	0,13	0,087
91	-40	-52	0,091	0,08
270	-30	-55	0,07	0,176
332	-40	-65	0,111	0,103
445	-47	-53	0,064	0,116
532	-15	-53	0,068	0,147
632	-23	-45	0,086	0,217
848	-170	-150	0,123	0,137
858	-103	-98	0,086	0,25
864	-20	-72	0,067	0,124
866	-110	-132	0,084	0,222
299	-44	-56	0,127	0,115
479	-39	-145	0,132	0,118
797	-35	-65	0,124	0,098
835	-32	-138	0,103	0,185
873	-32	-83	0,119	0,154
1087	-39	-87	0,092	0,102
1171	-15	-121	0,131	0,161
1177	-52	-61	0,108	0,07
1272	-36	-62	0,077	0,062
1276	-37	-95	0,092	0,063
1278	-44	-130	0,154	0,16

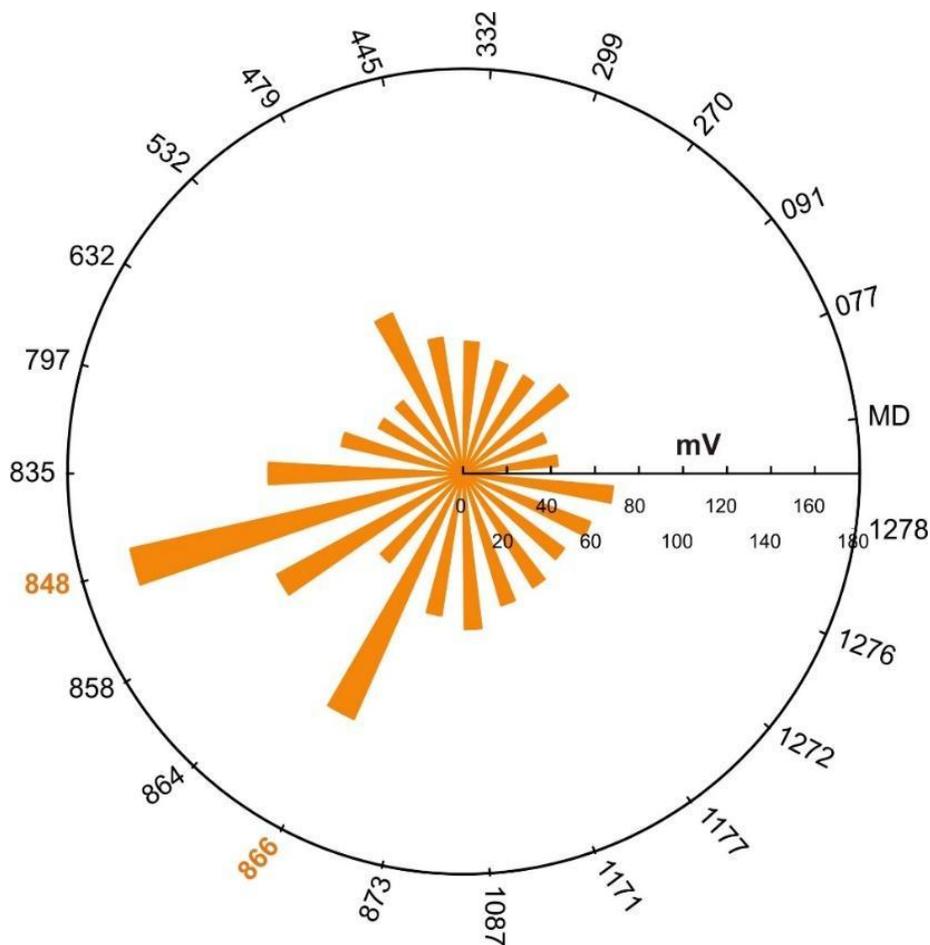


Figura 45. Diferença de potencial ddP (mV) dos sistemas avaliados com diferentes microrganismos.

Uma nova rodada de testes foi realizada nos sistemas contendo os inóculos: 848 e 866, apresentados na Tabela 34. Foi observado uma certa discrepância nos valores dos sistemas contendo apenas o controle MD, porém o valor médio dos sistemas contendo MD (-103 mV) foi inferior ao dos sistemas contendo o inóculo 848 (-147 mV), correspondente a espécie *Shewanella* sp.. Porém o mesmo comportamento não foi observado nos sistemas contendo o inóculo 866 (-68 mV), correspondente a espécie *Bacillus stratosphericus*. Ainda a partir da Tabela 34 é possível que tanto em valores absolutos quanto em valores médios, os sistemas com inóculo 848 apresentaram valores mais elevados de ddP quando comparados com os sistemas contendo o inóculo 866.

Tabela 34. Diferença de potencial ddP (mV) dos sistemas avaliados. 848 = *Shewanella* sp., 866 = *Bacillus stratosphericus*.

Sistema (Inóculo)	ddp dia 1	ddp dia 5	ddp médio dia 5
MD 1 controle	-180	-139	
MD 2 controle	-166	-117	-103
MD 3 controle	-51	-53	
848 – 1	-153	-128	
848 – 2	-185	-148	-147
848 – 3	-194	-166	
MD 4 controle	-30	-85	
MD 5 controle	-15	-41	-71
MD 6 controle	-22	-87	
866-1	-16	-59	
866-2	-32	-95	-68
866-3	-10	-50	

Com o intuito de otimizar os sistemas e verificar a influência da espessura da membrana de ágar, definidos de acordo com o volume utilizado, em duas configurações: 10 mL e 5 mL de solução de ágar em NaCl. Portanto, novos testes foram conduzidos, e os resultados são apresentados na Tabela 35. A espessura dos sistemas está demonstrada na Figura 46. A partir dos resultados, ambos sistemas apresentaram um valor médio aceitável, e para os ensaios seguintes optou-se por utilizar os sistemas com menor espessura.

Tabela 35. Diferença de potencial ddP (mV) e densidade óptica (OD) microbiana dos sistemas avaliados.

Sistema (Inóculo)	ddp dia 1	ddp dia 10	ddp médio dia 10	OD (600nm) inicial	OD (600nm) final
MD 1	-26	-41		0,048	0,08
MD 2	-21	-66	-55,7	0,047	0,255
MD 3	-4	-60		0,048	0,095
MD 4	-18	-49		0,048	0,230
MD 5	-28	-86	-72	0,049	0,092
MD 6	-18	-81		0,047	0,210



Figura 46. Célula eletroquímica CCM (protótipo) montada.

Outro fator avaliado foi a contaminação das células, já que o processo de montagem ocorre em ambiente não estéril. A Figura 47 apresenta o plaqueamento do meio de cultivo em MD sólido ao final do ensaio e após incubação a 28°C por 24h, demonstrando a existência de contaminação, o mesmo observado na densidade óptica (Tabela 35). A contaminação não é um problema relevante desde que não afete o crescimento do microrganismo de interesse.

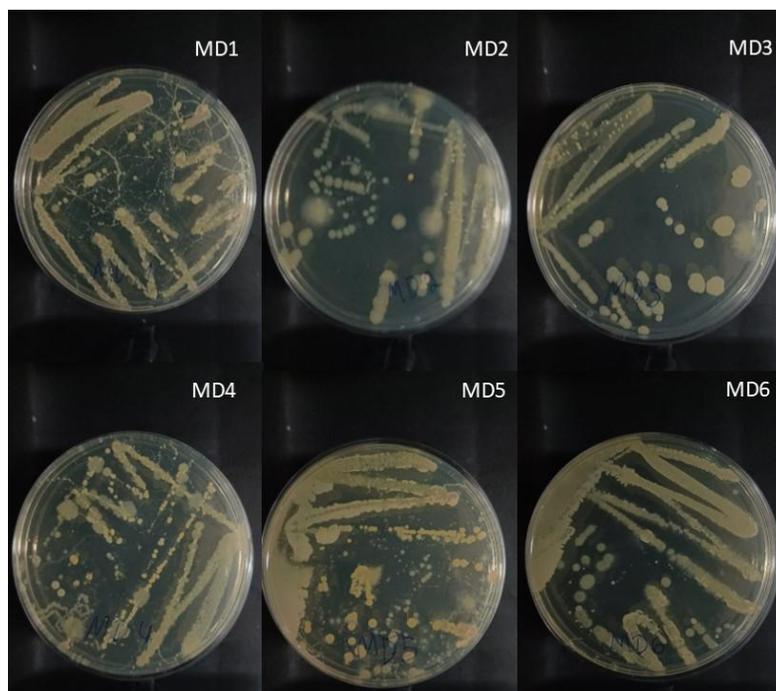


Figura 47. Demonstração da ocorrência de contaminação nas células combustíveis microbianas representativas do controle de meio de cultivo.

Uma nova rodada de testes foi realizada os sistemas contendo o inóculo 848, microrganismo selecionado, identificado como *Shewanella*. sp. e sistemas contendo apenas o controle MD com o intuito de testar a temperatura de cura do ágar. Para tal, um sistema foi seco durante 20 minutos a temperatura ambiente enquanto outro sistema foi seco na geladeira, também durante 20 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 36. Apesar do valor médio de ddP dos sistemas que foram colocados na geladeira ser maior quando comparados a suas contrapartes que foram deixadas no ambiente, não é possível afirmar que esse procedimento é favorável, uma vez que a dispersão dos resultados foi elevada. Por isso, novos ensaios são necessários para diminuir o desvio dos valores médios.

Tabela 36. Diferença de potencial ddP (mV) e densidade óptica (OD) microbiana dos sistemas avaliados.

Sistema (Inóculo)	ddp dia 1	ddp dia 6	ddp médio dia 6	OD (600nm) final
848-1 (geladeira)	-169	-108		0,073
848-2 (geladeira)	-230	-166	-125	0,075
848-3 (geladeira)	-89	-101		0,082
848-4 (ambiente)	-227	-148		0,076
848-5 (ambiente)	-194	-100	-190	0,080
848-6 (ambiente)	-78	-322		0,390
MD 1	-10	-102		0,206
MD 2	-18	-63	-77	0,090
MD 3	-25	-66		0,112
MD 4	-18	-140		0,106
MD 5	-4	-80	-82	0,078
MD 6	-33	-26		0,271

Shewanella sp. é um microrganismo fascinante principalmente devido às suas capacidades metabólicas únicas. Esta bactéria é conhecida por sua capacidade de reduzir uma ampla gama de aceptores de elétrons, o que a torna particularmente interessante para estudos em biorremediação e bioenergia. Uma das características mais notáveis de *Shewanella* sp. é sua capacidade de reduzir íons metálicos, incluindo ferro e manganês, que podem ser aproveitados para a desintoxicação de ambientes contaminados. Outro aspecto intrigante de *Shewanella* sp. é seu habitat. Foi originalmente isolado do intestino do peixe de águas profundas. Esta adaptação sugere que *Shewanella* sp. pode possuir enzimas e vias metabólicas únicas que lhe permitem prosperar sob condições de alta pressão e baixa temperatura, tornando-o um assunto de interesse para a pesquisa extremófila. Ele pode utilizar uma variedade de

compostos orgânicos e inorgânicos como doadores e aceitadores de elétrons, o que ressalta sua versatilidade metabólica. Essa versatilidade não é apenas fascinante de uma perspectiva microbiológica, mas também tem potencial para várias aplicações industriais, incluindo o desenvolvimento de células de combustível microbianas (Zou et al. 2019, Hazzan et al. 2023), corroborando os resultados obtidos até o momento.

Portanto, com o intuito de manter a premissa de simplificação da célula eletroquímica, e levando em conta os resultados obtidos até o momento, é possível parametrizar os seguintes elementos:

- Corpo do dispositivo feito de componentes hidráulicos de fácil acesso;
- Eletrodos de carbono com diâmetro de 22mm;
- Volume de 5 mL de solução contendo ágar (membrana separadora);
- Cura da membrana separadora em temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ \text{C}$);
- Sistemas contendo o Inóculo 848.

Foi realizado um Planejamento Experimental (DoE) para otimizar a produção de energia pela bactéria 848. Para tal, foram selecionados três variáveis independentes. O DoE foi realizado pela metodologia DCCR (2^3+6pc) (Tabela 37, 38, 39). Para o registro de produção, foi utilizado o protótipo de CCM de laboratório apresentado anteriormente, com dois substratos de carbono (ânodo e cátodo), sendo a diferença de potencial ddP monitorada por multimetro (BOM-6007-BOMVINK - mV).

Tabela 37. Variáveis avaliadas no Planejamento Experimental (DoE – 1) a fim de otimizar a atividade de bioeletroatividade do microrganismo 848.

Variáveis (g/L)	-1,68	-1	0	1	1,68
MD	0,0	14,3	27,0	39,7	66,7
Extrato de Levedura	0,0	0,8	2,0	3,2	8,0
NaCl	0,0	3,8	10,0	16,2	40,0

Tabela 38. Planejamento Experimental (DoE – 1) para a linhagem 848.

Ensaio	MD	Ext. Lev.	NaCl
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1

6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Tabela 39. Planejamento Experimental (DoE – 1) para a linhagem 848 com detalhamento das concentrações (g/L) de cada variável para cada ensaio (tratamento).

Ensaio	MD	Ext. Lev.	NaCl
1	14,3	0,8	3,8
2	39,7	0,8	3,8
3	14,3	3,2	3,8
4	39,7	3,2	3,8
5	14,3	0,8	16,2
6	39,7	0,8	16,2
7	14,3	3,2	16,2
8	39,7	3,2	16,2
9	0,0	2,0	10,0
10	66,7	2,0	10,0
11	27,0	0,0	10,0
12	27,0	8,0	10,0
13	27,0	2,0	0,0
14	27,0	2,0	40,0
15	27,0	2,0	10,0
16	27,0	2,0	10,0
17	27,0	2,0	10,0
18	27,0	2,0	10,0
19	27,0	2,0	10,0
20	27,0	2,0	10,0

O ensaio 8 (39,7 g L⁻¹ de MD, 3,2 g L⁻¹ Extrato de Levedura e 16,2 g L⁻¹ de NaCl) apresentou os resultados mais promissores com uma diferença de potencial ddP média 182 mV. O pico máximo de produção foi registrado entre 144h e 168h (Tabela 40).

Tabela 40. Resultados do DoE – 1 para o microrganismos 848, sendo apresentado os valores de diferença de potencial ddP (mV) para cada ensaio (composição de diferentes variáveis) entre 1 e 9 dias.

Ensaio	24h	48h	72h	144h	168h	192h	216h
1	-36	-16	-17	-15	-8	-1	3
2	-1	5	5	4	7	10	13
3	-77	-122	-186	-122	-80	-31	22
4	-101	-255	-247	-133	-103	-76	-57
5	-27	-27	-39	-68	-64	-55	-47
6	-18	-11	-26	-22	-16	-12	-10
7	-77	-86	-97	-88	-80	-74	-69
8	-66	-68	-140	-270	-274	-221	-238
9	-22	-16	-32	-63	-65	-65	-62
10	-32	-25	-41	-64	-62	-60	-58
11	-35	-27	-49	-90	-93	-91	-90
12	-70	-58	-95	-120	-98	-77	-62
13	-74	-57	-67	-52	-38	-31	-28
14	-21	8	6	-6	-9	-13	-19
15	-49	-23	-25	-19	-16	-9	-3
16	-62	-55	-52	-42	-36	-26	-19
17	-64	-62	-67	-53	-44	-34	-23
18	-57	-22	-28	-30	-28	-26	-25
19	-61	-62	-100	-120	-110	-104	-98
20	-89	-57	-100	-120	-120	-210	-199

O meio selecionado é extremamente rico em sal, o que pode mascarar a produção de energia a partir do microrganismo. Segundo Hau & Gralnick (2007) muitos genes para transportadores de nutrientes dependentes de Na⁺ foram recrutados para usar o alto conteúdo de Na⁺ como fonte de energia para o gênero *Shewanella*, talvez por isso a preferência por meio salinos. Zhao et al. (2010) sugerem o meio TN para a produção do gênero *Shewanella*. Este gênero pode crescer anaerobicamente usando nitrato, dióxido de manganês (MnO₂), trimetilamina N-óxido (TMAO) e/ou dimetilsulfóxido (DMSO) comumente encontrados em ambientes de sedimentos marinhos, como aceitadores de elétrons terminais. A Tabela 41 apresenta as especificações entre os meios MD, T8 (DoE – 1) e o meio TN.

Tabela 41. Composição dos meios sugeridos para o cultivo do microrganismo 848, produtor de bioeletroatividade.

Cod. meio	Composição	Origem
MD	37,4 g L ⁻¹ (5 g de peptona; 1 g de extrato de levedura; 0,1 g de citrato férrico; 19,45 g de cloreto de sódio; 5,9 g de cloreto de magnésio; 3,24 g de sulfato de magnésio; 1,8 g de cloreto de cálcio; 0,55 g de cloreto de potássio; 0,16 g de bicarbonato de sódio; 0,08 g de brometo de potássio; 34 mg de cloreto de estrôncio; 22 mg de ácido bórico; 4 mg de silicato de sódio; 2,4 mg de fluoreto de sódio; 1,6 mg de nitrato de amônio; 8 mg de fosfato dissódico; pH 7,6±0,2)	Difco™ Marine Broth BD 2216
TN	16 g L ⁻¹ bacto peptona; 4 g L ⁻¹ extrato de levedura; sais marinhos; pH 7,3, Tris 20 mM na presença de DMSO (1%)	Modificado de Zhao et al. 2010
T8	39,7 g L ⁻¹ de MD, 3,2 g L ⁻¹ Extrato de Levedura e 16,2 g L ⁻¹ de NaCl	Difco™ Marine Broth BD 2216 modificado

O teste comparando os três diferentes meios avaliou a biomassa e a diferença de potencial ddP ao longo do tempo (288h) em sistema com agitação (180 rpm) a 28°C, em duplicata. A Tabela 42 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 42. Comparação da biomassa (OD_{600nm}) e da bioeletroatividade (mV) do microrganismo 848 exposto à diferentes meios de cultivo por 288h.

Meio	Biomassa (OD _{600nm})			Diferença de Potencial ddP (mV)		
	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média
MD	0,517	0,919	0,891	21	144	93,33
TN	0,464	1,76	1,320	88	265	166,67
T8	0,601	0,795	0,747	21	168	75,97

O tratamento mais efetivo foi o TN, tanto para a produção de biomassa quanto para a produção de bioeletroatividade.

Para validar os resultados obtidos até o momento, foram avaliados diferentes faixas de parâmetros ambientais (meios de cultivo, temperatura, pH, salinidade) e, posteriormente, testados de forma integrada de forma estática e sob agitação (180 rpm).

As faixas de concentração de NaCl para crescimento foram determinadas em meio TS suplementado com NaCl em concentrações variando de 0% a 12% (0, 0,5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12%). O crescimento em diferentes temperaturas (4, 10, 20, 30, 37, 45, 60°C) e níveis de pH tamponado (4,5, 5,

5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10) foram determinados em meio MD. Os ensaios apresentaram densidade óptica inicial de 0,05 a 600 nm e foram incubados com agitação (180 rpm) a 30°C. A biomassa foi estimada em 6h, 24h, 48h, 72h e 168h utilizando um espectrofotômetro para medir a absorbância a 600 nm.

A cepa bacteriana cresceu melhor em meio TN, seguido por MD e TS. O 848 foi capaz de crescer em concentrações de NaCl variando de 0 a 12%, com uma concentração ótima para crescimento entre 2 e 8%. A bactéria foi capaz de crescer em temperaturas de 4 a 45 °C, com crescimento ótimo ocorrendo a 30 °C. A cepa também cresceu em níveis de pH de 4,5 a 10, com crescimento ótimo em pH de 6,5 a 8. A Tabela 43 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 43. Crescimento (Biomassa_{600 nm}) da bactéria 848 (180 rpm, 30 °C) exposta a diferentes meios de cultura, concentrações de NaCl, temperaturas (°C) e níveis de pH.

Meio	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
MD	0,329	0,888	0,698
TN	0,488	1,266	0,963
TS	0,208	0,869	0,590

NaCl (%)	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
0	0,208	0,869	0,590
0,5	0,330	0,997	0,769
2	0,303	1,163	0,822
3	0,205	1,248	0,830
4	0,179	1,085	0,824
6	0,136	1,174	0,885
8	0,121	1,216	0,859
9	0,118	1,171	0,721
10	1,156	1,228	0,710
11	0,073	1,307	0,690
12	0,073	1,616	0,600

Temperature (°C)	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
4	0,140	0,775	0,400
10	0,208	1,085	0,743
20	0,292	1,044	0,770
30	0,710	1,186	0,956
37	0,334	0,775	0,508
45	0,222	0,469	0,325
60	0,144	0,219	0,166

pH	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
4,5	0,081	0,781	0,434
5	0,163	0,671	0,639
5,5	0,409	1,224	0,792
6	0,472	1,339	0,875
6,5	0,914	1,629	1,266
7	0,570	1,616	1,220
7,5	0,357	1,577	1,169
8	0,545	1,710	1,366
8,5	0,462	1,033	0,740
9	0,469	1,019	0,739
9,5	0,490	1,030	0,743
10	0,536	1,185	0,850

Para avaliar a bioeletroatividade da bactéria 848, foi realizado um ensaio em dois meios líquidos, MD e TN, com e sem adição de 3% de NaCl. As culturas foram expostas a condições estáticas (0 rpm) e agitadas (180 rpm) em pH 8 e 30°C, representando condições ótimas de crescimento com base em resultados anteriores. O ensaio durou 28 dias, com análises de OD₆₀₀ (em um tubo Falcon de 50 mL contendo um inóculo de 15 mL) e diferença de potencial ddP (em uma célula de combustível microbiana – CCM com um inóculo de 7 mL) realizadas em 0, 24, 48, 120, 168 horas e nos dias 14, 21 e 28. A densidade óptica foi medida usando um espectrofotômetro e a densidade de potência foi medida com um multímetro (BOM-6007-BOMVINK). A OD inicial foi de 0,05 e o inóculo foi adicionado à CCM sem formação prévia de biofilme.

Foram observadas diferenças entre os fatores que mais afetaram positivamente a diferença de potencial (ddP) e a biomassa da bactérias 848. Para a ddP, apenas o fator tempo e a interação entre tempo e meio de cultura foram significativos. O meio TN apresentou ddP significativa entre 24 e 168 horas. O meio MD apresentou densidade de potência significativa entre 48 horas e 28 dias. Já o meio com adição de sal apresentou ddP significativa entre 48 horas e 28 dias (TN + 3% NaCl) e 120 horas e 14 dias (MD + 3% NaCl) (Figura 3). O TN foi o tratamento que atingiu ddP significativa mais rapidamente, enquanto a maior durabilidade foi registrada para os tratamentos MD e TN + 3% NaCl. O maior valor de ddP registrado foi observado para TN + 3% NaCl (250 mV).

Desta forma, o melhor meio de produção de energia para a bactéria 848 é meio TN + 30 gL⁻¹ de NaCl; pH 8,0, Tris 20 mM na presença de DMSO (1%), 30°C, podendo ser incrementado com o substrato

L-Serina, previamente avaliado por Biolog Ecoplate para crescimento da bactéria.

4.3. ETAPA 03: desenvolvimento do protótipo e teste em campo

4.3.1. Desenvolvimento do protótipo em larga-escala

Desenvolvimento de dispositivo microbiano para geração de energia a partir de eletroatividade de microrganismos. Nesta etapa, os microrganismos do BANCO REGENERA selecionados com eletroatividade foram preparados para implementação nos protótipos de escala de campo (sinalização). Dentre os parâmetros avaliados em campo, inclui-se: viabilidade do sistema, produção de energia, validação durante o dia, validação durante a noite, ofuscamento de faróis, distância de detecção por veículo, poluição visual, tempo entre manutenções, resistência a intempéries. A qualificação dos parâmetros será definida após o desenvolvimento do protótipo e teste em campo.

Com o intuito de melhorar o potencial operacional dos sistemas (diferença de potencial das células unitárias), foi proposto um sistema eletrodo de alumínio – eletrólito (ágar – solução contendo os inóculo) – eletrodo de carbono.

Considerando que o requisito principal exigido para funcionamento de um sinalizar comercial é uma bateria de 6V, é necessário a utilização de módulos contendo mais do que uma CCM unitária para atender essa demanda. Para tal, serão necessários 2 módulos com 4 células unitárias utilizando o sistema eletrodo de alumínio – eletrólito (ágar – solução contendo os inóculo) – eletrodo de carbono. A seguir está descrito o projeto para confecção de um módulo.

O primeiro passo é a confecção da meia célula composta por eletrodo de alumínio envolto em ágar. Para isso foi utilizado um molde para produção dessa meia célula, conforme ilustra a Figura 48.

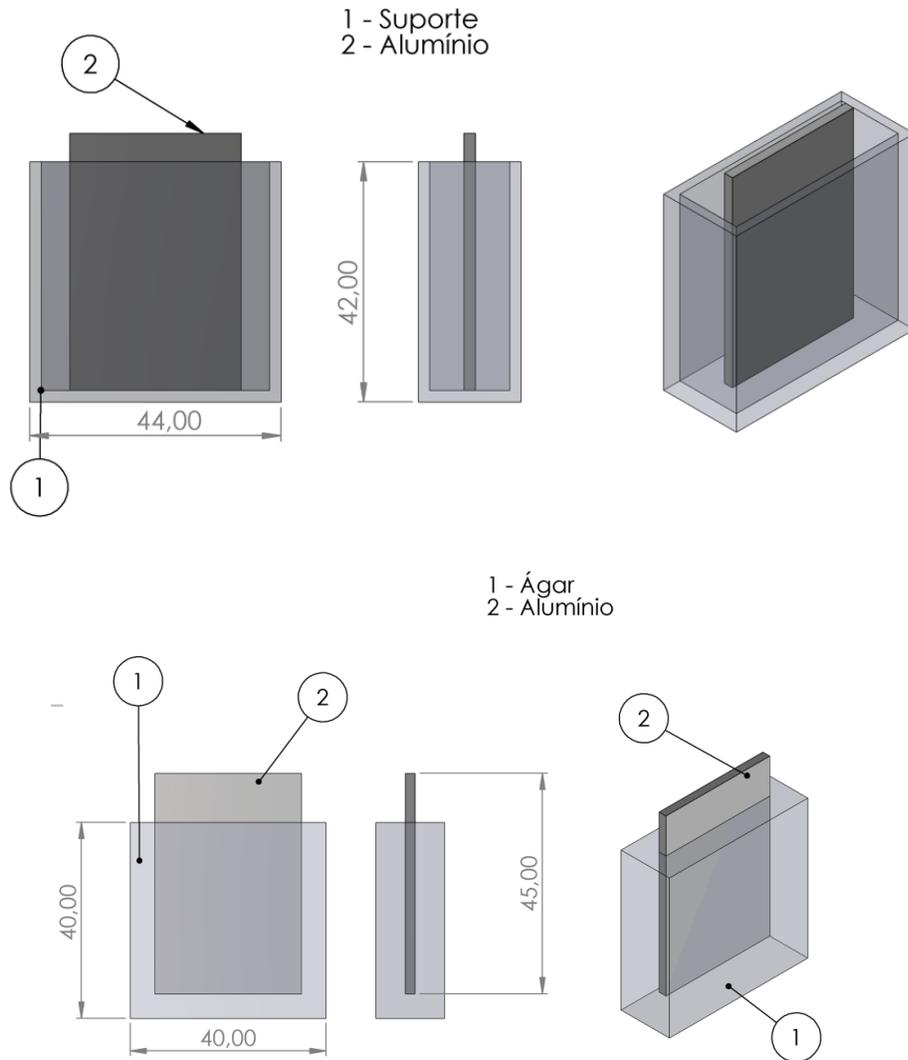


Figura 48. Produção de meia célula alumínio-ágar.

Essa meia célula é levada para o suporte do módulo CCM. Esse procedimento é realizado para quatro células unitárias individuais que compõem o módulo. A Figura 49 apresenta essa montagem.

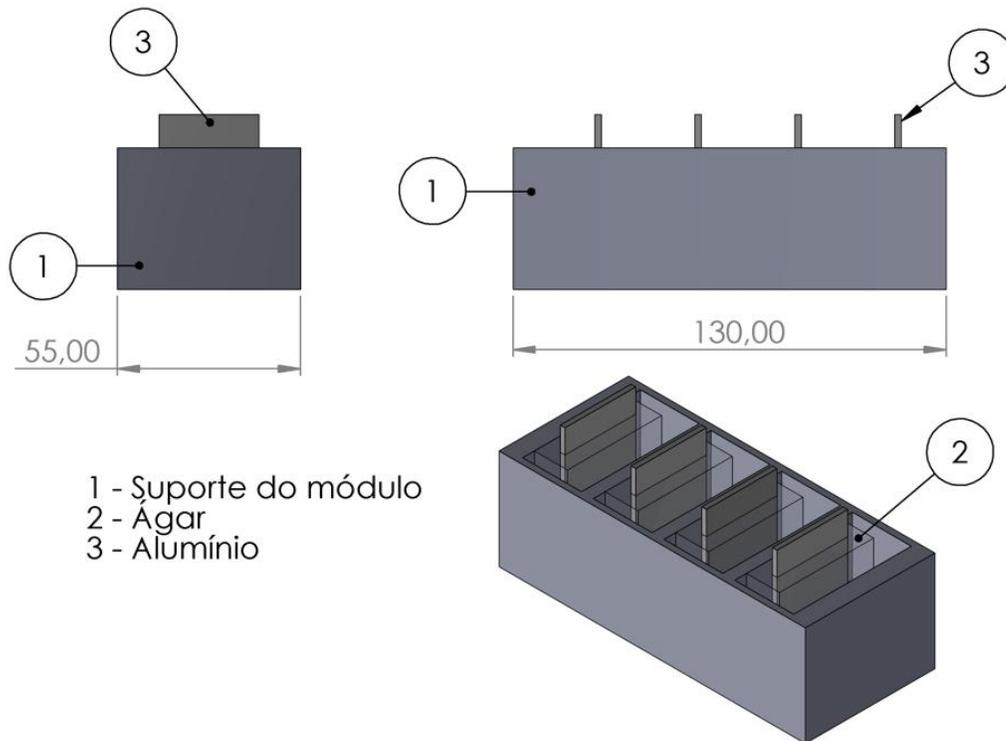


Figura 49. Montagem do módulo CCM – etapa 1.

Na próxima etapa, o sistema é preenchido com a solução contendo o inóculo e em seguida a placa de vedação é colocada, com posterior colocação dos eletrodos de carbono. Por fim, o sistema é fechado. A Figura 50 apresenta essa montagem.

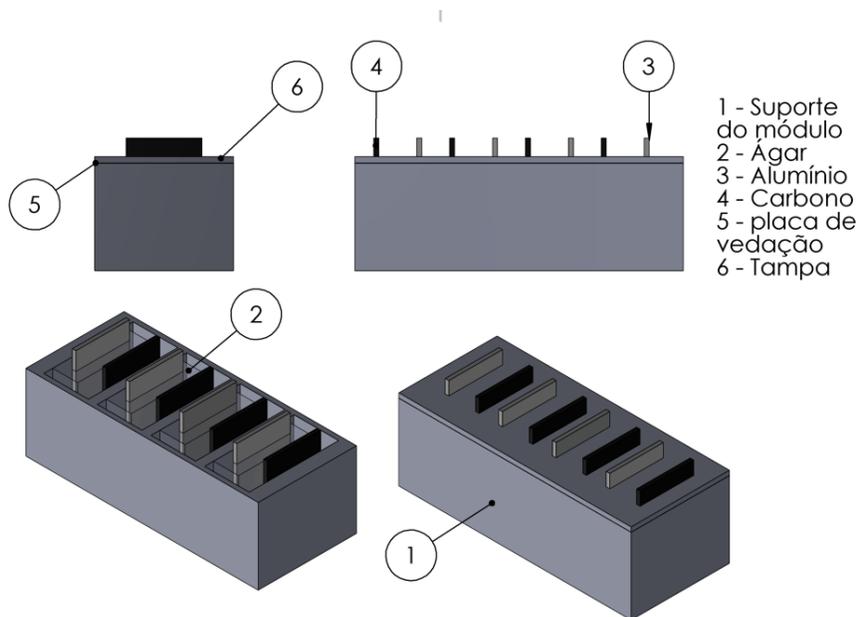


Figura 50. Montagem do módulo CCM – etapa 2.

Cabe destacar que os módulos serão colocados no interior do cone de sinalização, o qual apresenta diâmetro inferior mínimo externo de 250 mm, conforme mostra a Figura 51.

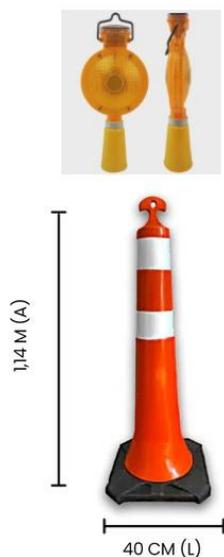
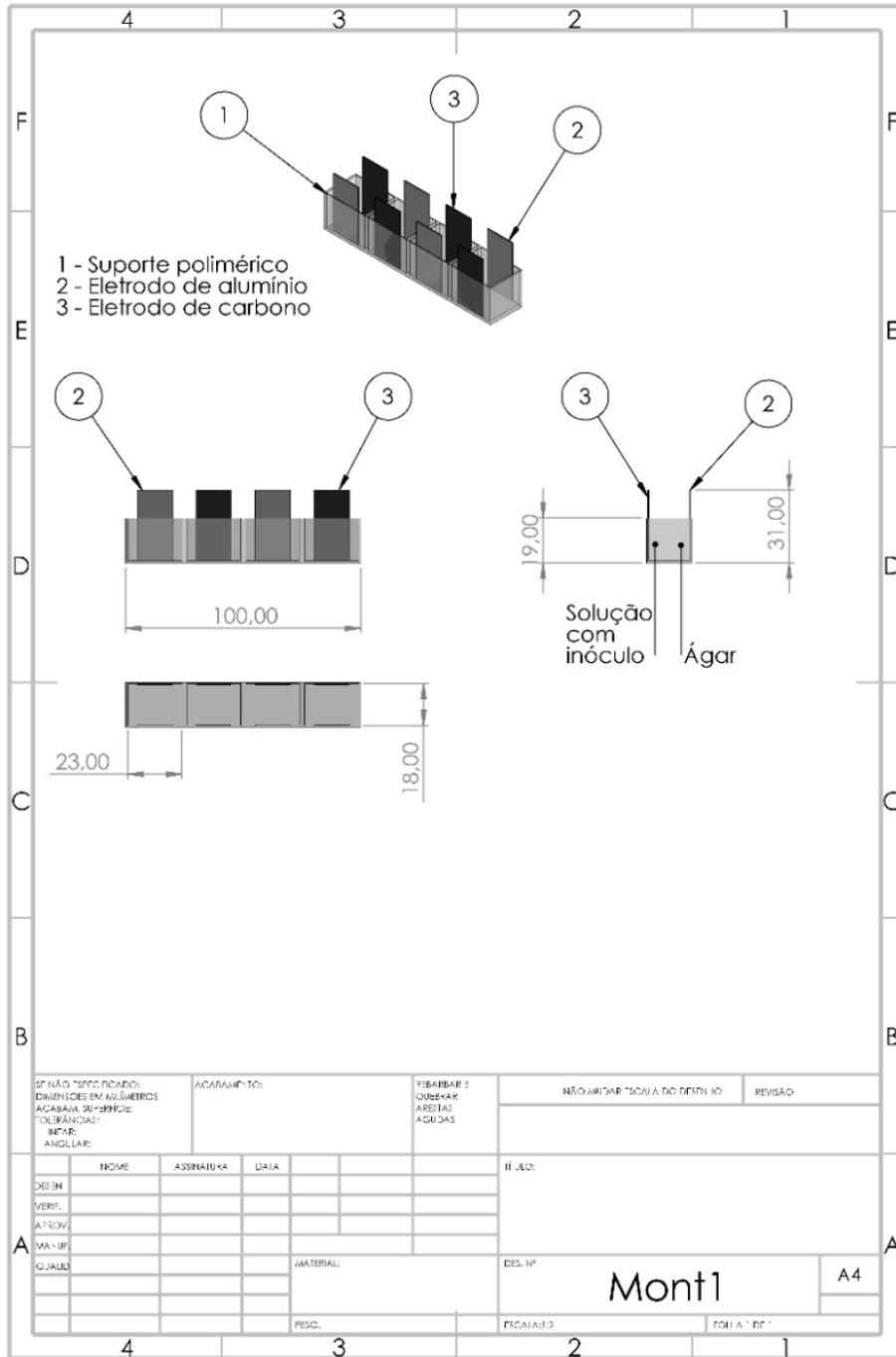


Figura 51. Montagem do protótipo do sinalizador alimentado com os módulos CCM (dimensões do módulo em milímetros).

Para o protótipo final, foi prjetado um sistema misto com carbono, alumínio otimizado para atender os pré-requisitos de instalação no balizador. A Figuras 52 apresenta o projeto dos sistemas CCM e a Tabela 44 a lista de componentes.



		<ul style="list-style-type: none"> • Dimensões do painel solar: 6,5 cm x 3,5 cm • Peso: 600 g
Caixa do módulo com 6 conjuntos de 4 células unitárias	2 unidades	Feito de material polimérico
Placa de carbono	1 placa 25 cm X 25 cm	Placas Graflex® feitas a partir de puro grafite flexível (Graflex® TJB), com espessura de 0,8 mm.
Placa de alumínio	1 placa de 30 cm X 30 cm	Folha de alumínio para latonagem com espessura de 0,10 mm.
Cabo de cobre	3 metros	Cabo flexível de cobre com diâmetro de 1.5 mm

Descrição construtiva dos componentes do sistema de energia

O sistema de energia é composto por 2 módulos de produção de energia inseridos dentro de uma caixa de proteção externa com abertura para passagem da conexão elétrica, como apresentado na Figura 53. A Figura 54 exibe uma fotografia do sistema de alimentação completo com os 2 módulos.

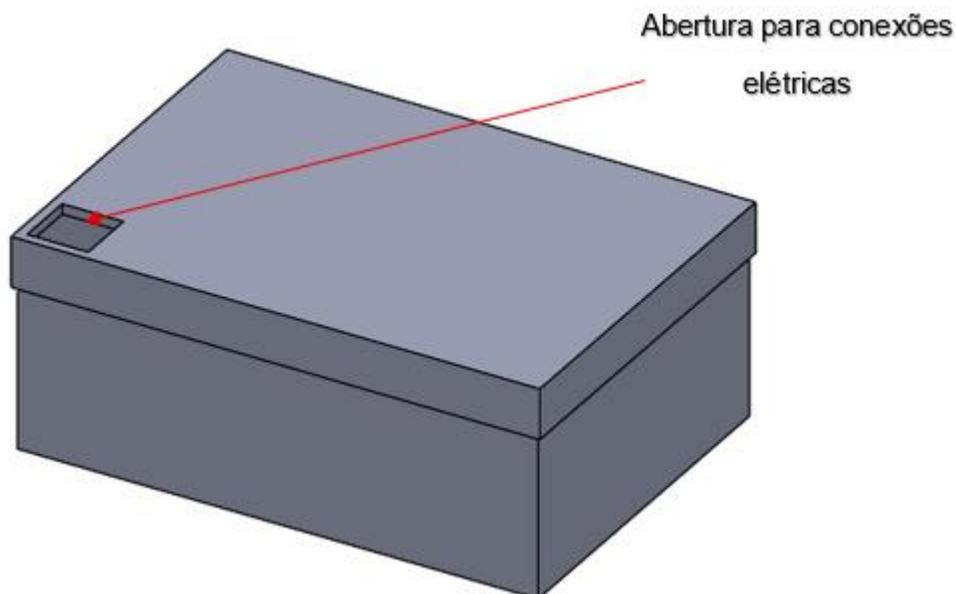


Figura 53. Sistema de alimentação fechado para o protótipo de bioeletroatividade.

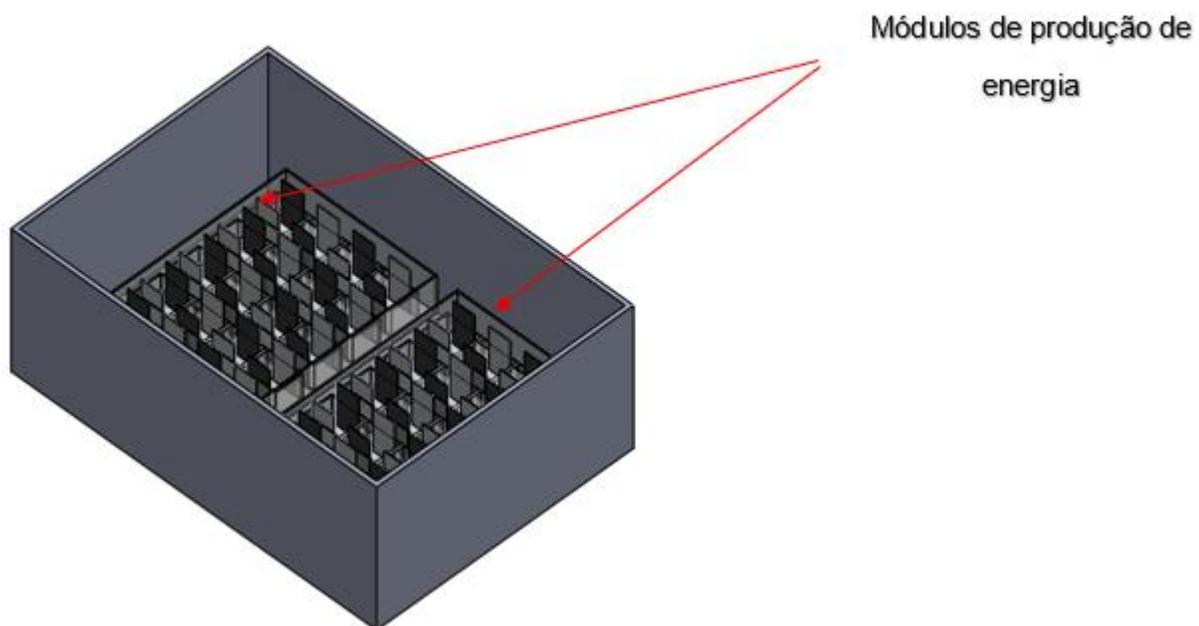


Figura 54. Sistema de alimentação aberto para o protótipo de bioeletroatividade.

Módulos de produção de energia

A Figura 55 apresenta o projeto do módulo de produção de energia, o qual é responsável por suportar as células unitárias. Cada módulo é composto por 6 conjuntos contendo 4 células unitárias cada, conforme mostrado na 56, onde cada célula unitária é composta por 1 eletrodo de carbono e 1 eletrodo de alumínio.

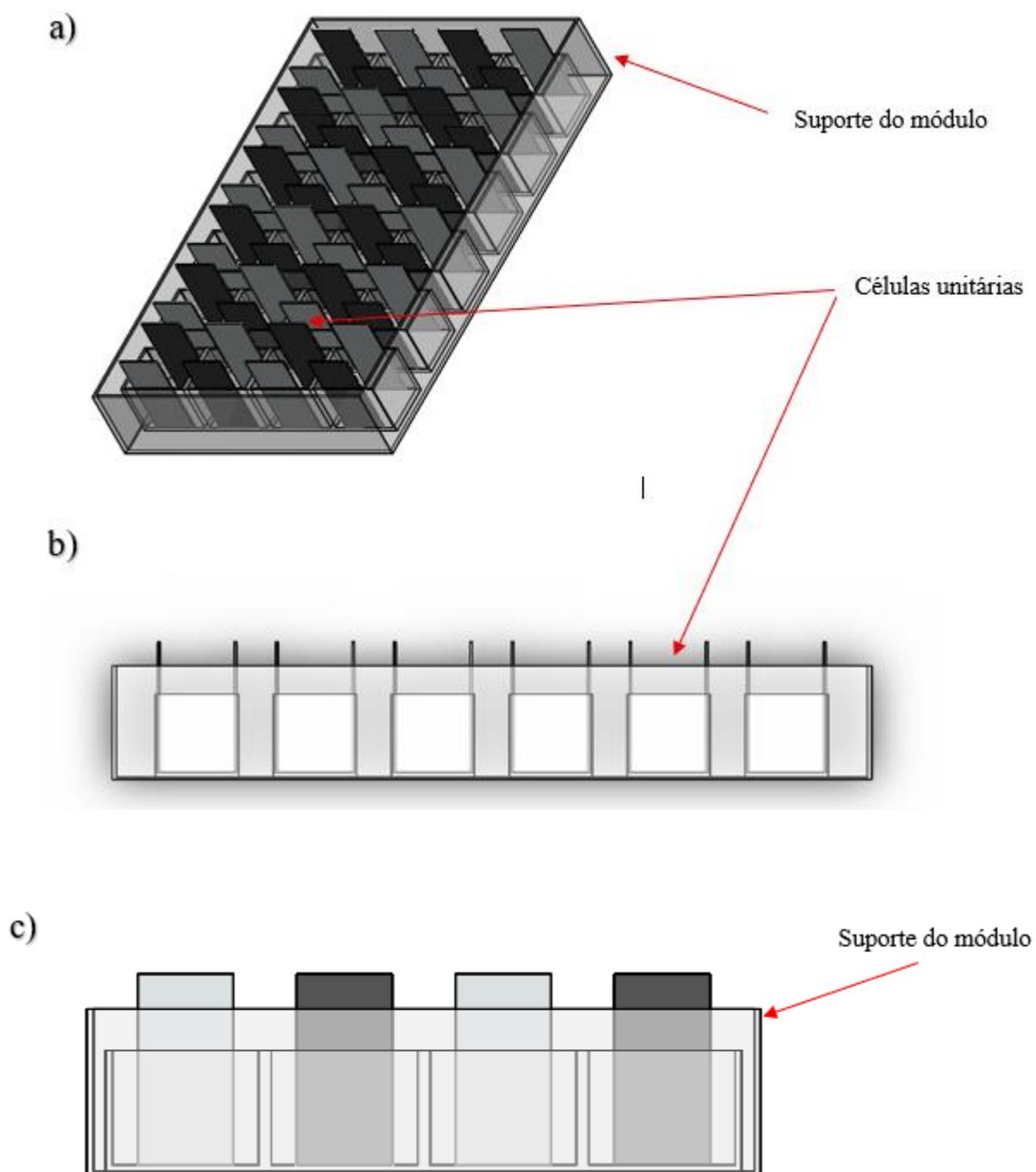


Figura 55. Projeto do módulo de produção de energia para o protótipo de bioeletroatividade. a. vista isométrica; b. vista lateral, c: vista frontal.

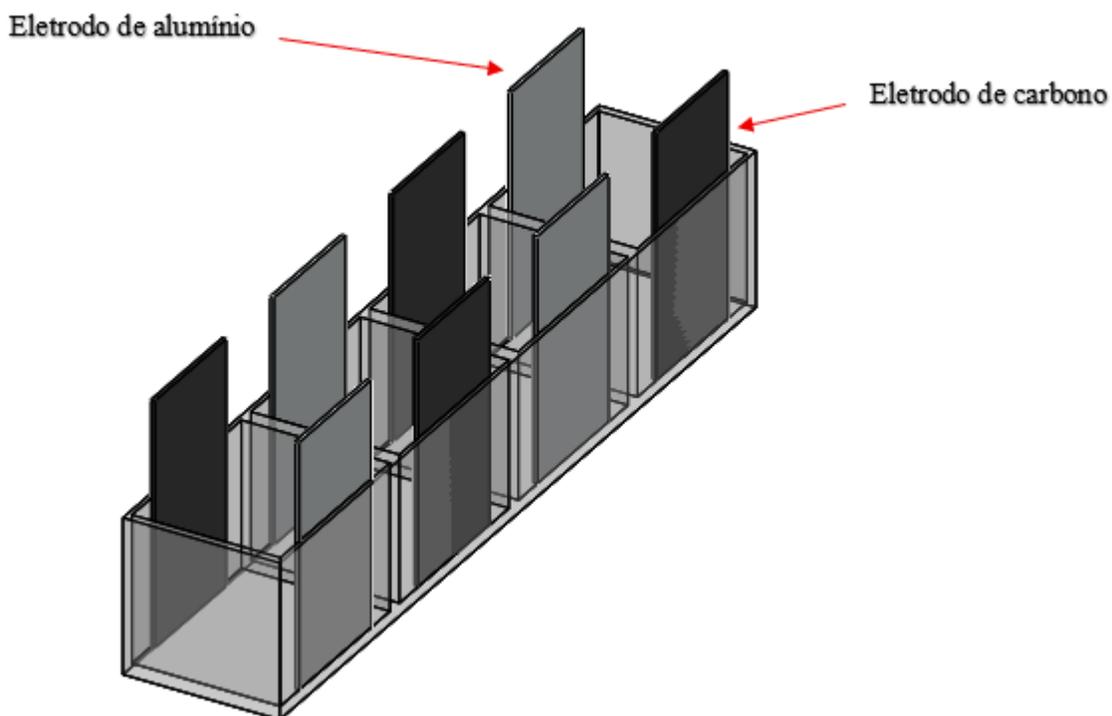


Figura 56. Conjunto de 4 células unitárias para o protótipo de bioeletroatividade.

Conjuntos de 4 células unitárias

A Figura 57 apresenta o projeto do conjunto das células unitárias, a qual deve ser feita de material polimérico. Estão apresentadas as principais dimensões (em milímetros). A espessura dessa peça deve ser suficiente para garantir a estabilidade mecânica do componente.

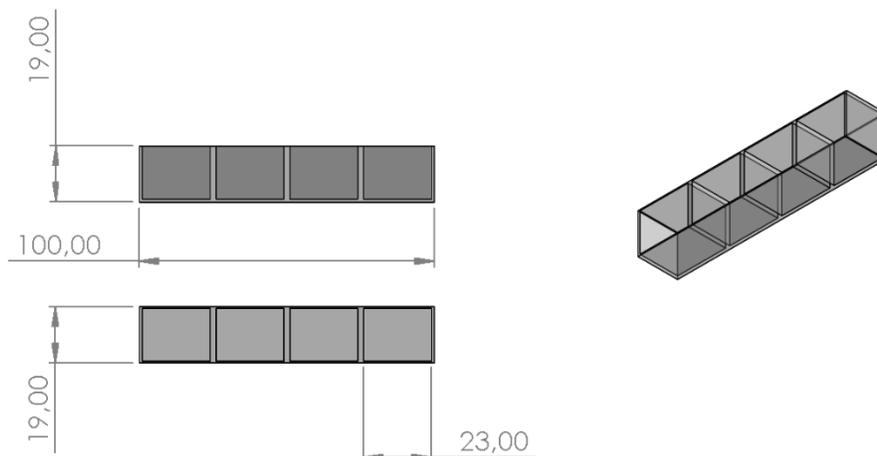


Figura 57. Dimensões da do conjunto das células unitárias para o protótipo de bioeletroatividade.

Eletrodos

A Figura 58 apresenta as dimensões dos eletrodos. O eletrodo positivo deve ser de carbono na espessura de 0,8 mm e o eletrodo negativo deve ser de alumínio, na espessura de 0,1 mm. Estão apresentadas as principais dimensões (em milímetros). São necessários 24 eletrodos de carbono e 24 eletrodos de alumínio, por módulo.

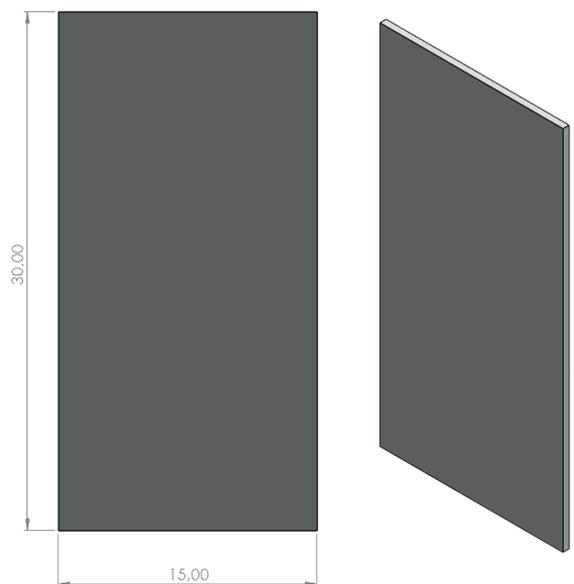


Figura 58. Dimensões dos eletrodos para o protótipo de bioeletroatividade.

Abaixo está apresentado o protocolo de montagem do protótipo:

Preparo dos eletrodos de carbono

Os eletrodos devem ser cortados nas dimensões de 3 cm de altura por 1.5 cm de lateral e devem ser lixados com água e sabão neutro até um se atingir um acabamento uniforme. Em seguida devem ser lavados com álcool 70% em banho ultrassônico durante 10 minutos. Por fim devem ser levados a uma estufa a 100° C para secagem.

Preparo dos eletrodos de alumínio

Os eletrodos devem ser cortados nas dimensões de 3 cm de altura por 1.5 cm de lateral e devem ser lixados à seco até um se atingir um acabamento uniforme. Em seguida devem ser lavados com álcool 70% em banho ultrassônico durante 10 minutos. Por fim devem ser levados a uma estufa a 100° C para secagem.

Preparo dos Suportes poliméricos para células unitárias

Inicialmente, esses suportes devem ser lavados com álcool 70% e secos. Em sequência os eletrodos de alumínio e carbono devem ser fixados ao suporte com o auxílio de cola quente, a qual é colocada na parte posterior do eletrodo, e em seguida, fixado no suporte, conforme mostra a Figura 59.

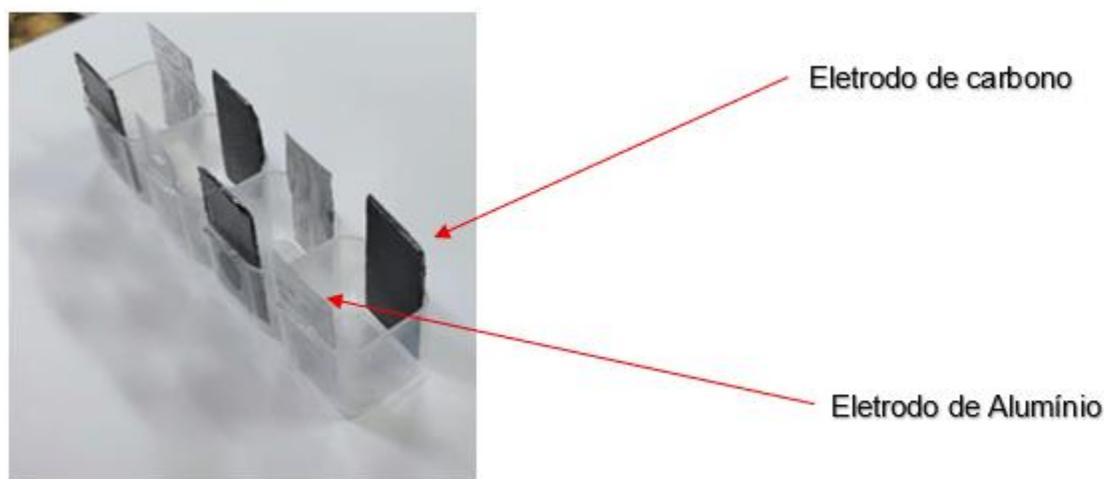


Figura 59. Suporte das células unitárias para o protótipo de bioeletroatividade.

Preparo do eletrólito sólido de ágar

Inicialmente deve ser preparada uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 3.56% de acordo com a norma ASTM: G61. Para tal, 3.4 gramas de NaCl da marca Synth foram dissolvidos em 92 mL de água ultrapura Milli-Q. Em seguida, 2 gramas de ágar foram diluídos em 100 mL de solução aquosa de NaCl 3,56% em peso. Por fim essa solução foi aquecida e mantida sob agitação até atingir homogeneidade. Essas proporções de água, cloreto de sódio e ágar devem ser mantidas caso necessite de quantidades maiores de eletrólito.

Adição do eletrólito sólido de ágar nas células unitárias

Utilizando o suporte polimérico para células unitárias com os eletrodos devidamente fixados, deve ser posicionado um suporte separador que entra de maneira justa nas células, para que seja possível verter o eletrólito sólido a base de ágar e NaCl apenas no compartimento do eletrodo de alumínio. Em seguida o eletrólito ainda líquido é colocado no compartimento e levado para curar na geladeira por pelo menos 30 minutos. Por fim, o suporte separador deve ser cuidadosamente retirado. A 60 ilustra o resultado dessa etapa da montagem.



Figura 60. Suporte das células unitárias com separador para o protótipo de bioeletroatividade.

Adição do eletrólito líquido contendo os microrganismos

Nesta etapa o eletrólito líquido contendo os microrganismos deve ser adicionado no

compartimento contendo o eletrodo de carbono. Meio TN; pH 8,0; 30°C, podendo ser incrementado com o substrato L-Serine e/ou flavinas e adicionado 30 gL⁻¹ de NaCl ao meio.

Fixação dos suportes poliméricos na caixa do módulo e conexão elétrica entre as células unitárias

Os suportes poliméricos para células unitárias já devidamente preparados com os eletrodos e eletrólitos deve ser levado para caixa do módulo e fixado nesse suporte externo com fita crepe, conforme mostra a Figura 61. A conexão deve ser sempre entre um eletrodo de carbono e um eletrodo de alumínio e pode ser feita com folha de alumínio ou fio de cobre. Pode ser utilizada solda de estanho para garantir a fixação. No total são seis conjuntos de suportes poliméricos por módulo. No final da montagem deve ficar um eletrodo de carbono e um eletrodo de alumínio livre.

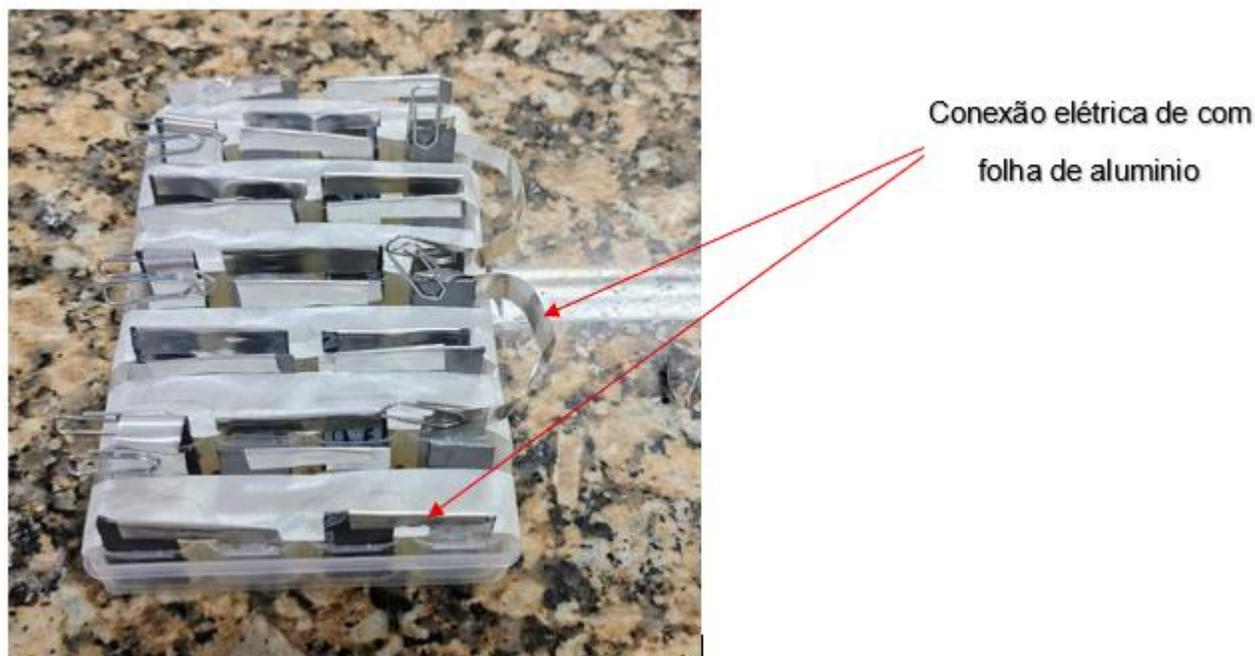


Figura 61. Módulos de produção de energia com conexões elétricas para o protótipo de bioeletroatividade.

Montagem da caixa externa e conexão entre módulos

Nesta etapa dois módulos devem ser inseridos na caixa externa e a ligação entre eles deve ser feita entre eletrodo de carbono e eletrodo de alumínio. Após a caixa externa ser fechada, deve ficar disponível as conexões elétricas de polo positivo (eletrodo de carbono) e de polo negativo (eletrodo de alumínio).

Ligação do sistema de energia com o sinalizador

Na última etapa o sinalizador deve ser fixado no cone balizador e em seguida ligado no sistema de energia, com o eletrodo de carbono final no polo positivo e o eletrodo de alumínio final no polo negativo.

O protótipo de bioeletroatividade desenvolvido teve como objetivo a validação, em ambiente relevante (TRL 5), do potencial de aplicação na sinalização de rodovias.

Identificação do Protótipo: PBEL001S2

Descrição do Protótipo: O sistema de armazenamento de energia utilizado é caracterizado como um banco de baterias feitas com eletrólitos contendo microrganismos. Esse sistema é composto por dois módulos feitos de material polimérico que têm a função de fixar os eletrodos e comportar o eletrólito. Cada módulo possui 24 células unitárias e cada célula unitária possui um eletrodo de alumínio imerso em ágar e outro eletrodo de carbono imerso na solução contendo os microrganismos. Essas células são ligadas em série, ou seja, os terminais positivos são conectados nos terminais negativos, dessa forma a diferença de potencial de todas as células unitárias é somada, fazendo com que o sistema tenha tensão suficiente para ligar o sinalizador. Para realização dos testes foram montados 3 sistemas: Sistema 1 composto por 2 módulos com células unitárias contendo eletrodos de carbono-carbono. Sistema 2 composto por 2 módulos com células unitárias contendo eletrodos de carbono-alumínio. Sistema 3 composto por 2 módulos com células unitárias contendo tanto eletrodos de carbono-carbono quanto carbono-alumínio. Todos os módulos foram construídos utilizando um suporte (caixa organizadora) composto por compartimento externo feito de material polimérico dentro do qual se encontravam 7 conjuntos de 4 compartimentos individuais (Figura 62). Para construção dos sistemas as tampas foram removidas, tanto do compartimento externo, quanto dos compartimentos internos. Os sistemas foram presos ao compartimento externo e as ligações entre as unidades foram feitas com fios de cobre com auxílio de placa de alumínio para fixação. Em seguida os dois módulos foram acondicionados em uma caixa provisória que foi utilizada para garantir a estabilidade do sistema durante o transporte. Como eletrólito foi utilizada um sistema composto por uma ponte salina sólida feita de ágar (20 g L^{-1}) em NaCl ($0,6 \text{ M} - 34 \text{ g L}^{-1}$) e eletrólito líquido contendo o microrganismo (848) em meio de cultivo TN PH8. Abaixo uma imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para o protótipo PBEL001S2 (Figura 63).

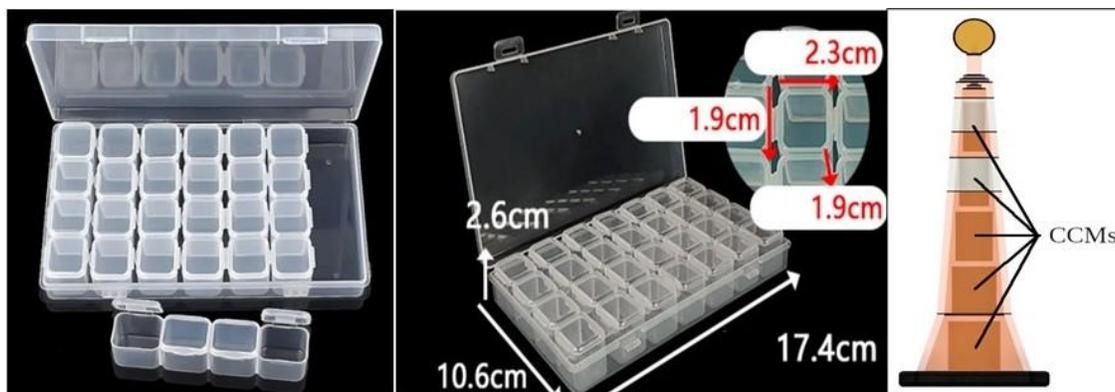


Figura 62. Componentes do utilizados para a construção do protótipo PBEL001S2 de bioeletroatividade.



Figura 63. Imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para o protótipo PBEL001S2.

4.3.2. Produção de biomassa em bioreator dos tratamentos a serem testados nas rodovias

O processo foi rodado em biorreator Minifors 2 (INFORS HT) com duração de 10 dias, utilizando o meio TN (2L) com um inóculo inicial de 0,05 (OD) (Figura 64). A temperatura foi fixada em 28°C (para estimular a biomassa). O pH não foi controlado, permitindo a observação da variação natural da cultura e do perfil metabólico do microrganismo. A agitação (100 min^{-1}) e a aeração ($0,5 \text{ L min}^{-1}$ de O_2 a 21%) foram

ajustadas, mas não controlados. Essa estratégia operacional visa entender o comportamento do microrganismo sob condições menos otimizadas. Durante o período, foram retiradas amostras para avaliação da biomassa e de bioeletroatividade em CCM, utilizando um multímetro (BOM-6007-BOMVINK). Após a amostragem, as CCM continuarão a ser monitoradas a fim de avaliar o momento ideal de remoção do microrganismo para compor o protótipo.



Figura 64. Bioprocesso do microrganismo 848 em reator Minifors 2 (INFORS HT).

Foi observado o crescimento do microrganismos 848 ao longo do tempo. Em relação à ddP foi observado que o T0 (logo após o inóculo) foi mais promissor para a produção de energia a longo prazo, com valores 99,8 e 193,3 mV entre os 17 dias avaliados (Tabela 45).

Tabela 45. Resultados do bioprocesso do 848 em biorreatir Minifors (INFORS HT) com avaliação temporal da diferença de pontencial em CCM.

Parâmetros amostrados	Amostragem	T0	T6	T24	T48	T72h	T144h	T244h
	pO2 (%)		115,9	1,74	5,15	4,61	4,2	2,79
ph		7,51	7,47	7,23	7,35	7,44	7,61	7,9
OD600nm		0,381	0,511	0,611	0,757	0,744	0,812	0,955
OD600nm		0,427	0,52	0,607	0,768	0,72	0,822	0,991
OD600nm		0,435	0,506	0,611	0,729	0,716	0,83	0,989
Média OD		0,414	0,512	0,610	0,751	0,727	0,821	0,978
Diferença de potencial (mV)	0d	99,8	95,4					
	1d	172,5	133,5	30				
	2d	195,3	100,9	72,4	35,5			
	3d	183,7	148,1	113,4	32,2	9,2		
	4d							
	5d							
	6d	141,7	69,7	37,3	81	85,6	21,9	
	7d	127,8	63,3	33,2	59	82,3	122,5	
	8d	124,2	66,2	25,8	63,3	82,4	130,9	
	8d	120,8	59,4	17,5	55,5	75,3	137,2	
	10d	118,5	53,1	6,8	40,5	81	102,4	92,8
	13d	113,8	54,6	7,2	6,4	82,3	23,9	28,3
	14d	112,9	58,1	12,8	1	70,2	5,2	15,8
	15d	114	39,7	1,1	45,3	72,2	1,1	33,8
	17d	135,4	78,5	32,5	42,0	71,2	68,1	42,7

O fato de a maior produção de voltagem (99,8 mV e 193,3 mV) ter ocorrido a partir do T0 e nas amostras iniciais, e não nos picos de crescimento (maior biomassa), sugere que a capacidade de geração de energia está mais ligada à qualidade e ao estado metabólico do inóculo e da formulação inicial do que à quantidade absoluta de células (biomassa). A formulação deve ser otimizada para fornecer um choque inicial de nutrientes e cofatores que maximizem a Taxa de Transferência Extracelular de Elétrons (EET) imediatamente. Em bioprocessos, geralmente, mais células significam mais produto. No entanto, o seu resultado sugere que, para a CCM, o que importa é a eficiência específica (energia produzida por célula) e não a massa total de células. O aumento da biomassa pode, paradoxalmente, levar a uma competição por substrato ou a um aumento da resistência interna da célula, diminuindo a ddP.

4.3.3. Aplicação simulando o campo

PROTÓTIPO BIOELETRATIVIDADE – TESTE DE CAMPO 01

ID: PBEL001S2

Microrganismo: 848

T° de incubação: 28°C

Meio: TN PH8 – Peptona bacteriológica 16 (g L⁻¹); extrato de levedura (4 g L⁻¹); sais marinhos (40 g L⁻¹); pH 8,0, Tris 20 mM na presença de DMSO (1%)

Data do inóculo: 20/08/2025

Volume do inóculo: 750 mL

OD inicial do inóculo: 0,05

Data de montagem do sistema: 21/08/2025

Data de teste do protótipo em campo: 22/08/2025

Horário de teste do protótipo em campo: 19h00

Local Exato do Teste: Campus do Vale – UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil - 30°03'59.6"S
51°07'21.7"W

Tipo de via: Chão batido

Condições da Via:

- Seca
- Úmida
- Molhada
- Poças

Nível de Iluminação Natural: 1 (lua)

Temperatura Ambiente (°C): 23

Umidade Relativa do Ar: 75%

Condição do Céu:

- Ensolarado
- Noturno
- Nublado
- Chuvoso
- Garoa
- Neblina
- Temporal

Velocidade do Vento: 8Km/h

Descrição do Tempo: Dia de sol com algumas nuvens e chuva passageira. Noite com muitas nuvens.

Temperatura entre 16 e 26°C, com chuva (65,2 mm). Vento com direção ENE, umidade do ar entre 70 e 89%.

4.3.4. Definição da qualificação dos parâmetros

PROTÓTIPO BIOELETRATIVIDADE – TESTE DE CAMPO 01

Identificação do Protótipo: PBEL001S2

Tempo para Instalação do Protótipo em Campo: 10 min

Tempo do Teste em Campo: 60 min

Tensão e Corrente de Saída: tensão de 12 V e corrente de 0,40 µA.

Variação da Diferença de potencial ao longo do tempo: Existe variação da tensão ao longo do tempo. A Tabela 46 apresenta a diferença de potencial observada durante o período de avaliação do protótipo de bioeletroatividade.

Tabela 46. Registro de diferença de potencial observada no protótipo de bioeletroatividade ao longo do tempo.

Data da leitura	Diferencia de potencial (ddP)
21.08	2,81 V (sistema 1) + 11 V (sistema 2) + 4 V (sistema 3) = 17,8 V
22.08	12V
25.08	5.5V
26.08	4.5V
27.08	4.4V
28.08	4.4V
29.08	4.3V

Status Visual do Protótipo: Não foram observadas mudanças visuais na estrutura ou componentes.

Observações de Acúmulo de Sujeira: Não foi observado acumulação de sujeira.

Danos Visíveis: Não foram observadas rachaduras, quebras ou deformações.

Umidade Interna do Protótipo: 72% (sistema 1), 76% (sistema 2), 77% (sistema 3)

pH Interno do Protótipo: 7-8 (sistema 1), 7-8 (sistema 2), 7-8 (sistema 3)

Temperatura interna do Protótipo: 21,8°C (sistema 1), 21,2°C (sistema 2), 21,6°C (sistema 3)

4.3.5. Análise estatísticas dos dados observados

PROTÓTIPO BIOELETROATIVIDADE – TESTE DE CAMPO 01

Identificação do Protótipo: PBEL001S2

Estabilidade da Sinalização (Luminosidade/Intensidade ao Longo do Tempo): Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve estabilidade da luminosidade e intensidade. No entanto, como já é conhecida a degradação, com o tempo deverá haver perda da intensidade luminosa produzida.

Gradação da Intensidade Luminosa: A intensidade da luz varia ao longo do tempo, demonstrando degradação. No entanto, a maior diferença de potencial é registrada entre 24 e 120h, valores referentes a uma única célula (7 mL). A Tabela 47 apresenta os valores de diferença de potencial e biomassa registrados ente 0 e 28 dias.

Tabela 47. Registro de gradação da diferença de potencial para uma célula de bioeletroatividade (meio TN PH8).

Tempo	Biomassa (OD600)	DDP	%DDP
0H	0,050	18,725	100
24H	0,759	74,225	396
48H	0,846	160,675	858
120H	0,859	108,9	582
168H	0,954	58,25	311
14D	1,037	32,025	171
21D	1,061	24,475	131
28D	1,079	21,275	114

Cabe ressaltar, que adição de 3% de NaCl na formulação aumenta o tempo de durabilidade dos sistemas por 28 dias, sem comprometer significativamente a biomassa, sendo considerada uma estratégia para protótipos futuros, bem como a adição de flavinas e L-Serina devem ser considerados na formulação final. O NaCl, em concentração de 3%, atua como um estabilizador do sistema, provavelmente ao otimizar o ambiente osmótico para a *Shewanella* (uma bactéria de origem marinha ou costeira, adaptada a ambientes salinos) e inibir o crescimento de microrganismos contaminantes que poderiam competir por substrato ou degradar o biofilme anódico. Essa durabilidade estendida é um fator de viabilidade econômica e operacional para protótipos de sinalização. A sugestão de incluir flavinas e L-Serina na formulação final

visa atacar diretamente a eficiência da Transferência Extracelular de Elétrons (EET), complementando a estabilidade conferida pelo NaCl. As flavinas (riboflavina, FMN) são essenciais para a *Shewanella* por atuarem como mediadores de elétrons solúveis. Elas capturam elétrons da superfície da bactéria e os transportam pela solução até o ânodo (eletrodo). A adição de flavinas na formulação inicial garante que a bactéria não precise gastar energia e tempo para produzir esses mediadores em grandes quantidades, acelerando a produção de energia e, conseqüentemente, a intensidade da luz gerada. A L-Serina é um aminoácido que, além de ser um bloco construtor de proteínas e enzimas, é um substrato de carbono e nitrogênio de fácil e rápido assimilação. Sua inclusão visa fornecer um "combustível premium" que a bactéria pode oxidar rapidamente, mantendo uma alta taxa de respiração e de liberação de elétrons de forma contínua, o que é crucial para manter a voltagem estável ao longo do tempo. No entanto, a adição destes ingredientes deve ser avaliada financeiramente, investigando o custo-benefício de aumentar a complexidade da formulação.

Consumo de Nutrientes/Substrato (para Bioeletroatividade): O microrganismo depende de substrato para a produção de diferença de potencial. Este substrato é consumido com o tempo e também sofre variação de pH a partir do metabolismo dos microrganismos, o que pode levar a perda de bioeletroatividade, mesmo com a quantidade de nutrientes disponível. Para o microrganismo em questão, ele tolera bem pH entre 6 e 8.

Tempo Gasto na Instalação de Cada Protótipo: 96h

Recursos Necessários para Instalação: São necessárias ferramentas gerais e uma única pessoa para a instalação.

Observações sobre a Facilidade de Manutenção: Considerando a troca do módulo inteiro, o sistema pode ser considerado de fácil manutenção. Como o eletrólito do protótipo, este também precisa ter seu funcionamento verificado em temperaturas mais baixas (abaixo de 10° C). Na atual versão, o protótipo prevê a troca do módulo inteiro para manutenção. O que pode ser feito em aproximadamente 10 minutos.

Estimativa de tempo entre manutenções: Com base nos dados coletados durante 8 dias, foi verificado que o sistema tem durabilidade mínima de 8 dias. O sinalizador comercial vem com 2 baterias AA Ni-h 1,2v ligadas em série, totalizando 2,4 V.

Uniformidade da Sinalização: Distribuição uniforme.

Facilidade de Reparo e Modularidade de Componentes: O módulo pode ser acessado com facilidade para troca.

Resistência à Corrosão: O sistema não foi submetido a testes de névoa salina acelerada (ISO 9227). Entretanto cabe mencionar que o módulo é feito de material polimérico, o qual apresenta excelente

resistência à corrosão nesse meio. Da mesma forma, as placas de carbono (fabricados a partir de puro grafite flexível) são consideradas inertes em meios contendo cloretos. Além disso, o alumínio (material do eletrodo e das conexões elétricas) é um material que apresenta boa resistência à corrosão em ambientes salinos devido a formação de uma camada passiva na sua superfície. Entretanto, essa camada passiva formada no alumínio pode conferir resistência elétrica ao sistema, o que pode afetar negativamente o desempenho da bateria, por isso, seriam necessários testes de longa duração com diferentes concentrações de sal no eletrólito para determinar o comportamento desse componente.

Resistência à Vibração: O protótipo não foi submetido a testes de vibração (ANSI C136.31). Porém na versão atual o protótipo (dispositivo conceitual) apresenta fragilidades no transporte, precisando de melhorias dos componentes de fixação.

Proteção de Entrada (Classificação IP): O protótipo não foi avaliado segundo a IEC 60529. Na versão atual do protótipo (dispositivo conceitual) não há um sistema de proteção a poeira e umidade, precisando de melhorias nesse quesito.

Resistência ao Impacto (Classificação IK): O protótipo não foi submetido a testes de impactos mecânicos (IEC 62262). Porém na versão atual o protótipo (dispositivo conceitual) apresenta fragilidades no transporte, precisando de melhorias dos componentes de fixação.

Degradação UV de Materiais: Considerando que é prevista a instalação dos módulos de baterias dentro do cone de sinalização, entende-se que o sistema de armazenamento de energia estaria protegido da degradação UV dos materiais.

Ciclo de Temperatura e Estresse Térmico (-20°C a +40°C): O protótipo não foi exposto a esta variação de temperatura. Porém cabe mencionar que como o dispositivo é composto por eletrólito aquoso, o mesmo está limitado ao uso em temperaturas em que a água se mantenha no estado líquido, ou seja, temperaturas próximas de zero grau ou abaixo disso afetam o desempenho do dispositivo ou até mesmo impossibilitar seu uso. A bactéria em questão foi avaliada quando exposta a um gradiente de temperatura. Em relação à biomassa, a temperatura ótima é de 30° C.

Compatibilidade de Materiais: Os materiais dos módulos foram compatíveis com os eletrodos e com o eletrólito, não sofrendo degradação. Para garantir a integridade dos eletrodos, ensaios de longa duração ainda precisam ser conduzidos.

Integridade da Fiação e Conexões: A fixação e as conexões precisam de melhorias, porém, por se tratar de um dispositivo conceitual fechado, poucos riscos são esperados para a fiação e conexões. As bactérias vivem em um ambiente osmótico específico dentro da formulação. A entrada de água doce em grande volume (hipotônica) pode fazer com que a água entre nas células bacterianas por osmose, causando seu

inchaço e ruptura (lise celular), matando-as. Desta forma, a sensibilidade à água doce é uma vulnerabilidade crítica para a aplicação desse protótipo em ambiente rodoviário. Por ser uma bactéria de origem marinha, o impacto da umidade/chuva pode ser a inativação da atividade em caso de acidente rodoviário com rompimento do sistema. Por este motivo, foi avaliada a sensibilidade da bactéria a um gradiente de salinidade (0 a 12%), a fim de identificar o comportamento frente a uma possível diluição ou evaporação. Para a manutenção da viabilidade das células bacterianas, o teor de sal deve se manter idealmente entre 2 e 8%. A biomassa resistiu na ausência de sal, durante apenas 48h.

Intensidade Luminosa: As normas brasileiras, como as da ABNT NBR 5101 (para iluminação pública) e os manuais de sinalização de órgãos como o DNIT e DERs, estabelecem os requisitos.

1. Sinalização Ativa (Luminárias, Dispositivos Luminosos):

- Para a iluminação pública em rodovias, a ABNT NBR 5101:2012 (Iluminação Pública – Procedimento) estabelece valores mínimos de iluminância média (lux) e uniformidade para diferentes classes de vias. Por exemplo, vias coletoras de Classe A2 podem ter uma iluminância média de 20 lux. Trevos em vias rurais podem exigir níveis de iluminância 50% superiores aos da via principal.
- No caso do seu protótipo com bactérias bioluminescentes, ele seria uma fonte de luz ativa. Não há uma norma específica em lux para "bioluminescência como sinalização de demarcação", mas ele precisaria atingir uma luminância mínima percebida pelo motorista que o tornasse eficaz. Para painéis luminosos ou dispositivos auxiliares, as especificações geralmente focam na intensidade luminosa e na uniformidade.

2. Sinalização Passiva (Retrorefletiva - Películas e Tintas):

- A maior parte da sinalização rodoviária (placas, demarcações horizontais) utiliza materiais retrorrefletivos. Para esses materiais, as normas (como a do DER-SP mencionada em sua pesquisa) estabelecem coeficientes mínimos de retrorrefletividade em candelas por lux por metro quadrado ($\text{cd} \cdot \text{lx}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) para diferentes tipos de película (Tipo I, Tipo II, Tipo III), ângulos de observação e de entrada. Esses valores são críticos para garantir que a luz dos faróis dos veículos seja refletida de volta ao motorista de forma eficiente.

A cor da luz emitida deve ser consistente com os padrões de sinalização viária (geralmente branco ou amarelo), mantendo um contraste adequado com o pavimento, e isso foi validado em campo.

Biodegradação/Impacto Ambiental no Local: Embora a proposta seja sustentável, é importante observar se há algum resíduo ou impacto no solo e na flora local, em caso de vazamento, devido aos componentes dos protótipos.

Análise do Fluxo de Resíduos: O protótipo apresentado gerou cerca de 2 Kg de resíduos biológicos sólidos e líquidos.

Custo-Benefício (Estimativa Preliminar): A estimativa inicial do custo de instalação deste protótipo de iluminação sustentável é de R\$ 461,99, discriminado na Tabela 48.

Tabela 48. Estimativa de custo de material para a construção de um protótipo de bioeletroatividade. Não estão incluídos os custos com transporte, instalação, batelada em biorreator, mão de obra ou sistema otimizado.

Material	Quantidade		Valor
Balizador	1	R\$	78,65
Sinalizador	1	R\$	129,35
Sistemas	6	R\$	120,00
Alumínio	1	R\$	3,60
Agar	17 g	R\$	31,28
Fios de cobre	3 m	R\$	4,11
Lixa	4	R\$	8,00
NaCl	200 g	R\$	8,00
Grafite	1	R\$	15,00
Meio de cultivo	35 g	R\$	64,00
TOTAL		R\$	461,99

Percepção Visual por Pedestres

Número de Observadores: 3

Pedestres Observadores: Graziela Rigo, Rafael Castro, Adilar Gonçalves dos Santos Jr.

Distância Mínima de Detecção Visual: 0 m

Distância Máxima de Detecção Visual: 40 m

Clareza da Sinalização: É nítida, limites do sinalizador visível, mas não do balizador.

Ofuscamento: Os pedestres observadores não se sentiram ofuscados pela própria sinalização em ocorrência de faróis de veículos acionados.

Percepção de Cor e Forma: Houve percepção de cor (amarela/laranja) e forma (redonda) do sinalizador pelos pedestres observadores.

Feedback Subjetivo do Pedestre:

Rafael Castro - *À noite, a iluminação pelo equipamento era perceptível de uma distância de 10 metros, entretanto, seu funcionamento como sinalizador se torna satisfatório apenas mais próximo,*

como 3 metros. A luz emitida não é desconfortável aos olhos, sem nenhum tipo de ofuscamento, mesmo em curtas distâncias.

Graziela Rigo - *Durante a observação em campo, percebi que a luz emitida pelo cone de sinalização, embora de baixa intensidade, era visível em ambiente noturno e cumpria sua função de demarcar a área. A tonalidade da luz me pareceu agradável e, em nenhum momento, provocou ofuscamento ou desconforto visual. A visibilidade a certa distância foi satisfatória, permitindo a identificação do cone com facilidade.*

Adilar Gonçalves dos Santos Jr. - *Boa percepção a baixa distância, até 5 metros, sendo perceptível a diferença entre ligado e desligado.*

Luz Obstrutiva: Não há geração de luz obstrutiva.

Simulação de Detecção por Veículo

Motorista e Carona Observadores: Vanessa Agostini – Motorista, Rafael Castro - Carona

Distância Máxima de Detecção por Veículo: 40 m

Ofuscamento pelos Faróis do Veículo:

Farol baixo – não houve ofuscamento – 10 m

Farol alto – não houve ofuscamento – 10 m

Lanterna – não houve ofuscamento – 10 m

Distância de Detecção de Objeto/Pedestre: A sinalização não permite a identificação de objetos ou pedestres próximos a uma distância de 10 m

Distância de Reconhecimento: 3 m

Feedback Subjetivo do Motorista e Carona:

Vanessa Agostini - *De dentro do carro, a sinalização é nítida de coloração amarelada em contraste com o pavimento. Não foi causado desconforto ou ofuscamento.*

Rafael Castro - *Como carona, é possível identificar a luz emitida pelo equipamento, à 10 metros de distância, apenas se as luzes do carro não estiverem acesas ou iluminando o equipamento. Ainda nesse caso, não foi possível a identificação de objetos ao redor, apenas a luz do balizador era vista. Com faróis ou lanterna ligados, não é possível identificar a emissão de luz. A iluminação não é ofuscante, sendo confortável à visão.*

Luz Obstrutiva: Não há geração de luz obstrutiva.

Avaliação Qualitativa da Poluição Visual: 1

Registros realizados em campo: Figuras 65, 66, 67, 68



Figura 65. Imagens do protótipo de bioeletroatidade PBEL001S2 em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno desligado. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno ligado.



Figura 66. Imagens do protótipo de bioeletroatidade PBEL001S2 em operação. Foto da esquerda:

protótipo em ambiente diurno ligado. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno ligado.



Figura 67. Imagem do protótipo de bioeletroatividade PBEL001S2 em operação durante a noite a uma distância de 10 m.



Figura 68. Imagens do protótipo de bioeletroatividade PBEL001S2 em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente noturno ligado com lanterna de veículo acesa. Foto do centro: protótipo em ambiente noturno ligado com farol baixo de veículo aceso. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno ligado com farol alto de veículo aceso.

5. CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PRODUTOS

5.1. Considerações finais

O objetivo geral deste projeto foi desenvolver para teste em campo sinalizações sustentáveis, dentro das abordagens (i) bioluminescente e (ii) bioeletroatividade, passíveis de aplicação em rodovias e/ou EPIs a partir de microrganismos marinhos. Tanto o objetivo geral quando os objetivos específicos foram todos realizados com sucesso.

Os protótipos bioluminescentes (PBOL002r e PBOL002e) apresentaram fácil instalação, bem como atingiram os critérios de validação em ambiente relevante (tanto na rodovia, quanto no EPI). No caso, do protótipo bioluminescente PBOL002r, por se tratar de um sistema fechado, diminui os custos de produção, aplicação e manutenção, a quantidade de resíduos produzidos, e possíveis efeitos de intempéries. Para o teste em ambiente operacional, o material do sistema deve ser composto por poliuretano transparente com proteção térmica e UV para garantir a maior durabilidade.

Em relação ao protótipo de bioeletroatividade PBEL001S2, apesar de simples e conceitual, atendeu aos critérios de operação em ambiente relevante. Para teste em ambiente operacional, o sistema precisará de ajustes, principalmente os componentes caixa externa, conexões e compartimentos, levando em conta o

comportamento entre eletrodos e eletrólitos (células unitárias). A transferência desse conceito para um dispositivo final requer um desenvolvimento mais complexo, visto que cada componente exige conhecimentos específicos demandando uma equipe multidisciplinar e testes específicos de cara área. Cabe ressaltar, que adição de 3% de NaCl na formulação aumenta o tempo de durabilidade dos sistemas por 28 dias, sem comprometer significativamente a biomassa, sendo considerada uma estratégia para protótipos futuros. Além disso, é possível aumentar a concentração de NaCl na ponte salina para 2 M e incrementar o meio de cultivo com compostos que estimulem o microrganismo, como L-Serina e flavinas.

O desenvolvimento de protótipos de sinalização a partir de microrganismos marinhos demonstra, até o momento, um notável alinhamento com os princípios de sustentabilidade e a busca por um impacto ambiental significativamente inferior quando comparado às tecnologias convencionais atualmente empregadas. Os sistemas de sinalização tradicionais dependem majoritariamente de materiais não renováveis, como baterias de lítio ou chumbo-ácido para armazenamento de energia, polímeros plásticos de vida útil limitada, e a constante necessidade de energia da rede elétrica, resultando em uma pegada de carbono elevada e um complexo problema de descarte de resíduos tóxicos no final de seu ciclo de vida.

Em contraste, os protótipos desenvolvidos, baseados em bioluminescência e bioeletroatividade, utilizam recursos biológicos renováveis, eliminando ou minimizando a dependência de metais pesados e reduzindo drasticamente a necessidade de insumos energéticos externos. A avaliação preliminar do ciclo de vida indica que a abordagem de biotecnologia marinha não só oferece uma solução de "energia verde" intrínseca, mas também apresenta um potencial para o desenvolvimento de sistemas intrinsecamente mais seguros e passíveis de biodegradação controlada após o uso, reforçando a premissa de que a inovação biotecnológica, focada na biodiversidade marinha, é o caminho para o desenvolvimento de infraestruturas rodoviárias verdadeiramente sustentáveis.

O diferencial do projeto reside no uso da vasta e protegida biodiversidade do BANCO REGENERA. Gerando uma fonte de matéria-prima única e renovável, alinhando o projeto aos mais altos padrões de ESG (Ambiental, Social e Governança) e fortalecendo o pioneirismo nacional.

5.2. Produtos Gerados

Os produtos gerados no desenvolvimento deste projeto, incluem: 03 relatório parciais e 01 relatório final; versão digital dos projetos de protótipo Bioluminescente e Bioeletroatividade, após teste e validação em campo dos protótipos físicos desenvolvidos, bem como as informações necessárias a sua construção; submissão de dois artigos científicos para publicação de registro de novas espécies (*Aliivibrio regenerae*

sp. nov. e *Shewanella regenerae* sp. nov.) e uma nota técnica do escalonamento da bactéria bioluminescente. Além disso, o presente projeto ainda pode originar o depósito de patentes no futuro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEBLAWY, S. et al. Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. **Mol Microbiol**, v. 109, n. 5, p. 571-583, 2018. DOI: 10.1111/mmi.14067.

BRETSCHGER, O. et al. Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 in a microbial fuel cell. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 7, p. 2217-2224, 2007.

BRODL, E.; WINKLER, A.; MACHEROUX, P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 16, p. 551-564, 2018. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.11.003.

CHIA, N. et al. Optogenetic tools for microbial synthetic biology. **Biotechnol Adv**, v. 59, 107953, 2022. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.107953.

COSTA, N. L. et al. Electron transfer process in microbial electrochemical technologies: The role of cell-surface exposed conductive proteins. **Bioresour Technol**, v. 255, p. 308-317, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.01.133.

ESCHER, A.; O'KANE, D. J.; LEE, J.; SZALAY, A. A. Bacterial luciferase alpha beta fusion protein is fully active as a monomer and highly sensitive in vivo to elevated temperature. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 17, p. 6528-6532, 1989.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, p. 25-41, 2009.

FREDRICKSON, J. K. et al. The genome sequence of *Shewanella oneidensis* MR-1 and its potential for bioremediation. **J Bacteriol**, v. 184, n. 18, p. 5074-5082, 2002.

HAU, H. H.; GRALNICK, J. A. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. **Annu Rev Microbiol**, v. 61, p. 237-258, 2007.

HERRING, P. J. Bioluminescence of marine organisms. **Nature**, v. 267, n. 5614, p. 788-793, 1977.

JORDAN, J. B. et al. Cellular Pre-Adaptation to the High O₂ Concentration Used in Standard Cell Culture Confers Resistance to Subsequent H₂O₂-Induced Cell Death. **Antioxidants (Basel)**, v. 13, n. 3, p. 269, 2024.

JOSE, N.; VELRAJAN, M.; GANESH, K. Preliminary Study to Exploit Bioenergy from Luminescent Bacteria. **SSRN Electronic Journal**, 2021.

- KASAI, T. et al. Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes *omcA* and *mtrC* in *Shewanella oneidensis* MR-1. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 21, p. 1-68, 2015. DOI: 10.1186/s12866-015-0406-8.
- LAWAN, N. et al. QM/MM Molecular Modeling Reveals Mechanism Insights into Flavin Peroxide Formation in Bacterial Luciferase. **J Chem Inf Model**, v. 62, n. 2, p. 399-411, 2022. DOI: 10.1021/acs.jcim.1c01187.
- LEE, J.; MÜLLER, F.; VISSER, A. J. W. G. The Sensitized Bioluminescence Mechanism of Bacterial Luciferase. **Photochem Photobiol**, v. 95, n. 1, p. 195-207, 2019.
- LIU, X.; SHI, L.; GU, J. D. Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron transfer. **Biotechnol Adv**, v. 36, n. 7, p. 1815-1827, 2018. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.07.001.
- LOGAN, B. E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 375-381, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2113.
- MÜLLER, J.; SHUKLA, S.; JOST, K. A.; SPORMANN, A. M. The *mxl* operon in *Shewanella oneidensis* MR-1 is induced in response to starvation and regulated by ArcS/ArcA and BarA/UvrY. **BMC Microbiol**, v. 13, n. 119, 2013. DOI: 10.1186/1471-2180-13-119.
- MYERS, J. M. et al. Extracellular respiration in *Shewanella oneidensis*: metal reduction and microbial fuel cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 84, n. 2, p. 243-248, 2003.
- NG, I-S. et al. Turn on the Mtr pathway genes under pLacI promoter in *Shewanella oneidensis* MR-1. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2018.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.
- SECO, E. M.; FERNÁNDEZ, L. A. Efficient markerless integration of genes in the chromosome of probiotic *E. coli* Nissle 1917 by bacterial conjugation. **Microbial biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1374-1391, 2022. DOI: 10.1111/1751-7915.13967.
- SYED, A. J.; ANDERSON, J. C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. **Chem. Soc. Rev.**, v. 50, n. 10, p. 5668-5705, 2021.
- TANET, L. et al. Bacterial Bioluminescence: Light Emission in *Photobacterium phosphoreum* Is Not Under Quorum-Sensing Control. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 365, 2019.
- TANG, Y. et al. Anaerobic Central Metabolic Pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 Reinterpreted in the Light of Isotopic Metabolite Labeling. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 894-901, 2007.

VANNIER, T. et al. Diversity and evolution of bacterial bioluminescence genes in the global ocean.

NAR Genom Bioinform, v. 2, n. 2, lqaa018, 2020. DOI: 10.1093/nargab/lqaa018.

ZARUBIN, M.; SHAKULOV, R. S. Mechanisms and Origin of Bacterial Bioluminescence. **Mol Biol**,

v. 52, n. 6, p. 812–822, 2018. DOI: 10.1134/S0026893318060183.

ZARUBIN, M. et al. Bacterial bioluminescence as a lure for marine zooplankton and fish. **Proceedings**

Of The National Academy Of Sciences, v. 109, n. 3, p. 853-857, 2012.

ZHAO, J-S. et al. *Shewanella* spp. Genomic Evolution for a Cold Marine Lifestyle and In-Situ

Explosive Biodegradation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, e9109, 2010.

7. ANEXOS

7.1. Relatório Resumo de Atividades

7.2. Cadastro de Bens Adquiridos

7.3. Relação de Trabalhos Submetidos para Publicação

Porto Alegre/RS, 21 de novembro de 2025.

Assinado por:

Mathews Fernandes

0B0BDCBBE6D464...

CONCESSIONÁRIA ECOVIAS CERRADO S.A

Assinado por:

Mario Prota

057BD2EBFC54478...

REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A

**ANTT – Agência Nacional de Transportes Terrestres
RDT – Recurso de Desenvolvimento Tecnológico**

RELATÓRIO RESUMO DE ATIVIDADES
Período de abrangência do Relatório: 01/05/2025 a 31/10/2025

**ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA SUSTENTÁVEL PARA
APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE SINALIZAÇÃO DE RODOVIAS – FASE II**

Concessionária Ecovias do Cerrado S.A.



SUMÁRIO

1. RESUMO	3
2. ATIVIDADES PREVISTAS PARA O PERÍODO	3
3. ATIVIDADES EXECUTADAS NO PERÍODO	4
4. JUSTIFICATIVAS	4
5. RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	4
6. QUADRO RESUMO - ATIVIDADES PREVISTAS X DESENVOLVIDAS	42
7. ANEXOS	43
7.1. Cronograma Físico-Financeiro	43
7.2. Relatório bolsista	43

1. RESUMO

O projeto visa desenvolver um sistema de sinalização sustentável a partir de microrganismos marinhos capazes de serem aplicados em elementos de sinalização em rodovias, pelas abordagens bioluminescência e bioeletroatividade. O presente relatório-resumo apresenta o *status* das atividades realizadas entre os dias 1/05/2025 a 31/10/2025, nas quais mantiveram em sua totalidade o cronograma de execução previamente proposto.

2. ATIVIDADES PREVISTAS PARA O PERÍODO

Abaixo estão listadas as atividades previstas para o período:

- 1) Mão de obra do projeto
 - a) Bolsista nível doutorando
 - b) Mão de obra especializada Regenera
- 2) Ensaios Bioluminescência
 - a) Validação
 - b) Formulação
 - c) Desenvolvimento do protótipo
 - d) Análise dos resultados obtidos
- 3) Ensaios Bioeletroatividade
 - a) Otimização
 - b) Desenvolvimento do protótipo
 - c) Análise dos resultados obtidos

3. ATIVIDADES EXECUTADAS NO PERÍODO

Abaixo estão listadas as atividades executadas no período:

- 1) Mão de obra do projeto
 - a) Bolsista nível doutorando
 - b) Mão de obra especializada Regenera
- 2) Ensaio Bioluminescência
 - a) Validação
 - b) Formulação
 - c) Desenvolvimento do protótipo
 - d) Análise dos resultados obtidos
- 3) Ensaio Bioeletroatividade
 - a) Otimização
 - b) Desenvolvimento do protótipo
 - c) Análise dos resultados obtidos

4. JUSTIFICATIVAS

Todas as atividades previstas foram executadas de acordo com o cronograma físico.

5. RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de vigência do presente relatório, foram realizados diversos ensaios de validação, formulação e otimização, visando o desenvolvimento de protótipos sustentáveis de sinalização (rodovias e/ou EPIs) a partir de microrganismos marinhos para teste em ambiente relevante, em duas abordagens: Bioluminescência e Bioeletroatividade. Os protótipos de bioluminescência, construídos a partir da atividade do microrganismo selecionado (1485), se mostraram perceptíveis a uma distância de até 15 metros, validando o conceito em ambiente relevante. Na abordagem de Bioeletroatividade, foi desenvolvido o protótipo, um sistema de geração de energia com eletrodos de alumínio e carbono, que alimenta um sinalizador, utilizando o microrganismo selecionado (848). Este sistema demonstrou potencial, sendo detectável por veículos e pedestres a uma distância de até 40 metros. Os resultados demonstram

a viabilidade técnica e a alta sustentabilidade das abordagens, uma vez que utilizam recursos biológicos renováveis, contrastando com a alta pegada de carbono e o descarte de resíduos tóxicos das tecnologias de iluminação convencionais. Estes resultados posicionam a REGENERA/ECOVIAS CERRADO/ANTT como líderes absolutos em inovação verde para infraestrutura em bioeletroatividade e bioluminescência para sinalização de rodovias. Durante o período de vigência do presente relatório não ocorreram atividades de capacitação, participação em seminários, congressos e visitas técnicas., nem aquisição de equipamentos.

Etapa 01: Bioluminescência

Validação

Para validar os resultados obtidos até o momento, foram avaliados diferentes faixas de parâmetros ambientais (meios de cultivo, temperatura, pH, salinidade) e, posteriormente, testados de forma integrada de forma estática e sob agitação (180 rpm).

As faixas de concentração de NaCl para crescimento foram determinadas em meio TS suplementado com NaCl em concentrações variando de 0% a 12% (0, 0,5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12%). O crescimento em diferentes temperaturas (4, 10, 20, 30, 37, 45, 60°C) e níveis de pH tamponado (4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10) foi determinado em meio MD. Os ensaios apresentaram densidade óptica inicial de 0,05 a 600 nm e foram incubados com agitação (180 rpm) a 30°C. A biomassa (OD_{600nm}) e a emissão de luz (LUM) foram estimadas em 6h, 24h, 48h, 72h e 168h usando um espectrofotômetro. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 1. Crescimento (Biomassa_{600 nm}) e emissão de luz (Lum) da bactéria 1485 (180 rpm, 30 °C) expostos a diferentes meios de cultura, concentrações de NaCl, temperaturas (°C) e níveis de pH.

Meio de Cultura	Biomassa			Luminescência		
	Mínimo	Máximo	Nédia	Mínimo	Máximo	Média
MD	0,270	0,863	0,634	207	12058	5567
BO1485	0,787	1,073	0,914	603	33847	14925
TS	0,104	0,663	0,2635	3	47530	7740

NaCl (%)	Biomassa			Luminescência		
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
0	0,137	0,663	0,271	3	2195	443



0,5	0,369	0,826	0,580	2	2200	456
2	0,601	0,953	0,793	411	10486	6083
3	0,601	1,141	0,974	780	59440	14263
4	0,419	0,904	0,688	2	8231	4258
6	0,277	0,415	0,283	12	5851	1691
8	1,161	1,213	0,353	2	43	10
9	0,069	0,135	0,081	2	65	11
10	0,07	0,134	0,082	2	41	9
11	0,065	0,127	0,081	2	52	11
12	0,061	0,133	0,081	3	83	14

Temperatura (°C)	Biomassa		Luminescência			
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
4	0,171	0,712	0,375	273979	940258	544166
10	0,270	0,653	0,510	193127	1212214	629521
20	0,417	0,905	0,716	43565	842167	293614
30	0,604	0,784	0,700	207	12058	5178
37	0,279	0,715	0,399	3	52	15
45	0,161	0,234	0,1816	4	6	4
60	0,151	0,230	0,176	2	8	5

pH	Biomassa		Luminescência			
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
4,5	0,092	0,155	0,110	2	30	9
5	0,414	0,544	0,475	1462	294863	65567
5,5	0,542	1,136	0,727	2475	327829	73354
6	0,699	0,879	0,799	4384	322808	73429
6,5	1,187	1,303	1,244	6522	420324	90345
7	1,216	1,438	1,3222	1537	298674	68017
7,5	1,185	1,439	1,323	1472	373805	84112
8	1,128	1,574	1,446	4953	378799	95969
8,5	0,590	0,793	0,680	62	400265	102449
9	0,618	0,820	0,705	3	716271	160225
9,5	0,636	0,893	0,760	185	733411	148143
10	0,754	0,945	0,845	124	632072	127419

A cepa bacteriana cresceu melhor em BO1485, seguido por MD e TS. Para emissão de luz por luminescência, o meio BO1485 foi mais eficaz, validando o DoE. O 1485 foi capaz de crescer em concentrações de NaCl variando de 0 a 8%, com uma concentração ótima para crescimento entre 0,5 a 4%. Por outro lado, para emissão de luz, a concentração ótima de NaCl foi de 3%. A bactéria foi capaz de crescer em temperaturas de 4 a 37 °C, com crescimento ótimo ocorrendo em 20 °C e 30 °C. No entanto, para emissão de luz, as temperaturas ótimas estavam entre 4 °C e 10 °C. A cepa também cresceu em níveis de pH de 5 a 10, com crescimento ótimo em pH 6,5 a 8. Para emissão de luz, não foram observadas diferenças no pH de 5 a 10.

Para avaliar a emissão de luz da bactéria 1485 em diferentes parâmetros de composição, com base nos resultados dos parâmetros individuais, um ensaio foi realizado em dois meios de cultura, MD e BO1485. As culturas foram expostas a condições estáticas (0 rpm) e agitadas (180 rpm) em pH 6,5 ou 9 a 10°C. N-acetil-D-glucosamina (NAG) foi adicionada no tempo 0 (300 µL 15 mL⁻¹) – substrato de carbono previamente avaliado em Biolog EcoPlate, representando as condições ideais de crescimento com base em resultados anteriores. O ensaio durou 100 dias, com análises de biomassa e luminescência (em tubo Falcon de 50 mL contendo 15 mL de inóculo). A OD₆₀₀ inicial foi de 0,05 e o ensaio teve duração de 100 dias.

O meio BO1485 apresentou efeito significativo na luminescência a longo prazo, enquanto o MD parece estimular a emissão de luz de forma mais significativa na primeira semana. O mesmo foi observado para a biomassa. Em relação ao pH, entre 48h e 7 dias, o pH 9 parece estimular mais a luminescência. A partir de 14 dias, seu estímulo é semelhante ao pH 6,5. No entanto, um pH mais ácido permitiu que a luminescência fosse mantida até 100 dias. Para a biomassa, o pH 6,5 foi mais positivo, exceto no último momento de amostragem. Em relação ao tipo de incubação, maior luminescência foi registrada para culturas agitadas nas primeiras 48h. No entanto, após esse período, observou-se que culturas estáticas beneficiam a emissão de luz. Sua biomassa, no entanto, se beneficia da agitação.

Formulação

Para avaliar a capacidade do microrganismos 1485 em sobreviver a diferentes ingredientes de uma formulação, foi realizado um teste de toxicidade com os seguintes potenciais ingredientes: glicerol (confere aumento de flexibilidade, Tween 80 (confere aumento de adesão),

óleo de soja (confere barreira contra a água), cloreto de cálcio (confere firmeza e barreira contra a água), goma xantana, alginato e siliconte (utilizado como base – reduz a perda de água). O ensaio foi realizado em placas multipoços contendo diferentes concentrações dos ingredientes, sendo avaliada a bioluminescência após 72h de exposição.

Todos os ingredientes em pelo menos quatro concentrações apresentaram resultados seguros para aplicação em formulação bioluminescente. No entanto, a base alginato foi a que apresentou resultados mais significativos de incremento de bioluminescência, auxiliando na intensidade luminosa do microrganismo.

Foi avaliada a capacidade do microrganismo em sobreviver ao contato com o asfalto com e sem formulação, sendo verificado que o substrato é tóxico, independentemente dos ingredientes utilizados para minimizar o contato. A bioluminescência é inativada, quase que instantaneamente ao contato. Desta forma, a formulação deve ser isolada do contato com o asfalto.

Com base nos resultados obtidos e nos protótipos idealizados, foram desenvolvidas duas opções de formulação:

a. Ingredientes: BO1485 + CaCl₂ 2% + Alginato 3,5% + Água do Mar + Microrganismo 1485

Tipo de Formulação: Esferas

Processo: uma base contendo o meio BO1485 + Alginato 3,5% é preparada em plataforma magnética agitadora aquecida (30°C). Após completa homogeneização e dissolução do alginato, resfria-se a formulação para adição dos microrganismos na concentração $>1 \times 10^6$ em fótons para obter uma concentração final $>1 \times 10^5$ em fótons (10% de inóculo em relação à formulação). Posteriormente, pipeta-se com auxílio de uma agulha a formulação em solução de CaCl₂ 2% diluído em H₂O do mar sob agitação, para a formação de microesferas bioluminescentes (Figura 1).

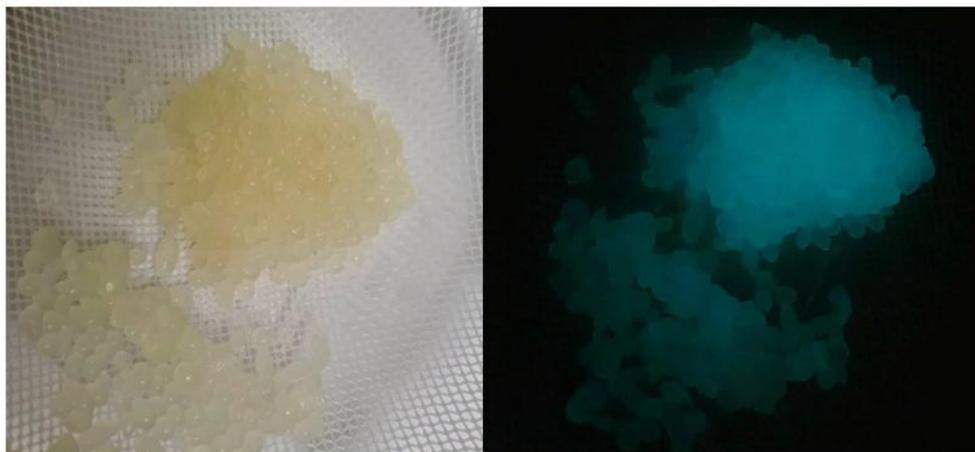


Figura 1. Formulação bioluminescente com o microrganismos 1485 por meio de processo de esferificação.

b. Ingredientes: BO1485 + NAG + Alginato 3,5% + Microrganismo 1485

Tipo de Formulação: Líquida

Processo: Produção em reator do microrganismo em meio BO1485 (inóculo inicial 0,05) por 6 horas (pH 6,5, temperatura 10°C, com oxigenação, estático), adição de Alginato 3,5% (30% do volume total do reator) + NAG (1mL 50mL⁻¹). Após 2h a formulação está pronta (Figura 2).

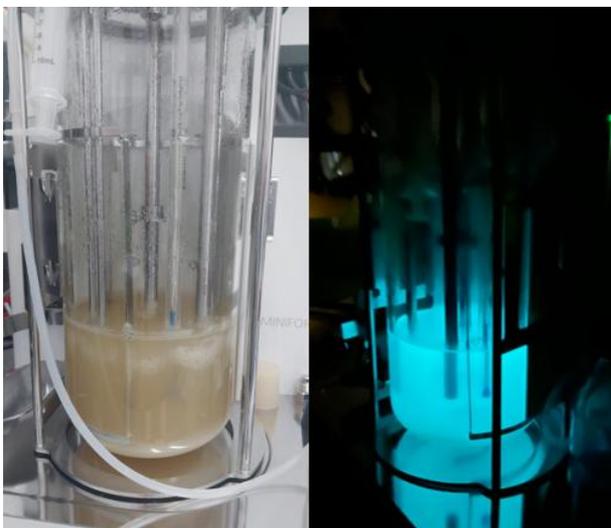


Figura 2. Formulação bioluminescente com o microrganismos 1485 por meio de processo em reator.

Desenvolvimento do protótipo

Os protótipos bioluminescentes desenvolvidos se basearam na aplicação das formulações

(esferas e líquida). O objetivo foi a validação em ambiente relevante (TRL 5) do potencial de aplicação na sinalização de rodovias e EPIs. Para tal, foram projetados dois protótipos para cada formulação, para a sinalização de rodovias e sinalização de EPI em dois testes em campo.

Identificação dos Protótipos – Teste 1: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)

Descrição do Protótipo: O protótipo PBOL001r emprega duas mangueiras caneladas de 3,20 metros de comprimento para a demarcação de acostamentos e faixas. A formulação inovadora consiste em bactérias bioluminescentes encapsuladas em esferas de alginato de sódio (3,5%) com nutriente (Peptona Bacteriológica) e sal (H₂O do mar), as quais são depositadas nas canaletas das mangueiras. Este design oferece uma solução inovadora e potencialmente autoiluminada para a sinalização de segurança viária. O protótipo PBOL001e é um capacete de EPI com a formulação de esferas inserida na frente capacidade em fita transparente e maleável (Figura 3). Abaixo uma imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL001r e PBOL001e (Figura 4).



Figura 3. Componentes utilizados para a construção dos protótipos bioluminescentes com formulação composta por esferas de alginato de sódio (imagens acima) e pelos sistemas escolhidos para a inserção da formulação PBOL001r (embaixo a esquerda) e PBOL001e (embaixo a direita).

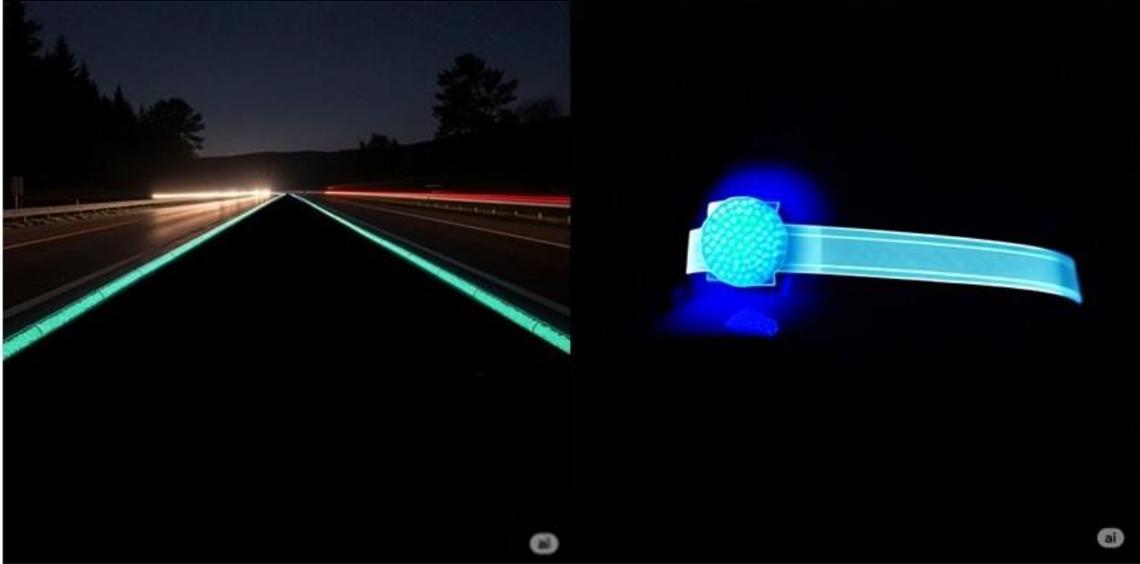


Figura 4. Imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL001r (esquerda) e PBOL001e (direita).

Identificação dos Protótipos – Teste 2: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

Descrição do Protótipo: O protótipo PBOL002r é sistema emprega duas mangueiras transparentes de 20 mm internos de 10 metros de comprimento para a demarcação de acostamentos e faixas. A formulação inovadora consiste em bactérias bioluminescentes em meio viscoso (27% de alginato de sódio a 3,5%), composto por nutrientes (Peptona bacteriológica) e sal (H₂O do mar), sendo a produção realizada em biorreator. Este design oferece uma solução inovadora e potencialmente autoiluminada para a sinalização de segurança viária. O protótipo PBOL002e é um capacete de EPI com a formulação inserida em 50% da capacidade de mangueira transparente e maleável de 1 cm de diâmetro (Figura 5). Abaixo uma imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL002r e PBOL002e (Figura 6).



Figura 5. Componentes utilizados para a construção dos protótipos bioluminescentes com formulação viscosa (imagens acima) e pelos sistemas escolhidos para a inserção da formulação PBOL002r (embaixo a esquerda) e PBOL002e (embaixo a direita).



Figura 6. Imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para os protótipos PBOL002r (esquerda) e PBOL002e (direita).

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 01

ID: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)



MICRORGANISMO: 1485

DATA DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 22/07/2025

HORÁRIO DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 19h00

Local Exato do Teste:

Campus do Vale – UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil - 30°03'59.6"S 51°07'21.7"W

Tipo de via: Chão batido

Condições da Via:

Seca

Úmida (X)

Molhada

Poças

Nível de Iluminação Natural: 1 (lua)

Temperatura Ambiente (°C): 14,1

Umidade Relativa do Ar: 86%

Condição do Céu:

Ensolarado

Noturno (X)

Nublado (X)

Chuvoso

Garoa

Neblina

Temporal

Velocidade do Vento: 6Km/h

Descrição do Tempo: Dia de sol com algumas nuvens e névoa ao amanhecer. Noite com poucas nuvens. Temperatura entre 9 e 22°C, sem chuva. Vento com direção NNW, umidade do ar entre 69 e 97%.

Tempo para Instalação do Protótipo em Campo: 30 min

Tempo do Teste em Campo: 60 min

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 02

ID: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

MICRORGANISMO: 1485

DATA DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 14/08/2025

HORÁRIO DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 19h30

Local Exato do Teste:

Campus do Vale – UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil - 30°03'59.6"S 51°07'21.7"W

Tipo de via: Chão batido

Condições da Via:

Seca

Úmida (X)

Molhada

Poças

Nível de Iluminação Natural: 1 (lua)

Temperatura Ambiente (°C): 9,4

Umidade Relativa do Ar: 76%

Condição do Céu:

Ensolarado

Noturno (X)

Nublado (X)

Chuvoso

Garoa

Neblina

Temporal

Velocidade do Vento: 10Km/h

Descrição do Tempo: Dia de sol com muitas nuvens durante o dia. Noite com muitas nuvens.

Temperatura entre 10 e 15°C, com 40% de probabilidade de chuva (3 mm). Vento com direção S, umidade do ar entre 66 e 90%.

Tempo para Instalação do Protótipo em Campo: 10 min

Tempo do Teste em Campo: 60 min

Análise dos resultados obtidos

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 01

Identificação do Protótipo: PBOL001r (rodovia) e PBOL001e (EPI)

Estabilidade da Sinalização (Luminosidade/Intensidade ao Longo do Tempo): Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve estabilidade da luminosidade e intensidade. No entanto, como já é conhecida a degradação, com o tempo deverá haver perda da intensidade luminosa produzida.

Gradação da Intensidade Luminosa: A intensidade da luz varia ao longo do tempo, demonstrando degradação. No entanto, há um incremento na bioluminescência entre 1 e 6 dias, sendo inversamente proporcional à biomassa. A durabilidade da luminosidade está diretamente relacionada ao consumo de nutrientes/substrato e a concentração de oxigênio dissolvido.

Consumo de Nutrientes/Substrato: O protótipo depende de substrato para a produção de luz. Este substrato é consumido com o tempo e também sofre variação de pH a partir do metabolismo dos microrganismos, o que pode levar a perda de bioluminescência, mesmo com a quantidade de nutrientes disponível. Para o microrganismo em questão, ele tolera bem a maioria dos pH, no entanto a sua maior produção de bioluminescência ocorre nos pH 9 e 6,5.

Tempo Gasto na Instalação do Protótipo: Entre o repique e produção das esferas para construção do protótipo foram registradas 32 horas. Para produção de 2L de esferas foram necessárias 7 horas. Para instalação no local, 30 minutos.

Recursos Necessários para Instalação: Para instalação foi necessária mangueiras caneladas, esferas produzidas, espátulas, pregos e martelo. Duas pessoas participaram na instalação.

Observações sobre a Facilidade de Manutenção: Não apresentou facilidade de limpeza para reaproveitamento das mangueiras, o que dificultaria um recarregamento, já que as esferas degradadas deverão ser removidas para adição de novas esferas, devendo ter componentes prontos montados para substituição ágil.

Estimativa de tempo entre manutenções: Com o protótipo atual, a cada 2 dias.

Uniformidade da Sinalização: Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve uniformidade da sinalização.

Percepção Visual por Pedestres

Número de Observadores: 2

Pedestres Observadores: Graziela Rigo, Rafael Castro

Distância Mínima de Detecção Visual: 0 m

Distância Máxima de Detecção Visual: 15 m

Clareza da Sinalização: A sinalização é nítida e os limites são bem definidos.

Ofuscamento: Os pedestres observadores não se sentiram ofuscados pela própria sinalização em ocorrência de faróis de veículos acionados.

Percepção de Cor e Forma:

Houve percepção de cor (azul esverdeado) e forma (linha) do sinalizador pelos pedestres observadores.

Feedback Subjetivo do Pedestre:

Rafael Castro - *A sinalização, no escuro, pôde ser identificada facilmente durante o percurso na via. O brilho é confortável à visão, facilitando o deslocamento no período noturno. Com 15 metros de proximidade, já é claramente identificável que a via está sinalizada.*

Graziela Rigo - *Ao observar o protótipo com bactérias bioluminescentes, notei que a luz gerada foi suficiente para tornar o trajeto visível, inclusive permitindo a visualização de elementos ao redor. A tonalidade da luz era suave, não causou ofuscamento e proporcionou uma experiência visual confortável.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Simulação de Detecção por Veículo

Motorista e Carona Observadores: Vanessa Agostini – Motorista, Rafael Castro – Carona

Distância Máxima de Detecção por Veículo: 15 m

Condição do Veículo: parado

Ofuscamento pelos Faróis do Veículo: Não é possível identificar a emissão de luz com o uso de faróis ou lanterna. A bioluminescência só é detectada em total escuridão.

Farol baixo – não houve ofuscamento – 10 m

Farol alto – não houve ofuscamento – 10 m

Lanterna – não houve ofuscamento – 10 m

Distância de Detecção de Objeto/Pedestre: A sinalização não permite a identificação de objetos ou pedestres próximos a uma distância de 10 m

Distância de Reconhecimento: 3 m

Feedback Subjetivo do Motorista e Carona:

Vanessa Agostini - *De dentro do carro, a sinalização é nítida de coloração esverdeada em com contraste com o pavimento. Não foi causado desconforto ou ofuscamento. É necessário o breu total para que a bioluminescência seja perceptível ao motorista.*

Rafael Castro - *De dentro do carro, a sinalização da faixa é eficiente em situações em que não há qualquer outro tipo de iluminação, sendo prontamente visualizada, sem qualquer desconforto ou ofuscamento. Na presença de outras luzes, a sinalização não se destaca.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Avaliação Qualitativa da Poluição Visual: 1

Registros realizados em campo: Figuras 7, 8, 9



Figura 7. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL001r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno.

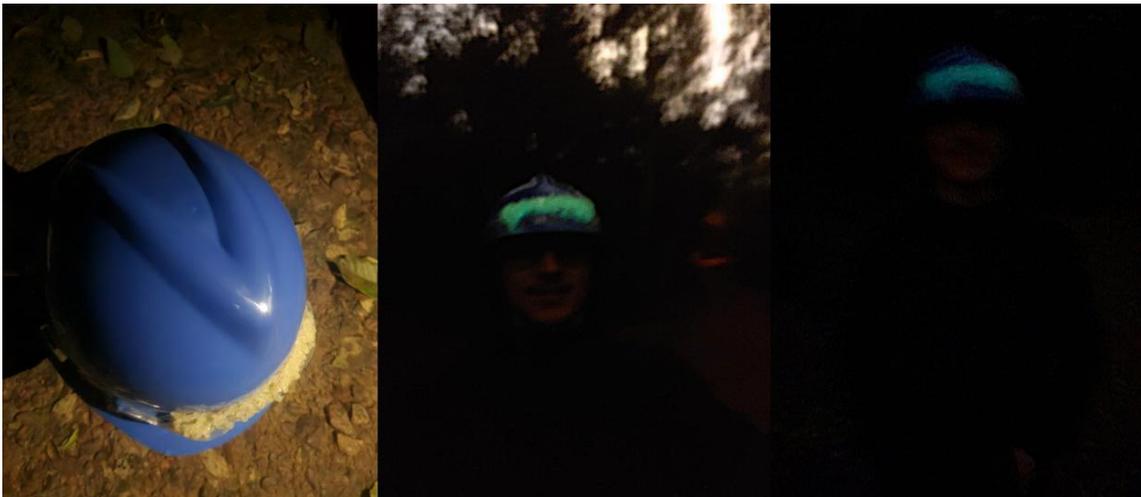


Figura 8. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL001e em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Foto do centro e da direita: protótipo em ambiente noturno.



Figura 9. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL001r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente noturno com lanterna de veículo acesa. Foto do centro: protótipo em ambiente noturno com farol baixo de veículo aceso. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno com farol alto de veículo aceso.

Apesar da fácil instalação do modelo testado, a sua manutenção parece dispendiosa (tanto para rodovia, quanto para o EPI), devido a necessidade de troca geral dos componentes e ao não reaproveitamento dos mesmos. Além disso, a produção de esferas se tornaria onerosa para uso em larga escala. Sugere-se o teste com mangueiras fechadas e com uma formulação líquida viscosa em constante circuito como alternativa, saindo e um local fixo de abastecimento (e.g., estação ou central de abastecimento).

PROTÓTIPO BIOLUMINESCÊNCIA – TESTE DE CAMPO 02

Identificação do Protótipo: PBOL002r (rodovia) e PBOL002e (EPI)

Estabilidade da Sinalização (Luminosidade/Intensidade ao Longo do Tempo): Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve estabilidade da luminosidade e intensidade. No entanto, como já é conhecida a degradação, com o tempo deverá haver perda da intensidade luminosa produzida.

Gradação da Intensidade Luminosa: A intensidade da luz varia ao longo do tempo, demonstrando degradação. No entanto, há um incremento na bioluminescência entre 1 e 6 dias,

sendo inversamente proporcional à biomassa. A durabilidade da luminosidade está diretamente relacionada ao consumo de nutrientes/substrato e a concentração de oxigênio dissolvido.

Consumo de Nutrientes/Substrato: O protótipo depende de substrato para a produção de luz. Este substrato é consumido com o tempo e também sofre variação de pH a partir do metabolismo dos microrganismos, o que pode levar a perda de bioluminescência, mesmo com a quantidade de nutrientes disponível. Para o microrganismo em questão, ele tolera bem a maioria dos pH, no entanto a sua maior produção de bioluminescência ocorre nos pH 9 e 6,5.

Tempo Gasto na Instalação do Protótipo: Entre o repique e produção em reator para construção do protótipo foram registradas 72 horas (7 L). No entanto, foi verificado que é possível diminuir esse tempo para 30h.

Recursos Necessários para Instalação: Para instalação foi necessárias mangueiras transparentes preenchidas com a formulação. Duas pessoas participaram na instalação.

Observações sobre a Facilidade de Manutenção: Apresentou facilidade de limpeza para reaproveitamento das mangueiras.

Estimativa de tempo entre manutenções: Em fluxo contínuo, não seriam necessárias manutenções frequentes, somente em caso de rompimento das mangueiras.

Uniformidade da Sinalização: Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve uniformidade da sinalização, desde que a formulação fosse oxigenada, por isso a necessidade de fluxo contínuo.

Percepção Visual por Pedestres

Número de Observadores: 3

Pedestres Observadores: Bryan Tavares, Jéssica Scherer, Gabriel Stracke

Distância Mínima de Detecção Visual: 0 m

Distância Máxima de Detecção Visual: 25 m

Clareza da Sinalização: A sinalização é nítida e os limites são bem definidos.

Ofuscamento: Os pedestres observadores não se sentiram ofuscados pela própria sinalização em ocorrência de faróis de veículos acionados.

Percepção de Cor e Forma:

Houve percepção de cor (azul esverdeado) e forma (linha) do sinalizador pelos pedestres observadores.

Feedback Subjetivo do Pedestre:

Jéssica Scherer - *A sinalização bioluminescente proporcionou excelente visibilidade no escuro, demarcando o trajeto de forma eficaz, bem como, o EPI utilizado no protótipo. A tonalidade verde-azulada oferece um efeito visual confortável, sendo claramente perceptível a cerca de 15 metros de distância.*

Bryan Tavares - *A sinalização bioluminescente era imperceptível sob a luz natural do dia, mas, à medida que a claridade diminuía, tornava-se progressivamente mais evidente. No ambiente escuro, a via pôde ser identificada com facilidade graças às faixas bioluminescentes, que emitiam um brilho azul suave delineando com precisão seu contorno. Tanto as faixas quanto o capacete com sinalizações bioluminescentes permaneceram visíveis mesmo a distâncias superiores a 15 metros, um alcance em que, normalmente, o olho humano não distinguiria nada além da escuridão absoluta.*

Gabriel Oliveira - *Durante a noite, a sinalização tem um brilho agradável aos olhos, que permite a fácil identificação das marcações e ao mesmo tempo não ofusca a visão da estrada, evitando assim, possíveis acidentes de trânsito.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Simulação de Detecção por Veículo

Motorista e Carona Observadores: Vanessa Agostini – Motorista, Rafael Castro - Carona

Distância Máxima de Detecção por Veículo: 25 m

Condição do Veículo: parado

Ofuscamento pelos Faróis do Veículo: Não é possível identificar a emissão de luz com o uso de faróis ou lanterna. A bioluminescência só é detectada em total escuridão.

Farol baixo – não houve ofuscamento – 15 m

Farol alto – não houve ofuscamento – 15 m

Lanterna – não houve ofuscamento – 15 m

Distância de Detecção de Objeto/Pedestre: A sinalização não permite a identificação de objetos ou pedestres próximos a uma distância de 15 m

Distância de Reconhecimento: 5 m

Feedback Subjetivo do Motorista:

Vanessa Agostini - *De dentro do carro, a sinalização é nítida de coloração esverdeada com contraste com o pavimento. Não foi causado desconforto ou ofuscamento. É necessário o breu total para que a bioluminescência seja perceptível ao motorista.*

Rafael Castro - *De dentro do carro, a sinalização da faixa é eficiente em situações em que não há qualquer outro tipo de iluminação, sendo prontamente visualizada, sem qualquer desconforto ou ofuscamento. Na presença de outras luzes, a sinalização não se destaca.*

Luz Obstrutiva: Não há impacto geral da luz nas áreas circundantes, considerando o conforto visual e a perturbação.

Avaliação Qualitativa da Poluição Visual: 1

Registros realizados em campo: Figuras 10, 11, 12



Figura 10. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL002r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Fotos do centro e da direita: protótipo em ambiente noturno.



Figura 11. Imagens do protótipo de bioluminescência PBOL002e em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno.



Figura 12. Imagens do protótipo de bioeletroatividade PBOL002r em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente noturno com lanterna de veículo acesa. Foto do centro: protótipo em ambiente noturno com farol baixo de veículo aceso. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno com farol alto de veículo aceso.

Etapa 01: Bioeletroatividade

Otimização

Foi realizado um Planejamento Experimental (DoE) para otimizar a produção de energia pela bactéria 848. Para tal, foram selecionadas três variáveis independentes. O DoE foi realizado pela metodologia DCCR (2^3+6pc) (Tabela 2, 3, 4). Para o registro de produção, foi utilizado o protótipo de CCM de laboratório apresentado anteriormente, com dois substratos de carbono (ânodo e cátodo), sendo a diferença de potencial ddP monitorada por multimêtro (BOM-6007-BOMVINK - mV).

Tabela 2. Variáveis avaliadas no Planejamento Experimental (DoE – 1) a fim de otimizar a atividade de bioeletroatividade do microrganismo 848.

Variáveis (g/L)	-1,68	-1	0	1	1,68
MD	0,0	14,3	27,0	39,7	66,7
Extrato de Levedura	0,0	0,8	2,0	3,2	8,0
NaCl	0,0	3,8	10,0	16,2	40,0

Tabela 3. Planejamento Experimental (DoE – 1) para a linhagem 848.

Ensaio	MD	Ext.	
		Lev.	NaCl
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Tabela 4. Planejamento Experimental (DoE – 1) para a linhagem 848 com detalhamento das concentrações (g/L) de cada variável para cada ensaio (tratamento).

Ensaio	MD	Ext.	
		Lev.	NaCl
1	14,3	0,8	3,8
2	39,7	0,8	3,8
3	14,3	3,2	3,8
4	39,7	3,2	3,8
5	14,3	0,8	16,2

6	39,7	0,8	16,2
7	14,3	3,2	16,2
8	39,7	3,2	16,2
9	0,0	2,0	10,0
10	66,7	2,0	10,0
11	27,0	0,0	10,0
12	27,0	8,0	10,0
13	27,0	2,0	0,0
14	27,0	2,0	40,0
15	27,0	2,0	10,0
16	27,0	2,0	10,0
17	27,0	2,0	10,0
18	27,0	2,0	10,0
19	27,0	2,0	10,0
20	27,0	2,0	10,0

O ensaio 8 (39,7 g L⁻¹ de MD, 3,2 g L⁻¹ Extrato de Levedura e 16,2 g L⁻¹ de NaCl) apresentou os resultados mais promissores com uma diferença de potencial ddP média 182 mV. O pico máximo de produção foi registrado entre 144h e 168h (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados do DoE – 1 para o microrganismo 848, sendo apresentado os valores de diferença de potencial ddP (mV) para cada ensaio (composição de diferentes variáveis) entre 1 e 9 dias.

Ensaio	24h	48h	72h	144h	168h	192h	216h
1	-36	-16	-17	-15	-8	-1	3
2	-1	5	5	4	7	10	13
3	-77	-122	-186	-122	-80	-31	22
4	-101	-255	-247	-133	-103	-76	-57
5	-27	-27	-39	-68	-64	-55	-47
6	-18	-11	-26	-22	-16	-12	-10
7	-77	-86	-97	-88	-80	-74	-69
8	-66	-68	-140	-270	-274	-221	-238
9	-22	-16	-32	-63	-65	-65	-62
10	-32	-25	-41	-64	-62	-60	-58
11	-35	-27	-49	-90	-93	-91	-90
12	-70	-58	-95	-120	-98	-77	-62
13	-74	-57	-67	-52	-38	-31	-28
14	-21	8	6	-6	-9	-13	-19
15	-49	-23	-25	-19	-16	-9	-3
16	-62	-55	-52	-42	-36	-26	-19
17	-64	-62	-67	-53	-44	-34	-23
18	-57	-22	-28	-30	-28	-26	-25
19	-61	-62	-100	-120	-110	-104	-98
20	-89	-57	-100	-120	-120	-210	-199

O meio selecionado é extremamente rico em sal, o que pode mascarar a produção de energia a partir do microrganismo. Segundo Hau & Gralnick (2007) muitos genes para transportadores de nutrientes dependentes de Na⁺ foram recrutados para usar o alto conteúdo de Na⁺ como fonte de energia para o gênero *Shewanella*, talvez por isso a preferência por meio salinos. Zhao et al. (2010) sugerem o meio TN para a produção do gênero *Shewanella*. Este gênero pode crescer anaerobicamente usando nitrato, dióxido de manganês (MnO₂), trimetilamina N-óxido (TMAO) e/ou dimetilsulfóxido (DMSO) comumente encontrados em ambientes de sedimentos marinhos, como aceitadores de elétrons terminais.

O teste comparando os três diferentes meios avaliou a biomassa e a diferença de potencial ddP ao longo do tempo (288h) em sistema com agitação (180 rpm) a 28°C, em duplicata.

O tratamento mais efetivo foi o TN, tanto para a produção de biomassa quanto para a produção de bioeletroatividade. Para validar os resultados obtidos até o momento, foram avaliados diferentes faixas de parâmetros ambientais (meios de cultivo, temperatura, pH, salinidade) e, posteriormente, testados de forma integrada de forma estática e sob agitação (180 rpm).

As faixas de concentração de NaCl para crescimento foram determinadas em meio TS suplementado com NaCl em concentrações variando de 0% a 12% (0, 0,5, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12%). O crescimento em diferentes temperaturas (4, 10, 20, 30, 37, 45, 60°C) e níveis de pH tamponado (4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10) foram determinados em meio MD. Os ensaios apresentaram densidade óptica inicial de 0,05 a 600 nm e foram incubados com agitação (180 rpm) a 30°C. A biomassa foi estimada em 6h, 24h, 48h, 72h e 168h utilizando um espectrofotômetro para medir a absorbância a 600 nm.

A cepa bacteriana cresceu melhor em meio TN, seguido por MD e TS. O 848 foi capaz de crescer em concentrações de NaCl variando de 0 a 12%, com uma concentração ótima para crescimento entre 2 e 8%. A bactéria foi capaz de crescer em temperaturas de 4 a 45 °C, com crescimento ótimo ocorrendo a 30 °C. A cepa também cresceu em níveis de pH de 4,5 a 10, com crescimento ótimo em pH de 6,5 a 8. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 6. Crescimento (Biomassa_{600 nm}) da bactéria 848 (180 rpm, 30 °C) exposta a diferentes meios de cultura, concentrações de NaCl, temperaturas (°C) e níveis de pH.

Meio	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
MD	0,329	0,888	0,698
TN	0,488	1,266	0,963
TS	0,208	0,869	0,590

NaCl (%)	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
0	0,208	0,869	0,590
0,5	0,330	0,997	0,769
2	0,303	1,163	0,822
3	0,205	1,248	0,830
4	0,179	1,085	0,824
6	0,136	1,174	0,885
8	0,121	1,216	0,859
9	0,118	1,171	0,721
10	1,156	1,228	0,710
11	0,073	1,307	0,690
12	0,073	1,616	0,600

Temperature (°C)	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
4	0,140	0,775	0,400
10	0,208	1,085	0,743
20	0,292	1,044	0,770
30	0,710	1,186	0,956
37	0,334	0,775	0,508
45	0,222	0,469	0,325
60	0,144	0,219	0,166

pH	Biomassa		
	Mínima	Máxima	Média
4,5	0,081	0,781	0,434
5	0,163	0,671	0,639
5,5	0,409	1,224	0,792
6	0,472	1,339	0,875
6,5	0,914	1,629	1,266
7	0,570	1,616	1,220
7,5	0,357	1,577	1,169
8	0,545	1,710	1,366
8,5	0,462	1,033	0,740
9	0,469	1,019	0,739
9,5	0,490	1,030	0,743
10	0,536	1,185	0,850

Para avaliar a bioeletroatividade da bactéria 848, foi realizado um ensaio em dois meios líquidos, MD e TN, com e sem adição de 3% de NaCl. As culturas foram expostas a condições estáticas (0 rpm) e agitadas (180 rpm) em pH 8 e 30°C, representando condições ótimas de crescimento com base em resultados anteriores. O ensaio durou 28 dias, com análises de OD₆₀₀ (em um tubo Falcon de 50 mL contendo um inóculo de 15 mL) e diferença de potencial ddP (em uma célula de combustível microbiana – CCM com um inóculo de 7 mL) realizadas em 0, 24, 48, 120, 168 horas e nos dias 14, 21 e 28. A densidade óptica foi medida usando um espectrofotômetro e a densidade de potência foi medida com um multímetro (BOM-6007-

BOMVINK). A OD inicial foi de 0,05 e o inóculo foi adicionado à CCM sem formação prévia de biofilme.

Foram observadas diferenças entre os fatores que mais afetaram positivamente a diferença de potencial (ddP) e a biomassa das bactérias 848. Para a ddP, apenas o fator tempo e a interação entre tempo e meio de cultura foram significativos. O meio TN apresentou ddP significativa entre 24 e 168 horas. O meio MD apresentou densidade de potência significativa entre 48 horas e 28 dias. Já o meio com adição de sal apresentou ddP significativa entre 48 horas e 28 dias (TN + 3% NaCl) e 120 horas e 14 dias (MD + 3% NaCl) (Figura 3). O TN foi o tratamento que atingiu ddP significativa mais rapidamente, enquanto a maior durabilidade foi registrada para os tratamentos MD e TN + 3% NaCl. O maior valor de ddP registrado foi observado para TN + 3% NaCl (250 mV).

Desta forma, o melhor meio de produção de energia para a bactéria 848 é meio TN + 30 gL⁻¹ de NaCl; pH 8,0, Tris 20 mM na presença de DMSO (1%), 30°C, podendo ser incrementado com o substrato L-Serina, previamente avaliado por Biolog Ecoplate para crescimento da bactéria.

Desenvolvimento do protótipo

Desenvolvimento de dispositivo microbiano para geração de energia a partir de eletroatividade de microrganismos. Nesta etapa, os microrganismos do BANCO REGENERA selecionados com eletroatividade foram preparados para implementação nos protótipos de escala de campo (sinalização). Dentre os parâmetros avaliados em campo, inclui-se: viabilidade do sistema, produção de energia, validação durante o dia, validação durante a noite, ofuscamento de faróis, distância de detecção por veículo, poluição visual, tempo entre manutenções, resistência a intempéries. A qualificação dos parâmetros será definida após o desenvolvimento do protótipo e teste em campo.

Com o intuito de melhorar o potencial operacional dos sistemas (diferença de potencial das células unitárias), foi proposto um sistema eletrodo de alumínio – eletrólito (ágar – solução contendo os inóculo) – eletrodo de carbono.

Considerando que o requisito principal exigido para funcionamento de um sinalizar comercial é uma bateria de 6V, é necessário a utilização de módulos contendo mais do que uma CCM unitária para atender essa demanda. Para tal, serão necessários 2 módulos com 4 células unitárias utilizando o sistema eletrodo de alumínio – eletrólito (ágar – solução contendo

os inóculo) – eletrodo de carbono. A seguir está descrito o projeto para confecção de um módulo.

O primeiro passo é a confecção da meia célula composta por eletrodo de alumínio envolto em ágar. Para isso foi utilizado um molde para produção dessa meia célula, conforme ilustra a Figura 13.

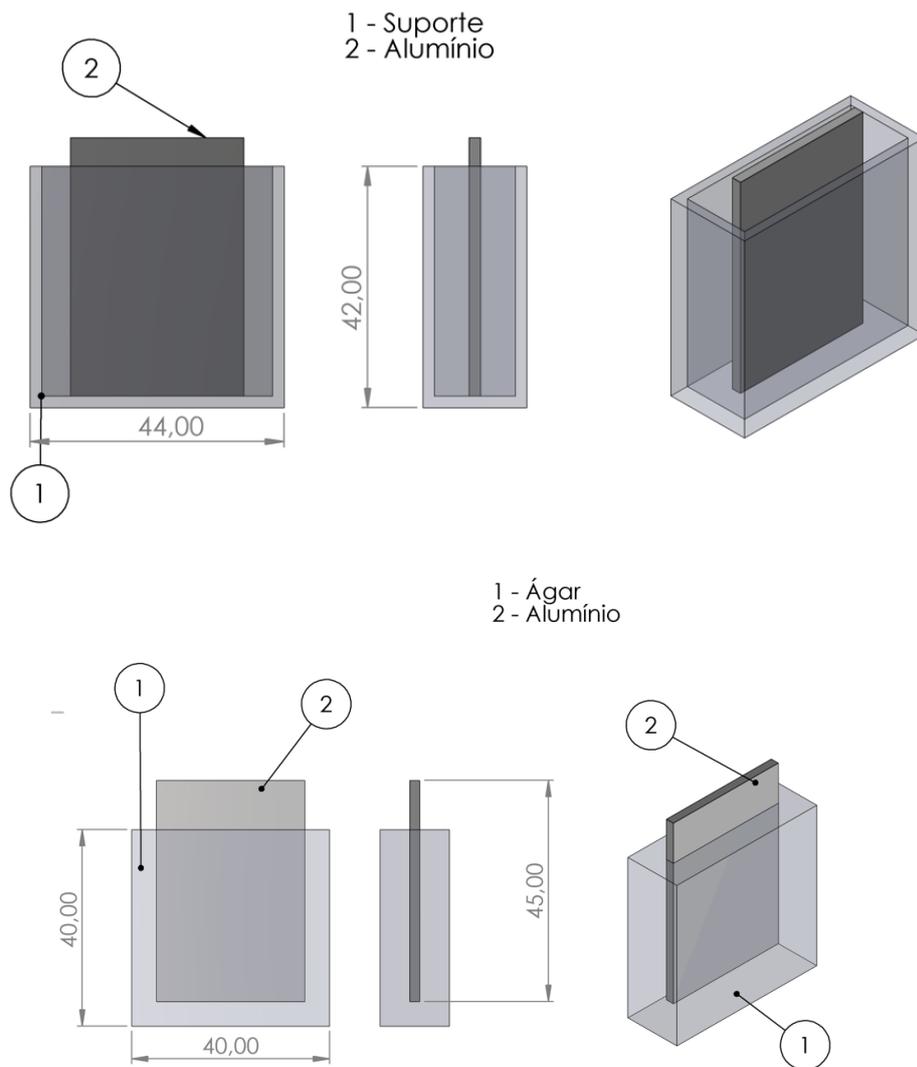


Figura 13. Produção de meia célula alumínio-ágar.

Essa meia célula é levada para o suporte do módulo CCM. Esse procedimento é realizado para quatro células unitárias individuais que compõem o módulo. A Figura 14 apresenta essa montagem.

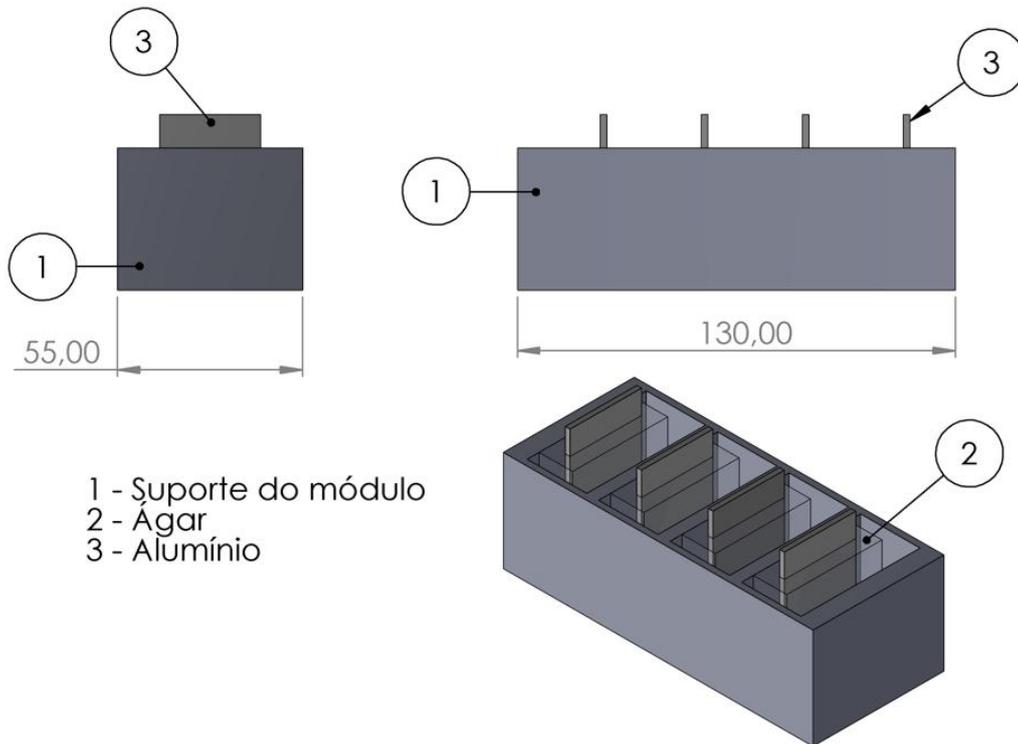


Figura 14. Montagem do módulo CCM – etapa 1.

Na próxima etapa, o sistema é preenchido com a solução contendo o inóculo e em seguida a placa de vedação é colocada, com posterior colocação dos eletrodos de carbono. Por fim, o sistema é fechado. A Figura 15 apresenta essa montagem.

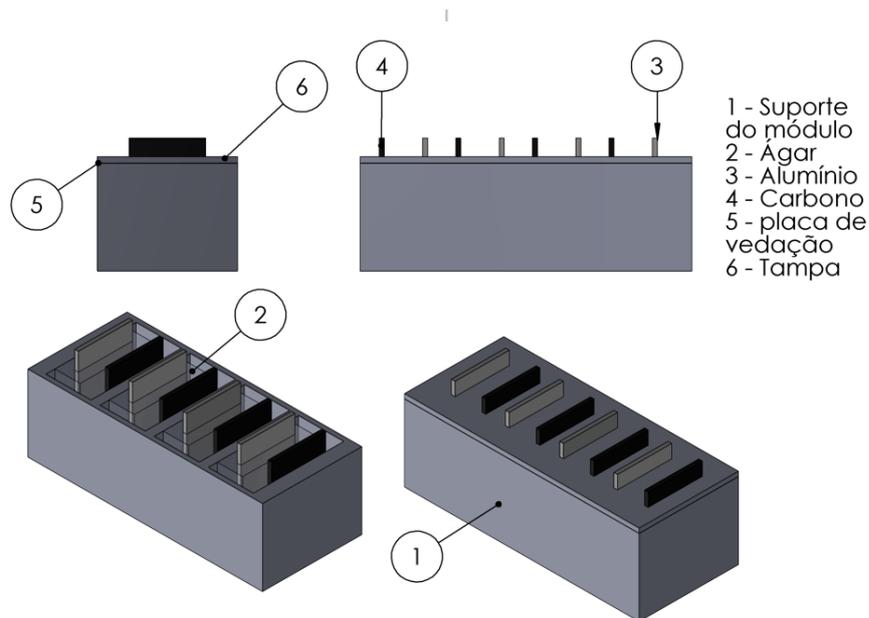


Figura 15. Montagem do módulo CCM – etapa 2.

Cabe destacar que os módulos serão colocados no interior do cone de sinalização, o qual apresenta diâmetro inferior mínimo externo de 250 mm, conforme mostra a Figura 16.

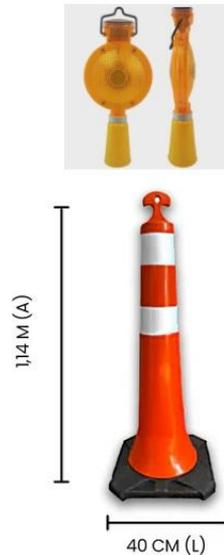


Figura 16. Montagem do protótipo do sinalizador alimentado com os módulos CCM (dimensões do módulo em milímetros).

Identificação do Protótipo: PBEL001S2

Descrição do Protótipo: O sistema de armazenamento de energia utilizado é caracterizado como um banco de baterias feitas com eletrólitos contendo microrganismos. Esse sistema é composto por dois módulos feitos de material polimérico que tem a função de fixar os eletrodos e comportar o eletrólito. Cada módulo possui 24 células unitária e cada célula unitária possui um eletrodo de alumínio imerso em ágar e outro eletrodo de carbono imerso na solução contendo os microrganismos. Essas células são ligadas em série, ou seja, os terminais positivos são conectados nos terminais negativos, dessa forma a diferença de potencial de todas as células unitária é somada, fazendo com que o sistema tenha tensão suficiente para ligar o sinalizador. Para realização dos testes foram montados 3 sistemas: Sistema 1 composto por 2 módulos com células unitárias contendo eletrodos de carbono-carbono. Sistema 2 composto por 2 módulos com células unitárias contendo eletrodos de carbono-alumínio. Sistema 3 composto por 2 módulos com células unitárias contendo tanto eletrodos de carbono-carbono quanto carbono-alumínio. Todos os módulos foram construídos utilizando um suporte (caixa organizadora) composto por compartimento externo feito de material polimérico dentro do qual se encontravam 7 conjuntos de 4 compartimentos individuais (Figura 17). Para construção dos sistemas as tampas foram removidas, tanto do compartimento externo, quanto dos

compartimentos internos. Os sistemas foram presos ao compartimento externo e as ligações entre as unidades foram feitas com fios de cobre com auxílio de placa de alumínio para fixação. Em seguida os dois módulos foram acondicionados em uma caixa provisória que foi utilizada para garantir a estabilidade do sistema durante o transporte. Como eletrólito foi utilizada um sistema composto por uma ponte salina sólida feita de ágar (20 g L^{-1}) em NaCl ($0,6 \text{ M} - 34 \text{ g L}^{-1}$) e eletrólito líquido contendo o microrganismo (848) em meio de cultivo TN PH8. Abaixo uma imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para o protótipo PBEL001S2 (Figura 17).

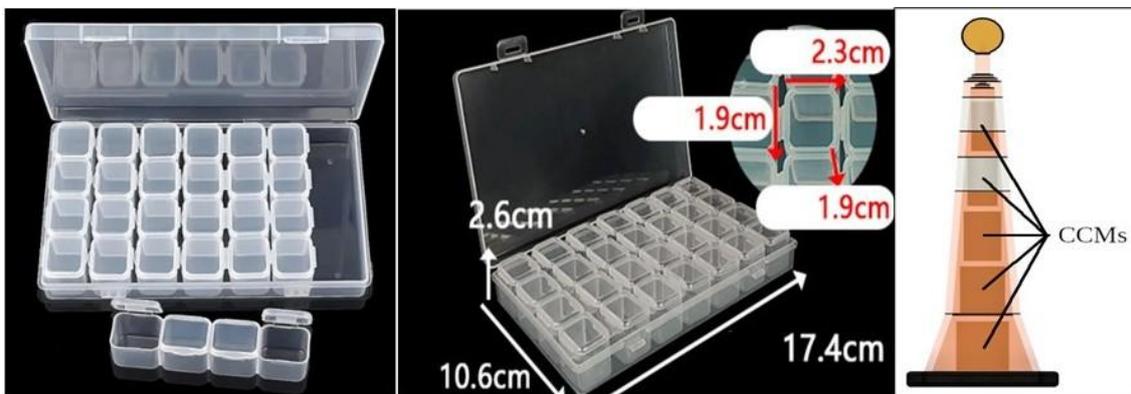


Figura 16. Componentes do utilizados para a construção do protótipo PBEL001S2 de bioeletroatividade.



Figura 17. Imagem gerada por inteligência artificial, representando a expectativa para o protótipo PBEL001S2.

PROTÓTIPO BIOELETRATIVIDADE – TESTE DE CAMPO 01

ID: PBEL001S2

MICROORGANISMO: 848

DATA DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 22/08/2025

HORÁRIO DE TESTE DO PROTÓTIPO EM CAMPO: 19h00

Local Exato do Teste: Campus do Vale – UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil - 30°03'59.6"S
51°07'21.7"W

Tipo de via: Chão batido

Condições da Via:

Seca

Úmida

Molhada (X)

Poças (X)

Nível de Iluminação Natural: 1 (lua)

Temperatura Ambiente (°C): 23

Umidade Relativa do Ar: 75%

Condição do Céu:

Ensolarado

Noturno (X)

Nublado (X)

Chuvoso

Garoa

Neblina

Temporal

Velocidade do Vento: 8Km/h

Descrição do Tempo: Dia de sol com algumas nuvens e chuva passageira. Noite com muitas nuvens. Temperatura entre 16 e 26°C, com chuva (65,2 mm). Vento com direção ENE, umidade do ar entre 70 e 89%.

Tempo para Instalação do Protótipo em Campo: 10 min

Tempo do Teste em Campo: 60 min

Análise dos resultados obtidos

PROTÓTIPO BIOELETRATIVIDADE – TESTE DE CAMPO 01

Identificação do Protótipo: PBEL001S2

Estabilidade da Sinalização (Luminosidade/Intensidade ao Longo do Tempo): Durante o tempo de avaliação do protótipo em campo houve estabilidade da luminosidade e intensidade. No entanto, como já é conhecida a degradação, com o tempo deverá haver perda da intensidade luminosa produzida.

Gradação da Intensidade Luminosa: A intensidade da luz varia ao longo do tempo, demonstrando degradação. No entanto, a maior diferença de potencial é registrada entre 24 e 120h, valores referentes a uma única célula (7 mL). A Tabela 7 apresenta os valores de diferença de potencial e biomassa registrados entre 0 e 28 dias.

Tabela 7. Registro de gradação da diferença de potencial para uma célula de bioeletroatividade (meio TN PH8).

Tempo	Biomassa		
	(OD600)	DDP	%DDP
0H	0,050	18,725	100
24H	0,759	74,225	396
48H	0,846	160,675	858
120H	0,859	108,9	582
168H	0,954	58,25	311
14D	1,037	32,025	171
21D	1,061	24,475	131
28D	1,079	21,275	114

Cabe ressaltar, que adição de 3% de NaCl na formulação aumenta o tempo de durabilidade dos sistemas por 28 dias, sem comprometer significativamente a biomassa, sendo considerada uma

estratégia para protótipos futuros, bem como a adição de flavinas e L-Serina devem ser considerados na formulação final. O NaCl, em concentração de 3%, atua como um estabilizador do sistema, provavelmente ao otimizar o ambiente osmótico para a *Shewanella* (uma bactéria de origem marinha ou costeira, adaptada a ambientes salinos) e inibir o crescimento de microrganismos contaminantes que poderiam competir por substrato ou degradar o biofilme anódico. Essa durabilidade estendida é um fator de viabilidade econômica e operacional para protótipos de sinalização. A sugestão de incluir flavinas e L-Serina na formulação final visa atacar diretamente a eficiência da Transferência Extracelular de Elétrons (EET), complementando a estabilidade conferida pelo NaCl. As flavinas (riboflavina, FMN) são essenciais para a *Shewanella* por atuarem como mediadores de elétrons solúveis. Elas capturam elétrons da superfície da bactéria e os transportam pela solução até o ânodo (eletrodo). A adição de flavinas na formulação inicial garante que a bactéria não precise gastar energia e tempo para produzir esses mediadores em grandes quantidades, acelerando a produção de energia e, conseqüentemente, a intensidade da luz gerada. A L-Serina é um aminoácido que, além de ser um bloco construtor de proteínas e enzimas, é um substrato de carbono e nitrogênio de fácil e rápido assimilação. Sua inclusão visa fornecer um "combustível premium" que a bactéria pode oxidar rapidamente, mantendo uma alta taxa de respiração e de liberação de elétrons de forma contínua, o que é crucial para manter a voltagem estável ao longo do tempo. No entanto, a adição destes ingredientes deve ser avaliada financeiramente, investigando o custo-benefício de aumentar a complexidade da formulação.

Consumo de Nutrientes/Substrato (para Bioeletroatividade): O microrganismo depende de substrato para a produção de diferença de potencial. Este substrato é consumido com o tempo e também sofre variação de pH a partir do metabolismo dos microrganismos, o que pode levar a perda de bioeletroatividade, mesmo com a quantidade de nutrientes disponível. Para o microrganismo em questão, ele tolera bem pH entre 6 e 8.

Tempo Gasto na Instalação de Cada Protótipo: 96h

Recursos Necessários para Instalação: São necessárias ferramentas gerais e uma única pessoa para a instalação.

Observações sobre a Facilidade de Manutenção: Considerando a troca do módulo inteiro, o sistema pode ser considerado de fácil manutenção. Como o eletrólito do protótipo, este também precisa ter seu funcionamento verificado em temperaturas mais baixas (abaixo de 10° C). Na atual versão, o protótipo prevê a troca do módulo inteiro para manutenção. O que pode ser feito em aproximadamente 10 minutos.

Estimativa de tempo entre manutenções: Com base nos dados coletados durante 8 dias, foi verificado que o sistema tem durabilidade mínima de 8 dias. O sinalizador comercial vem com 2 baterias AA Ni-h 1,2v ligadas em série, totalizando 2,4 V.

Uniformidade da Sinalização: Distribuição uniforme.

Facilidade de Reparo e Modularidade de Componentes: O módulo pode ser acessado com facilidade para troca.

Percepção Visual por Pedestres

Número de Observadores: 3

Pedestres Observadores: Graziela Rigo, Rafael Castro, Adilar Gonçalves dos Santos Jr.

Distância Mínima de Detecção Visual: 0 m

Distância Máxima de Detecção Visual: 40 m

Clareza da Sinalização: É nítida, limites do sinalizador visível, mas não do balizador.

Ofuscamento: Os pedestres observadores não se sentiram ofuscados pela própria sinalização em ocorrência de faróis de veículos acionados.

Percepção de Cor e Forma: Houve percepção de cor (amarela/laranja) e forma (redonda) do sinalizador pelos pedestres observadores.

Feedback Subjetivo do Pedestre:

Rafael Castro - *À noite, a iluminação pelo equipamento era perceptível de uma distância de 10 metros, entretanto, seu funcionamento como sinalizador se torna satisfatório apenas mais próximo, como 3 metros. A luz emitida não é desconfortável aos olhos, sem nenhum tipo de ofuscamento, mesmo em curtas distâncias.*

Graziela Rigo - *Durante a observação em campo, percebi que a luz emitida pelo cone de sinalização, embora de baixa intensidade, era visível em ambiente noturno e cumpria sua*

função de demarcar a área. A tonalidade da luz me pareceu agradável e, em nenhum momento, provocou ofuscamento ou desconforto visual. A visibilidade a certa distância foi satisfatória, permitindo a identificação do cone com facilidade.

Adilar Gonçalves dos Santos Jr. - *Boa percepção a baixa distância, até 5 metros, sendo perceptível a diferença entre ligado e desligado.*

Luz Obstrutiva: Não há geração de luz obstrutiva.

Simulação de Detecção por Veículo

Motorista e Carona Observadores: Vanessa Agostini – Motorista, Rafael Castro - Carona

Distância Máxima de Detecção por Veículo: 40 m

Ofuscamento pelos Faróis do Veículo:

Farol baixo – não houve ofuscamento – 10 m

Farol alto – não houve ofuscamento – 10 m

Lanterna – não houve ofuscamento – 10 m

Distância de Detecção de Objeto/Pedestre: A sinalização não permite a identificação de objetos ou pedestres próximos a uma distância de 10 m

Distância de Reconhecimento: 3 m

Feedback Subjetivo do Motorista e Carona:

Vanessa Agostini - *De dentro do carro, a sinalização é nítida de coloração amarelada em contraste com o pavimento. Não foi causado desconforto ou ofuscamento.*

Rafael Castro - *Como carona, é possível identificar a luz emitida pelo equipamento, à 10 metros de distância, apenas se as luzes do carro não estiverem acesas ou iluminando o equipamento. Ainda nesse caso, não foi possível a identificação de objetos ao redor, apenas a luz do balizador era vista. Com faróis ou lanterna ligados, não é possível identificar a emissão de luz. A iluminação não é ofuscante, sendo confortável à visão.*

Luz Obstrutiva: Não há geração de luz obstrutiva.

Avaliação Qualitativa da Poluição Visual: 1

Registros realizados em campo: Figuras 18, 19, 20, 21



Figura 18. Imagens do protótipo de bioeletroatidade PBEL001S2 em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno desligado. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno ligado.



Figura 19. Imagens do protótipo de bioeletroatidade PBEL001S2 em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente diurno ligado. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno ligado.

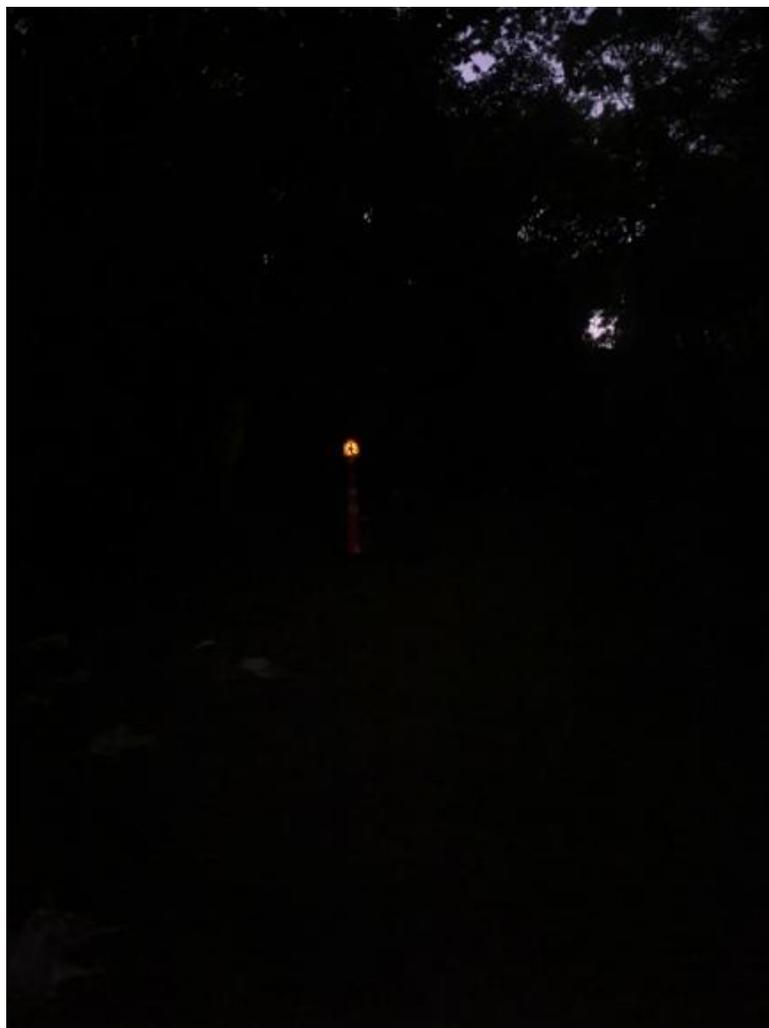


Figura 21. Imagem do protótipo de bioeletroatidade PBEL001S2 em operação durante a noite a uma distância de 10 m.



Figura 21. Imagens do protótipo de bioeletroatividade PBEL001S2 em operação. Foto da esquerda: protótipo em ambiente noturno ligado com lanterna de veículo acesa. Foto do centro: protótipo em ambiente noturno ligado com farol baixo de veículo aceso. Foto da direita: protótipo em ambiente noturno ligado com farol alto de veículo aceso.

6. QUADRO RESUMO - ATIVIDADES PREVISTAS X DESENVOLVIDAS

Atividades Previstas	Produtos Esperados	Atividades Executadas	Status das Atividades Executadas	Produtos Gerados
Mão de obra do projeto	Ensaio e desenvolvimento de protótipos	Execução dos ensaios e construção dos protótipos	Concluída	Resultado da seleção de microrganismos e protótipos projetados
Bioluminescência	Validação	Validação	Concluída	Validação da atividade bioluminescente exposta a diferentes fatores ambientais (pH, temperatura, salinidade)
Bioluminescência	Formulação	Formulação	Concluída	Dois formulações bioluminescentes
Bioluminescência	Desenvolvimento dos protótipos	Desenvolvimento dos protótipos	Concluída	Construção e teste de dois protótipos bioluminescentes

Bioluminescência	Análise dos resultados obtidos	Análise dos resultados obtidos	Concluída	Relatório de performance dos protótipos
Bioeletroatividade	Otimização	Otimização	Concluída	Projeto do sistema de CCM otimizado para o protótipo
Bioeletroatividade	Desenvolvimento do protótipo de campo	Desenvolvimento dos protótipos	Concluída	Construção e teste de um protótipo bioluminescentes
Bioeletroatividade	Análise dos resultados obtidos	Análise dos resultados obtidos	Concluída	Relatório de performance dos protótipos

7. ANEXOS

7.1. Cronograma Físico-Financeiro

7.2. Relatório bolsista

Porto Alegre/RS, 30 de outubro de 2025.

Assinado por:

Mathheus Fernandes

CONCESSIONÁRIA ECOVIAS DO CERRADO S.A.

Assinado por:

Mario Prota

REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A.

CONCESSIONÁRIA ECOVIAS DO CERRADO S.A

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA BIOLUMINESCENTE SUSTENTÁVEL PARA APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE SINALIZAÇÃO DE RODOVIAS – FASE II

DESCRIÇÃO DO BEM	DATA DE AQUISIÇÃO	DOCUMENTO DE AQUISIÇÃO	VALOR DA AQUISIÇÃO	DESTINAÇÃO DO BEM
FREEZERS	07/12/2023	4.427.235	R\$ 13.960,00	REGENERA - Armazenamento e Manutenção da viabilidade de Estoques de Microrganismos das abordagens Bioeletroatividade e Bioluminescência
COMPUTADOR	07/12/2023	13405	R\$ 8.999,50	REGENERA - Operação de Equipamento com softwares - Microscópio e Espectrofotômetro
MICROSCÓPIO	07/12/2023	92.496	R\$ 35.379,55	REGENERA - Comprovação da linhagem de microrganismo de trabalho por técnica de Gram
ESPECTROFOTÔMETRO	19/01/2024	24/0499755-5	R\$ 361.508,89	REGENERA - Quantificação de biomassa (densidade óptica) e de luminescência microbiana
CAPELA DE FLUXO LAMINAR	18/12/2023	33.168	R\$ 47.000,00	REGENERA - Execução de ensaios de bioeletroatividade em ambiente estéril
AUTOCLAVE	04/01/2024	2.715	R\$ 21.950,00	REGENERA - Esterilização de materiais
COMPUTADOR	07/10/2024	79	R\$ 9.699,00	REGENERA - Processamento de dados de bioinformática
CAPELA DE FLUXO LAMINAR	14/11/2024	35.410	R\$ 47.000,00	REGENERA - execução de ensaios de bioluminescência em ambiente estéril
CENTRÍFUGA	25/11/2024	35.681	R\$ 30.000,00	REGENERA - Centrifugação da amostras microbiológicas
CUBA E FONTE DE ELETROFORESE	02/12/2024	41153	R\$ 6.602,36	REGENERA - Biologia Molecular
BANHO SECO	02/12/2024	41153	R\$ 8.727,00	REGENERA - Biologia Molecular
FOTODOCUMENTADOR	20/12/2024	12.296	R\$ 25.650,00	REGENERA - Biologia Molecular
TERMOCICLADOR	20/12/2024	61631	R\$ 27.220,00	REGENERA - Biologia Molecular
QUANTIFICADOR DE DNA	20/12/2024	20942	R\$ 32.700,00	REGENERA - Biologia Molecular

DESCRIÇÃO DOS EQUIPAMENTOS ADQUIRIDOS

ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA SUSTENTÁVEL PARA
APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE SINALIZAÇÃO DE RODOVIAS – FASE II



Figura 01: Freezer para estoque do projeto.



Figura 02: Computador para processar os dados obtidos.



Figura 03: Microscópio com câmera acoplada para observação dos microrganismos.



Figura 04: Espectrofotômetro para avaliação de biomassa.



Figura 05: Capela de fluxo laminar para manipulação em ambiente estéril.



Figura 06: Autoclave para esterilização.



Figura 7: Centrífuga para separação (fase sólida e líquida)

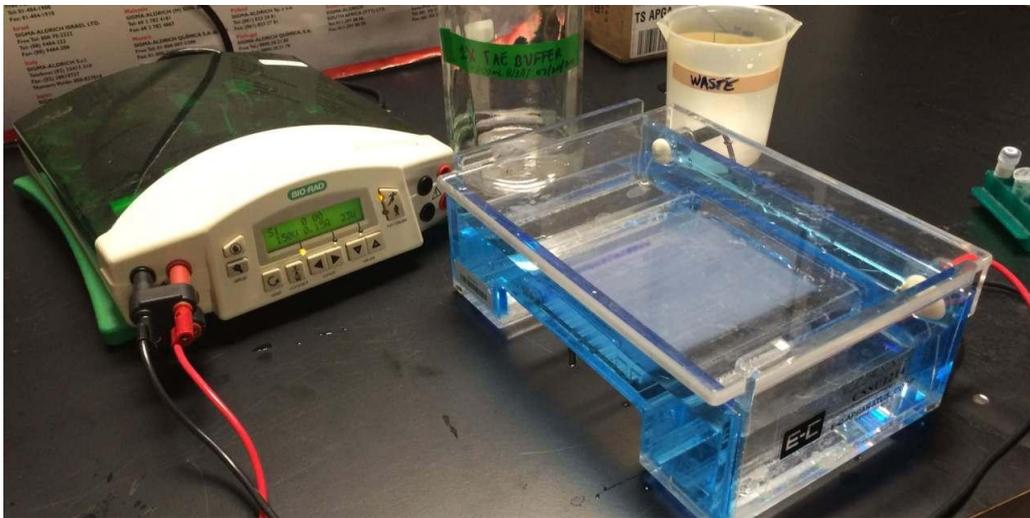


Figura 8: Cuba e fonte de gel de eletroforese para biologia molecular



Figura 9: Banho seco para amostras.

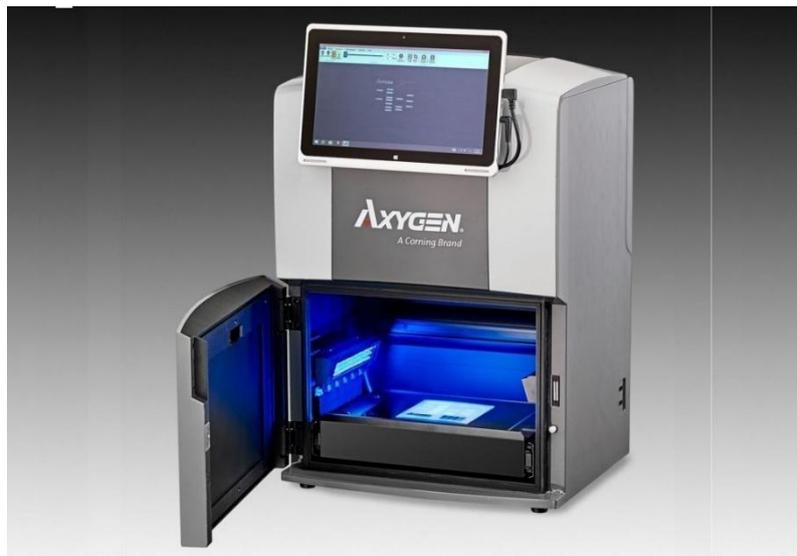


Figura 10: Fotodocumentador para análise da amplificação dos genes.



Figura 11: Termociclador para amplificação do gene de interesse.



Figura 12: Quantificador de DNA para analisar a extração.

Relação de trabalhos submetidos à publicação

ARTIGO 1

Status: Submetido para publicação na *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Identification of the psychrotolerant new species *Aliivibrio regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable bioluminescent marine bacteria

Jéssica Scherer¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Bryan Augusto da Rosa Tavares¹, Renato Kulakowski Corá¹, Andressa de Moura Silva², Alexandre José Macedo¹, Vanessa Ochi Agostini¹

¹Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Ecovias Cerrado – Rua Sintra 50 - Sala 01 – CEP 38406-643, Granja Marileusa, Uberlândia – MG, Brazil.

ARTIGO 2

Status: Submetido para publicação na *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Identification of the new species *Shewanella regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable marine bacteria able to produce electricity

Jéssica Scherer¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Bryan Augusto da Rosa Tavares¹, Adilar Gonçalves³, Gabriel Stracke Oliveira¹, Andressa de Moura Silva², Célia de Fraga Malfatti³, Alexandre José Macedo¹, Vanessa Ochi Agostini¹

¹Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Ecovias Cerrado – Rua Sintra 50 - Sala 01 – CEP 38406-643, Granja Marileusa, Uberlândia – MG, Brazil.

³ LAPEC – Laboratório de Pesquisa em Corrosão – UFRGS Av. Bento Gonçalves - 43427, 2º Andar - Setor IV - CEP 91501-970, Agronomia Porto Alegre, RS, Brazil.

NOTA TÉCNICA

Status: Submetido e aguardando publicação na *INFORS HT*

Scaling-Up of the Bioluminescent Strain *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) from Blue Amazon: Implications for the Formulation of Sustainable Signaling Devices

Jéssica Scherer¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Andressa de Moura Silva², Dayse Pereira Dias Silva¹, Laura Fernanda Costantin¹, Alexandre José Macedo¹, Vanessa Ochi Agostini¹

¹ Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Ecovias Cerrado – Rua Sintra 50 - Sala 01 – CEP 38406-643, Granja Marileusa, Uberlândia – MG, Brazil.

Brazilian Journal of Microbiology

Identification of the psychrotolerant new species *Aliivibrio regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable bioluminescent marine bacteria --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Identification of the psychrotolerant new species <i>Aliivibrio regenerae</i> sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable bioluminescent marine bacteria
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Environmental and Biodiversity
Funding Information:	RDT (50500.252331/2022-84) Not applicable
Abstract:	<p>This study describes the isolation and the taxonomic and physiological characterization of a new bioluminescent bacterial species, designated <i>Aliivibrio regenerae</i> sp. nov. (strain REG001485), isolated from a concrete pillar in a coastal marine environment in the Blue Amazon region, Brazil, in November 2023. Phylogenetic and phylogenomic analyses, including comparison of 16S rRNA sequences and multiple housekeeping genes (<i>gyrB</i>, <i>pyrH</i>, <i>recA</i>, and <i>rpoA</i>), confirmed its position as a novel species within the genus <i>Aliivibrio</i>, belonging to the family Vibrionaceae. The strain is classified as a small, curved, Gram-negative, and motile rod. Physiologically, it is a facultative anaerobic chemoheterotroph, capable of growing in a wide range of salinity (0–8% NaCl) and pH (5–10). Notably, the strain's metabolism is fueled by N-Acetyl-D-Glucosamine (NAG), the chitin monomer, which significantly promotes both biomass and luminescence, corroborating the metabolic strategy of the genus <i>Aliivibrio</i> linked to the degradation of marine polymers. Optimized conditions for light emission included low temperatures (4°C–10°C), suggesting that <i>A. regenerae</i> is a psychrotolerant species with a cold-adapted luciferase, a contrasting adaptation to the mesophilic <i>A. fischeri</i>. Finally, the study demonstrated an inversely proportional relationship between high biomass and luminescence, characterizing the bioluminescent paradox, where static condition and slightly acidic pH (pH 6.5) favored the maintenance of luminescent activity for up to 100 days.</p>
Corresponding Author:	Vanessa Ochi Agostini, PhD Regenera Moléculas do Mar Porto Alegre, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Regenera Moléculas do Mar
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jéssica Scherer
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jéssica Scherer Mário Luiz Conte da Frota Júnior Bryan Augusto da Rosa Tavares Renato Kulakowski Corá Andressa de Moura Silva Alexandre José Macedo Vanessa Ochi Agostini, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Dear Editor-in-Chief from Brazilian Journal of Microbiology,

We are pleased to submit our manuscript entitled " Identification of the psychrotolerant new species *Aliivibrio regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable bioluminescent marine bacteria" for consideration for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.

This manuscript describes the full taxonomic and physiological characterization of a novel bacterial species, designated *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (strain REG001485), isolated from a coastal marine environment in the Blue Amazon region of Brazil. Our phylogenetic and phylogenomic analyses, utilizing 16S rRNA sequences and multiple housekeeping genes (*gyrB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*), conclusively establish its position as a new species within the genus *Aliivibrio*, belonging to the family *Vibrionaceae*. The manuscript provides a detailed characterization (morphological, physiological, chemotaxonomic) and genetic evidence essential for establishing a novel species, including its notable psychrotolerant and bioluminescent properties. The discovery of this novel species from an underexplored Brazilian marine environment highlights the unrecognized diversity of cultivable bioluminescent bacteria and provides a foundation for future bioprospecting studies.

The focus and content of our study are directly aligned with the core scope of Brazilian Journal of Microbiology, which serves as the official international forum for the publication of new prokaryotic taxa. We affirm that this manuscript has not been previously published and is not under consideration for publication elsewhere. All authors have approved the manuscript and agree with its submission to Brazilian Journal of Microbiology.

We believe that our findings represent a significant contribution to microbial systematics and evolutionary microbiology and will be of high interest to the journal's readership. We look forward to your positive response.

Thank you for your time and consideration.

Sincerely,

Dr. Vanessa Ochi Agostini*

*Corresponding Author: nessaochi@gmail.com

Affiliation: Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil

Identification of the psychrotolerant new species *Aliivibrio regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable bioluminescent marine bacteria

Jéssica Scherer¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Bryan Augusto da Rosa Tavares¹, Renato Kulakowski Corá¹, Andressa de Moura Silva², Alexandre José Macedo¹, Vanessa Ochi Agostini¹

¹ Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Ecovias Cerrado – Rua Sintra 50 - Sala 01 – CEP 38406-643, Granja Marileusa, Uberlândia – MG, Brazil.

Abstract

This study describes the isolation and the taxonomic and physiological characterization of a new bioluminescent bacterial species, designated *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (strain REG001485), isolated from a concrete pillar in a coastal marine environment in the Blue Amazon region, Brazil, in November 2023. Phylogenetic and phylogenomic analyses, including comparison of 16S rRNA sequences and multiple housekeeping genes (*gyrB*, *pyrH*, *recA*, and *rpoA*), confirmed its position as a novel species within the genus *Aliivibrio*, belonging to the family Vibrionaceae. The strain is classified as a small, curved, Gram-negative, and motile rod. Physiologically, it is a facultative anaerobic chemoheterotroph, capable of growing in a wide range of salinity (0–8% NaCl) and pH (5–10). Notably, the strain's metabolism is fueled by N-Acetyl-D-Glucosamine (NAG), the chitin monomer, which significantly promotes both biomass and luminescence, corroborating the metabolic strategy of the genus *Aliivibrio* linked to the degradation of marine polymers. Optimized conditions for light emission included low temperatures (4°C–10°C), suggesting that *A. regenerae* is a psychrotolerant species with a cold-adapted luciferase, a contrasting adaptation to the mesophilic *A. fischeri*. Finally, the study demonstrated an inversely proportional relationship between high biomass and luminescence, characterizing the bioluminescent paradox, where static condition and slightly acidic pH (pH 6.5) favored the maintenance of luminescent activity for up to 100 days.

Keywords: marine environment; bacteria, light-emission; luminescence; new species record.

Introduction

Bioluminescence, the capacity of living organisms to emit light, represents one of the most fascinating and ecologically relevant phenomena in the marine environment. Bioluminescent bacteria, particularly those in the family Vibrionaceae and the genus *Aliivibrio*, are extensively studied due to their ecological dominance and biotechnological potential [1,2].

The genus *Aliivibrio* was established in 2007 to reclassify a specific phylogenetic clade previously housed within *Vibrio*, including the well-known *Aliivibrio fischeri* (formerly *Vibrio fischeri*) [3]. This genus is a heterogeneous group of Gram-negative, motile, and primarily marine bacteria that are functionally diverse. While *A. fischeri* is the model species, famous for its obligate bioluminescent symbiosis with the Hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*) - a relationship studied extensively for quorum sensing and counter-illumination camouflage - other known species inhabit different ecological niches. The genus's metabolic flexibility and ecological versatility across diverse marine environments, ranging from mesophilic to psychrotolerant conditions and from free-living or symbiotic existence to pathogenicity [4].

Despite the established importance and global distribution of this genus, the cultivable microbial diversity across vast marine regions remains largely unexplored [5]. The

1 Brazilian coastal marine environment, especially the region known as the Blue Amazon
2 (Amazônia Azul), constitutes an extensive biome with great potential for the discovery
3 of new species and strains with unique physiological adaptations [6]. The
4 characterization of new species is fundamental to expand the knowledge of marine
5 microbial biodiversity and identify strains with singular properties, such as the ability to
6 maintain luminescence under extreme environmental conditions.

7 In this context, the present work describes the isolation and characterization of a new
8 bioluminescent bacterial strain, REG001485, obtained from the Blue Amazon. Through
9 combined analyses of molecular taxonomy and detailed phenotypic characterization,
10 including the optimization of growth and luminescence conditions (temperature, pH,
11 salinity, and carbon sources), it was possible to classify the strain as a novel species,
12 herein designated as *Aliivibrio regenerae* sp. nov.. The obtained results reveal an
13 unexplored diversity and provide valuable insights into the metabolic and physiological
14 adaptations of bioluminescent bacteria to coastal marine environments.

16 **Material and Methods**

18 **Bacteria strain**

20 The bacterial strain REG001485, described as *Aliivibrio regenerae* sp. nov., was
21 isolated from Blue Amazon region, more specific in Brazilian coastal marine
22 environment at coordinates 30°08.56''S and 50°11.26'W in November 2023. The strain
23 was collected from a concrete pillar of a fishing platform. Standard microbiological
24 methods were used for the isolation [7]. The isolate has been deposited in the
25 Regenera' Bank in Porto Alegre, RS, Brazil. The strain was maintained as stab cultures
26 in LSW, BO1485, and SM broth media, supplemented with 15% glycerol, and stored at
27 -80°C. (see the media description in Supplementary Material – SM Table 1).

31 **Morphology**

33 The cellular morphology and motility of the novel isolate were observed using optical
34 microscopy (100x) via the drop technique. Gram staining was performed using the
35 modified Hucker method. The bacteria were grown on different agar (MD, TCBS,
36 BO1485, and TS) media (see SM Table 1). The bacterium from the agar media was
37 incubated at 30°C for 48h.

40 **Functional Diversity and Biochemical Tests**

42 The Biolog EcoPlate™ (Biolog, Hayward, California) assay is a method used to assess
43 bacterial functional diversity [8]. It utilizes a 96-well microplate containing 31 different
44 carbon sources, categorized into carbohydrates, carboxylic acids, amino acids, amines,
45 and polymers, along with a control well. The microorganisms are inoculated into the
46 plate, and their metabolic activity is monitored by observing the color change of a
47 redox-sensitive dye as they consume the substrates. The degree of color development
48 in each well indicates the extent to which the microorganisms have utilized a particular
49 carbon source. To perform the assay, the bacteria were grown on solid MD medium for
50 24 hours at 30°C. The bacteria were then suspended in 0.9% saline, and the OD₆₀₀
51 was measured. In each plate well, 150 µL of a strain suspension (OD₆₀₀ = 0.085–
52 0.095) was added. Plates were maintained at 30°C for 72 hours. Absorbance readings
53 were performed at 590 nm, as well light-emission (LUM) at 0h, 6h and 72h.

57 **Growth and light-emission characteristics**

59 The bacteria were grown on different broth (MD, BO1485 and TS) media (see SM
60 Table 1). The bacterium was incubated with agitation (180 rpm) at 30°C for 168h. In
61
62
63
64
65

1 this case, the optical density (OD_{600nm}) and the luminescence (LUM) was recorded
2 using a spectrophotometer (BioTek Synergy H1 - Agilent) at 6h, 24h, 48h, 72h, and
3 168h, and was used as an estimation of bacterial biomass and light-emission,
4 respectively.

5 Ranges of NaCl concentration for growth were determined on TS medium
6 supplemented with NaCl at concentrations ranging from 0% to 12% (0, 0.5, 2, 3, 4, 6,
7 8, 9, 10, 11, 12%). Growth at different temperatures (4, 10, 20, 30, 37, 45, 60°C) and
8 buffered pH levels (4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10) were determined on MD
9 medium. The assays had an initial optical density of 0.05 at 600 nm and were
10 incubated with agitation (180 rpm) at 30°C. Biomass (OD_{600nm}) and light-emission
11 (LUM) were estimated at 6h, 24h, 48h, 72h, and 168h using a spectrophotometer.
12 Oxygen requirements were evaluated using thioglycolate semi-solid medium [9].

13 To evaluate the light-emission of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. at different parameters
14 composition, based on the individuals' parameters results, an assay was performed in
15 two broth media, MD and BO1485. The cultures were exposed to both static (0 rpm)
16 and agitated (180 rpm) conditions at pH 6,5 or 9 at 10°C. N-Acetyl-D-Glucosamine
17 (NAG) was added on time 0 (300 µL 15 mL⁻¹), representing optimal growth conditions
18 based on previous results. The assay lasted 100 days, with analyses of OD₆₀₀ and
19 LUM (in a 50 mL Falcon tube containing a 15 mL inoculum). The initial OD₆₀₀ was 0.05.
20
21

22 Enzymatic and other metabolic assays

23
24 The catalase assay was used to identify the presence of the enzyme responsible for
25 decomposing hydrogen peroxide (H₂O₂). The bacterium was cultured on MD agar
26 medium and incubated at 30°C for 24 hours. The reagent, 30% H₂O₂, was pipetted
27 onto the colony. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) was used as a negative control,
28 while *Staphylococcus aureus* (ATCC 33592) was used as a positive control.
29

30 The oxidase assay is used to identify bacteria that possess the cytochrome c oxidase
31 enzyme, which participates in the electron transport chain using oxygen as the final
32 electron acceptor. The test uses the reagent tetramethyl-p-phenylenediamine (1%),
33 which is pipetted onto the colony. For this test, the bacteria were cultured on MB
34 medium and incubated at 30°C for 24 hours. When present, the enzyme oxidizes the
35 reagent, resulting in a color change to purple or dark blue. *Escherichia coli* (ATCC
36 25922) was used as a negative control, and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)
37 was used as a positive control. The production of the amylase (hydrolyzes starch),
38 protease (catalyzes the breakdown of peptide bonds in proteins), lipase (breaks down
39 fats), alginate lyase (degrades alginate), and DNase (degrades DNA) enzymes was
40 evaluated on a specific solid medium (see SM Table 1). After 48 hours of incubation at
41 30°C, strain growth and halo formation were observed.
42

43 The nitrate reduction assay in BHI broth was used to determine whether the bacteria
44 were capable of reducing nitrate (NO₃⁻) to nitrite (NO₂⁻) or other nitrogenous
45 compounds [10]. The presence of nitrite is detected by the formation of a red color after
46 the addition of specific reagents (sulfanilamide and N-(1-Naphthyl)ethylenediamine
47 dihydrochloride). *Escherichia coli* (ATCC 25922) was used as a positive control.
48

49 The ability of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. to produce the enzyme 1-aminocyclopropyl-
50 1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) was evaluated. To determine the presence
51 of ACC deaminase, DF minimal salt agar medium was prepared with and without
52 nitrogen (NH₄Cl) and with the addition of bromothymol blue. Bacterial growth was
53 observed in the different media. Positive results were considered when growth
54 occurred in both DF+ACC and DF+NH₄Cl media, but not in DFBase medium (without
55 ACC or NH₄Cl) [11].
56

57 The ability of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. to oxidize sulfur was also evaluated on
58 STARKEY agar medium, with a positive result indicated by the observation of yellow
59 colonies and halo formation [12]. On the other hand, the ability to solubilize phosphate
60 and potassium was evaluated on NBRIP [13] and ALEK [14] agar media, respectively.
61
62
63
64
65

1 In all cases, a suspension of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. in 0.9% saline (OD₆₀₀ =
2 0.085–0.095) was inoculated (10 µL) in quadruplicate in each medium and incubated at
3 30°C for 48 hours.

4 **Antibiotic susceptibility and hemolytic assay**

5
6 Antimicrobial-impregnated filter paper discs (Cecon©) were placed in duplicate on the
7 surface of MD agar previously inoculated with a uniform lawn of *Aliivibrio regenerae* sp.
8 nov. After the antimicrobial diffused into the culture medium, a concentration gradient
9 formed around each disc. After incubation (48h at 30°C), the presence of the
10 antimicrobial in the medium either inhibited bacterial growth or it did not, as observed
11 by the formation or absence of an inhibition zone [adapted from 15].

12
13 The hemolytic capacity of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. was also evaluated. To this end,
14 a suspension of the bacterial strain in 0.9% saline (OD₆₀₀ = 0.085-0.095) was
15 inoculated (10 µL) in quadruplicate on blood agar and incubated at 30°C for 24 hours.
16 This assay allows for a preliminary assessment of possible pathogenicity and/or toxicity
17 through the alteration, dissolution, or destruction of red blood cells. The result is
18 classified as: Beta-hemolytic: when complete hemolysis of red blood cells occurs,
19 forming a transparent zone around the colony. Alpha-hemolytic: characterized by partial
20 hemolysis associated with a partial loss of hemoglobin from red blood cells, resulting in
21 a gray-green zone in the culture medium and around the colony. Gamma-hemolytic:
22 represented by the absence of hemolysis [16].
23
24

25 **Phylogenetic and Phylogenomic Analyses**

26
27 The evolutionary relationships and species identification of isolate REG001485,
28 identified as *Aliivibrio regenerae* sp. nov., were investigated through phylogenetic
29 analyses performed in two steps. The first step aimed to infer its classification at the
30 genus level within the Vibrionaceae family (inter-genus resolution), and the second
31 step aimed to determine the species within the identified genus (intra-genus
32 resolution).
33

34 The genus classification of the REG001485 isolate was conducted through
35 phylogenetic analysis by comparing the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene
36 sequence of REG001485 with 16S rRNA gene sequences recovered from the
37 reference genomes of all species within the Vibrionaceae family available in NCBI [17].
38 The recovered sequences were filtered to select the largest 16S rRNA gene per
39 genome, with a length greater than 1000 nucleotides, resulting in a dataset of 231
40 reference genomes. These sequences recovered were aligned using MUSCLE [18]
41 implemented in MEGA software [19]. These sequences were used to phylogenetic
42 inference, which was performed through the software PhyML [20] with the evolutionary
43 model parameters predicted by jModelTest software [21], selecting the General Time
44 Reversible with Invariable sites and Gamma distribution with four categories (GTR+I+G
45 model). Branch support was evaluated using Shimodaira-Hasegawa-like (SH-like)
46 values in Phyml software. *Photorhabdus luminescens* was used as the outgroup, and
47 branches with support values below 0.8 were collapsed. The phylogenetic tree was
48 subsequently visualized and edited using TreeGraph [22] and FigTree software.
49

50 The species classification of the REG001485 isolate was conducted through
51 phylogenetic analyses by comparing the sequences of the *gyrB*, *pyrH*, *recA*, and *rpoA*
52 of REG001485 with homologous sequences recovered from all *Aliivibrio* strains
53 available in NCBI, considering only reference genomes annotated by NCBI Refseq
54 database [23]. From the 126 recovered genomes, sequences of *gyrB*, *pyrH*, *recA*, and
55 *rpoA* genes were selected. These sequences were aligned using MUSCLE [18]
56 implemented in MEGA software [19]. The aligned sequences were then concatenated,
57 and a distance matrix was generated. Redundant concatenated sequences (i. e., those
58 with 0 differences) were clustered into unique representative entries, reducing the
59
60
61
62
63
64
65

1 dataset to 72 sequences. The phylogenetic inference was performed with the
2 maximum likelihood method in PhyML software [20]. The evolutionary model that best
3 fit our data, predicted with ModelTest-NG [24] as the General Time Reversible with
4 Invariable Sites and Gamma Distribution with four rate categories (GTR+I+G4 model)
5 was used in the analysis. Branch support was evaluated using Shimodaira-Hasegawa-
6 like (SH-like) values and performed with Phym software. *Vibrio cholerae* was used as
7 the outgroup, and branches with support values below 0.8 were collapsed. The final
8 phylogenetic tree was visualized and edited using TreeGraph [22] and FigTree
9 software. The evolutionary relationships and species identification of isolate
10 REG001485 were investigate through a genome-based taxonomy approach, using
11 phylogenomic analyses performed on Type (Strain) Genome Server (TYGS) platform
12 [25]. TYGS conducted the phylogenomic inference by pairwise comparisons of the
13 coding DNA sequences of REG001485 and those of type strains, based on data from
14 the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) database [25].
15 The closest related type strains were identified and subsequently analyzed by digital
16 DNA-DNA hybridization (dDDH) using Genome-to-Genome Distance Calculator
17 (GGDC) [25]. The dDDH values were reported along with their confidence intervals,
18 and values $\geq 70\%$ were considered indicative of the same species.
19

20 21 **Results and Discussion**

22 23 **Morphology**

24
25 *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG01485) was able to grow on all agar media, however,
26 BO1485 and MD media showed the most representative growth (Figure 1a, b, c, d).
27 The novel isolate was classified as Gram-negative curved motile (by means of polar
28 flagella) small rods (Figure 1e,f; see SM Video 1), showing a circular, opaque, and
29 ivory-colored colonies (0.5–2.0 mm in diameter) (Figure 1g,h). All agar media allowed
30 bioluminescence activity, recorded on dark room (Figure 1i).
31 Under specific conditions (MD; 30°C; 48h), the cells of the novel isolate were 1-2 μm in
32 length. The colonies were entire, smooth, opaque, and slightly yellowish ivory color
33 (0.5–2 mm in diameter) (Figure 1g, h).
34
35
36
37

38 39 **Functional Diversity and Biochemical Tests**

40 The only carbon substrates that showed positive results to *Aliivibrio regenerae* sp. nov.
41 was N-Acetyl-D-Glucosamine (NAG), influencing in biomass and luminescence, and
42 Tween 80 only to luminescence (Table 1).
43 The growth and enhanced bioluminescence observed in the new species *Aliivibrio*
44 *regenerae* sp. nov. upon utilization of NAG and Tween 80 highlight the critical link
45 between resource availability, primary metabolism, and light production in marine
46 bacteria. The genus *Aliivibrio* (formerly classified as *Vibrio*) is widely recognized for its
47 ecological dominance in the marine environment and its ability to degrade the
48 ubiquitous polymer chitin, of which NAG is the primary monomer [26, 27].
49 The finding that NAG significantly supports both biomass and bioluminescence in *A.*
50 *regenerae* sp. nov. is consistent with the established metabolic strategies of the
51 *Vibrionaceae* family. As a crucial source of both carbon and nitrogen, the efficient
52 uptake and catabolism of NAG ensures a robust energy supply (ATP) and the
53 necessary metabolic precursors for cell division and growth [28]. This high metabolic
54 activity is indispensable for the energetically demanding process of light emission.
55 Furthermore, the bioluminescence mechanism is regulated by Quorum Sensing (QS), a
56 cell-density-dependent system in *Aliivibrio* species [27]. The rapid and high-level
57 utilization of NAG allows *A. regenerae* sp. nov. to quickly reach the high cell density
58 threshold required to activate the *lux* operon, thus triggering maximum light output.
59
60
61
62
63
64
65

1 Studies in the model organism *Aliivibrio fischeri* show that NAG metabolism is precisely
2 regulated by the repressor protein NagC, linking nutrient availability directly to gene
3 expression and overall fitness, a pathway likely conserved in *A. regenerae* sp. nov.
4 [29]. Therefore, NAG acts as a metabolic gatekeeper, promoting the growth essential
5 for the onset of QS-controlled bioluminescence.

6 The selective enhancement of bioluminescence by Tween 80 points to a specific
7 influence on the light-emitting reaction. Bacterial bioluminescence requires the enzyme
8 luciferase (LuxAB) to catalyze the oxidation of a long-chain aldehyde and reduced
9 flavin mononucleotide (FMNH₂) [30]. The necessary aldehyde substrate is supplied
10 internally by the Fatty Acid Reductase complex (LuxCDE).

11 Tween 80 is a non-ionic surfactant composed of polyoxyethylene sorbitan monooleate,
12 which contains a substantial amount of the fatty acid precursor oleic acid (C18:1). Its
13 presence in the medium likely serves two interconnected roles: (i) The strain likely
14 possesses esterase or lipase activity capable of hydrolyzing Tween 80, thereby
15 increasing the external pool of long-chain fatty acids. These fatty acids can be either
16 incorporated directly or metabolized by the LuxCDE complex to produce the essential
17 long-chain aldehyde substrate, thus boosting the efficiency of the luciferase reaction
18 [31]. (ii) As a surfactant, Tween 80 can modify the cell membrane's composition and
19 permeability [32]. This alteration may enhance the functionality or proper folding of the
20 membrane-associated LuxCDE complex or increase the efficiency of electron
21 transport, leading to a greater supply of and overall greater light emission.
22
23

24 **Growth and light-emission characteristics**

25
26 Regarding to oxygen requirement, the strain was considered a chemoheterotrophic
27 facultative anaerobe (see SM Figure 1). In broth media, the bacterial strain grew best in
28 BO1485, followed by MD and TS. For light-emission by luminescence, BO1485
29 medium was more effective (Figure 2). The novel isolate was able to grow at NaCl
30 concentrations ranging from 0–8%, with an optimal concentration for growth between
31 0.5–4%. On the other hand, for light emission the optimal NaCl concentration was 3%.
32 The bacteria were able to grow at temperatures from 4–37°C, with optimum growth
33 occurring at 20° and 30°C. However, for light-emission the optimal temperatures were
34 between 4° and 10°C. The strain also grew at pH levels from 5 to 10, with optimum
35 growth at pH 6.5–8. For light-emission, were not observed differences in pH from 5 to
36 10 (see Figure 2 and SM Table 2).
37
38

39 Based on the results obtained for light-emission through bioluminescence, the main
40 parameters were selected to be tested in combination for a longer period of time. The
41 analysis evaluates the effects of time (24h, 48h, 120h, 168h, 14, 21, 28, 35, 45, 60 and
42 100 days), medium (MD, BO1485), pH (6.5 and 9.0) and incubation strategy (0 rpm
43 and 180 rpm). Differences were observed between the factors that most positively
44 affected the luminescence activity of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (Table 2).
45

46 The BO1485 medium showed a significant effect on long-term luminescence, while the
47 MD appears to stimulate light emission more significantly in the first week. The same
48 was observed for biomass. Regarding pH, between 48h and 7 days, pH 9 appears to
49 stimulate luminescence more. From 14 days onward, its stimulus is similar to pH 6.5.
50 However, a more acidic pH allowed luminescence to be maintained up to 100 days. For
51 biomass, pH 6.5 was more positive, except for the last sampling time. Regarding the
52 type of incubation, higher luminescence was recorded for agitated cultures in the first
53 48h. However, after this period, it was observed that static cultures benefit from light
54 emission by *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485). Its biomass, however, benefits
55 from agitation. Regarding the relationship between biomass and luminescence, it is
56 inversely proportional: the higher the biomass, the lower the light emission (Figure 3).
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The physiological responses of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) to varied
2 culture conditions — medium composition, pH, and agitation — provide crucial insights
3 into the species' metabolic strategy and its regulation of luminescence. These findings
4 underscore a complex, often inversely proportional, relationship between maximum
5 cellular yield (biomass) and light-emission (bioluminescence), a common characteristic
6 among marine luminous bacteria.

7 The contrasting effects of the BO1485 and MD media on the kinetics of growth and
8 luminescence suggest distinct metabolic priorities linked to the available nutrient
9 profile.

10 The observation that MD stimulates both biomass and luminescence more significantly
11 in the first week suggests that MD provides readily available, high-energy carbon and
12 nitrogen sources (e.g., amino acids) that facilitate rapid cellular division and
13 accumulation of the necessary cofactors (e.g., FMNH²) for the luciferase enzyme [30].
14 This rapid growth quickly achieves the Quorum Sensing (QS) threshold, resulting in an
15 intense initial light burst.

16 The significant effect of BO1485 on long-term luminescence indicates that this medium
17 contains complex or slowly utilized nutrients. These resources likely support a slower,
18 more stable metabolic rate, enabling the bacteria to maintain the high energy
19 expenditure required for light production over an extended period. This long-term
20 stability is ecologically relevant, as sustained luminescence is crucial for symbiotic or
21 saprophytic survival strategies in oligotrophic marine environments [33].

22 About pH, the results reveal a sophisticated mechanism for maintaining internal
23 homeostasis and optimizing metabolic pathways under varying external conditions. The
24 finding that pH 9.0 stimulates light-emission more significantly during the first 7 days
25 suggests that *Aliivibrio regenerae* sp. nov. may possess specific enzymes or transport
26 systems optimized for mildly alkaline conditions, typical of surface marine waters.
27 However, alkaline pH often limits the proton motive force, which can impact overall
28 energy efficiency. The maintenance of luminescence up to 100 days at the slightly
29 acidic pH (alongside better overall biomass at pH 6.5) is a critical finding. It suggests
30 that while pH 6.5 may not support the highest per-cell light intensity initially, it is
31 conducive to long-term cellular viability and metabolic stability. The ability to maintain
32 luminescence under slightly acidic conditions could be an adaptation to environments
33 like decaying organic matter or fish guts, where acidic fermentation products
34 accumulate, demonstrating the species' resilience [34]. The transition where pH 9.0
35 stimulus becomes similar to pH 6.5 after 14 days could reflect the bacteria exhausting
36 a key pH-sensitive nutrient or the accumulation of acidic metabolic byproducts that
37 buffer the pH 9.0 medium, effectively bringing the two conditions closer metabolically
38 over time.

39 The opposing effects of agitation on biomass and luminescence are a classic
40 observation in the study of *Vibrio* and *Aliivibrio* and can be explained by the dual
41 requirements of oxygen and QS. Agitated cultures yield higher initial luminescence
42 (when associated to MD media) and better overall biomass. Agitation ensures
43 maximum O₂ availability, which is essential because oxygen is a direct substrate for the
44 luciferase reaction. Furthermore, agitation enhances the mass transfer of nutrients,
45 supporting faster exponential growth and biomass accumulation [34]. The observation
46 that static cultures benefit light-emission after 48h could be an indicator of QS-
47 mediated regulation. In a static environment, bacterial cells form microcolonies and
48 biofilms, allowing the autoinducers (AHLs) released by the cells to accumulate more
49 rapidly to the high concentration required for *lux* gene activation, maximizing light
50 emission [35]. In contrast, the inversion of the relationship (high biomass = low light)
51 during the stationary phase may be associated with resource optimization and
52 metabolic stress signals, rather than strictly to QS. During exponential growth, the cell
53 prioritizes the use of NADH for oxidative phosphorylation (maximum ATP production)
54 and for the synthesis of macromolecules. The NADH is channeled into the electron
55 transport chain, leaving less NADH available for the *lux* pathway. This results in a low
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 luminous efficiency per cell, even if the total biomass is high. When growth ceases (due
2 to nutrient limitation or accumulation of toxins), the demand for NADH for biomass
3 synthesis drastically decreases. The NADH is then redirected to the luciferase system,
4 allowing for a much higher light emission rate per cell [31]. This resource diversion
5 directly explains the observed inversion in the relationship [30]. Furthermore, the
6 bioluminescence system is not solely for light emission; it also has an important
7 physiological function as an antioxidant system, which may be crucial during the
8 stationary phase. Additionally, while QS regulates the *lux* operon, the metabolism of the
9 long-chain aldehyde (RCHO) is governed by other factors that are not strictly QS-
10 dependent.

11 Even though agitation promotes better O₂ transfer (better for biomass), the static
12 condition optimizes the local signaling environment for QS, prioritizing light production.
13 The consistent finding that a higher biomass correlates with lower light-emission (an
14 inverse proportionality) is the most metabolically significant result.

15 This phenomenon can be attributed to the "bioluminescent paradox" (or metabolic
16 trade-off). The luminescence reaction consumes NADH/NADPH (to produce FMNH₂)
17 and Fatty Acids (to produce aldehydes) [31]. Both are essential cofactors needed for
18 cell growth and division. When biomass is high, the bacterium is typically prioritizing
19 cell division and growth, diverting resources like NADH towards the electron transport
20 chain (for ATP production) and fatty acids toward membrane synthesis. This limits the
21 substrates available for the luciferase pathway, resulting in lower light emission per cell.
22 The highest light emission is often observed just before or during the early stationary
23 phase, when growth ceases. At this stage, NADH is diverted away from reproduction
24 and toward the *lux* pathway [30], demonstrating a shift in metabolic strategy from
25 competitive growth to light production - potentially for ecological functions like anti-
26 predation or dispersal [33].

27 The preference for low temperatures (4°C-10°C) suggests that *Aliivibrio regenerae* sp.
28 nov. is a psychrotolerant species, unlike *A. fischeri*, which has an optimal temperature
29 range between 24°C and 28°C (i.e., mesophilic) [36]. Luciferases from psychrophilic
30 bacteria (such as those from *Photobacterium leiognathi*) are considered cold-adapted
31 enzymes. They tend to exhibit high catalytic activity within a narrow, cooler temperature
32 range [37].

33 Furthermore, some research suggests that bacteria adapted to low temperatures
34 possess a highly conjugated electron transfer system to the luciferase [38]. In colder
35 temperatures, the cell may be more efficient at diverting NADH to FMNH₂ (via the *lux*
36 pathway) instead of using it in the electron transport chain (which may be less efficient
37 in the cold), thereby ensuring a constant supply of substrate for light.

38 Bioluminescence is an exergonic reaction (energy-releasing), and luciferase is heat-
39 sensitive. Higher temperatures can lead to the thermal denaturation and inactivation of
40 the enzyme, as observed for the *Vibrio campbellii* luciferase above 37°C [38]. The low-
41 temperature environment stabilizes the quaternary structure of the luciferase,
42 maintaining it in its optimal conformation for longer, resulting in a more stable and
43 prolonged light emission.

44 In summary, the growth of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. is a finely tuned process where
45 environmental cues dictate a dynamic shift between a rapid, high-biomass strategy
46 (favored by MD, pH 6.5 or 9.0 and agitation initially at 10°C) and a sustained, high-
47 luminescence strategy (favored by BO1485, pH 6.5 and static conditions at 10°C),
48 reflecting its versatile adaptation to the diverse niches of the Blue Amazon.

54 Enzymatic and other metabolic assays

55 *Aliivibrio regenerae* sp. nov. showed a positive result for both catalase (see SM Figure
56 2a) and oxidase production (see SM Figure 2b). The strain grew on amylase, DNase,
57 protease, and lipase media; however, it only produced the protease enzyme, which
58 was confirmed by a 3 mm halo formation (see SM Figure 2c,d,e). *Aliivibrio regenerae*
59
60
61
62
63
64
65

1 sp. nov. also showed a positive result for the reduction of NO₃⁻ to NO₂⁻ (see SM
2 Figure 3).

3 The strain was not able to produce the enzyme 1-aminocyclopropyl-1-carboxylate
4 deaminase (see SM Figure 4a, b, c). It was, however, able to oxidize sulfur, with a halo
5 of 2 mm (see SM Figure 4d). The strain was not able to solubilize either phosphate or
6 potassium (see SM Figure 4e, f).

7 **Antibiotic susceptibility and hemolytic assay**

8
9 Although it shows susceptibility to clinically important antibiotics such as
10 Chloramphenicol and Ceftriaxone, *Aliivibrio regenerae* sp. nov. exhibits resistance to
11 several classes of widely used antibiotics (-lactams, aminoglycosides, quinolones)
12 (Table 3). This multiple resistance is a growing pattern in environmental bacteria,
13 especially within the Vibrionaceae family, due to exposure to antibiotic residues in
14 effluents and aquatic environments. The total resistance to first-line antibiotics like
15 Ampicillin and Ciprofloxacin suggests the presence of MGEs (mobile genetic elements)
16 or chromosomal mutations that warrant genomic investigation to determine the risk of
17 dissemination of resistance genes in the marine ecosystem [39, 40, 41]. Regarding the
18 hemolysis assay, *Aliivibrio regenerae* sp. nov. is considered alpha-hemolytic.
19
20
21

22 **Phylogenetic and phylogenomic analyses**

23
24 The evolutionary relationships and species identification of the isolate *Aliivibrio*
25 *regenerae* sp. nov. were investigated through phylogenetic analyses performed with
26 analysis based on the 16S rRNA gene and based on concatenated sequences of the
27 *gyrB*, *recA*, *pyrH*, and *rpoA* genes.

28 The phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene used *P. luminescens* as
29 outgroup to root the phylogenetic tree (Figure 4). The phylogenetic tree grouped the
30 *Aliivibrio regenerae* sp. nov. with the species of the *Aliivibrio* genus in a monophyletic
31 group. The grouping of this new species with *Aliivibrio logei*, *Aliivibrio salmonicida*,
32 *Aliivibrio finisterrensis* and *Aliivibrio fischeri* supports its classification within the
33 *Aliivibrio* genus.
34

35 The phylogenetic analysis based on concatenated sequences of the *gyrB*, *recA*, *pyrH*,
36 and *rpoA* genes used *V. cholerae* as an outgroup to root the phylogenetic tree (Figure
37 5). The phylogenetic tree revealed two major groups, clearly separating *A. fischeri* from
38 other *Aliivibrio* species. Within the group containing the other *Aliivibrio* species, well-
39 supported clades were observed for *A. finisterrensis* and *Aliivibrio sifiae*, along with
40 clades comprising other species such as *A. logei*, *A. salmonicida*, and various *Aliivibrio*
41 sp. strains. The *A. fischeri* clade revealed a polytomy that resolved the strains into two
42 major groups. The first group comprised the reference genome (ES114) and its related
43 strains. The second group could be subdivided into two distinct subgroups: one
44 containing the type strain (DSM 507) and related genomes, and another that included
45 *Aliivibrio regenerae* sp. nov. alongside other strains currently classified as *A. fischeri*.
46 This clear separation between the reference genome clade and the type strain clade
47 suggests the need to refine the current species definition, in further studies.
48

49 In this context, we investigated the possibility to establish *Aliivibrio regenerae* sp. nov.
50 as a new species by comparing its coding DNA sequences with those of the type strain
51 (*Aliivibrio fischeri* DSM507). Species identification was based on dDDH values
52 calculated by the GGDC platform, with values ≥70% considered indicative of the same
53 species. In this case, the dDDH value was 67.9%, suggesting enough genomic
54 divergence to support the classification of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. and *A. fischeri*
55 as distinct species (SM Table 3). The results of the dDDH indices from GGDC
56 comparison among *Aliivibrio* species are shown in Table 4.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Description of *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (re.ge.ne.rae. L. adj. regeneration; N.L. fem.).

Strain REG01485 was isolated from the Brazilian coastal sea. Its cells are Gram-negative small rods, and are motile by means of polar flagella. Circular, opaque, and ivory-colored colonies (0.5–2.0 mm in diameter) are formed on MD agar after 48 hours at 30°C. The strain is a facultative anaerobic chemoheterotroph. Growth occurs at temperatures ranging from 4 to 37°C, with an optimal light-emission from 4° to 20°C. The pH range for growth is 5.0–10, with an optimal light-emission at pH 6.5 (long cultures) or pH 9.0 (short cultures). The strain does not require NaCl for growth (it grows from 0-8%), but optimal light-emission occurs at concentrations of 3% (w/v). On agar media, it grows best on BO1485. In broth culture medium, it grows best on BO1485 (long cultures) and MD (short cultures). The strain tests positive for catalase, oxidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, amylase, and it reduces nitrate to nitrite. It is negative for alginase, DNase and lipase. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. shows resistance to ampicillin, oxacillin, erythromycin, gentamycin, ciprofloxacin, nalidixic acid, penicillin, streptomycin, kanamycin, and novobiocin. Hemolytic activity is positive (alpha-hemolytic). Substrate N-acetyl-D-glucosamine should be considered as carbon sources for this strain for growth and luminescence stimulation. Tween 80 also contributed to light-emission.

24
25
26

Conclusion

In summary, isolate REG001485 is distinguished from the reference strains of *A. fischeri* ES114 and *A. fischeri* DSM 507 by phylogenetic and phylogenomic approaches. Although *A. fischeri* forms a monophyletic group, genomic analyses reveal notable distinctions among its sequenced isolates. These differences, expected to be relatively minor within the same species, suggest that REG001485 should be classified as a new species. Moreover, the dDDH value for REG001485 and its closest related strain falls just below the accepted threshold for species delineation, further supporting this taxonomic separation. Additionally, other isolates were found to cluster closely with REG001485, indicating that their current species designations may also require revision in light of the genomic evidence. This strain can produce bioluminescence. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. is able to produce luminescence up to 100 days, when exposed to BO1485 media with NAG, pH 6.5 (buffered), 10°C und static condition. It should be noted that *Aliivibrio regenerae* sp. nov. is a promising candidate for various applications, including as whole-cell biosensors in ecotoxicology and environmental monitoring, non-invasive, real-time tracking of pathogens or tumor cells, diagnostics and sustainable lighting. The discovery of *A. regenerae* not only expands our knowledge of the genus's diversity but also reveals novel metabolic properties.

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Acknowledgements

We thank the National Land Transportation Agency (ANTT), Technological Development Resources (RDT), ECOVIAS CERRADO road concessionaire, and the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for their assistance during the project's development.

47
48
49
50
51
52
53
54

Author contributions

V.O.A., M.L.C.F.J., and A.M.S. designed the study. V.O.A., B.A.R.T., R.K.C., and J.S. performed the experiments and collected the data. V.O.A. and A.J.M. analyzed the data. J.S. wrote the original draft of the manuscript. V.O.A., A.M.S, and M.L.C.F.J.

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 reviewed and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the final
2 version of the manuscript.
3

4 **Funding** 5

6 This work was carried out with the support of Technological Development Resources
7 (RDT) [50500.252331/2022-84], provided by the Brazilian Concessionaire ECOVIAS
8 CERRADO, under the regulation of the National Land Transportation Agency (ANTT).
9

10 **Declarations** 11

12 **Conflicts of interest** 13

14 V.O.A.; J.S.; R.C.; B.A.R.T. are REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. employees;
15 M.L.C.F.J., and A.J.M. are REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A shareholders; A.M.S is
16 ECOVIAS CERRADO S.A. employee.
17
18

19 **Ethical approval and consent to participate** 20

21 Ethical approval was not required for this study as it did not involve vertebrate animals.
22 All microbial samples were collected and handled in accordance with the licenses
23 provided by the relevant Brazilian environmental agencies.
24

25 **Consent for publication** 26

27 All authors consent to this publication.
28
29
30

31 **References** 32

- 33 1. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial
34 Bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J*, 2018; 16:551–564. doi:
35 10.1016/j.csbj.2018.11.003.
- 36 2. Amaral DT, Kaplan RA, Takishita TKE, de Souza DR, Oliveira AG, Rosa SP. Glowing
37 wonders: exploring the diversity and ecological significance of bioluminescent
38 organisms in Brazil. *Photochem Photobiol Sci*, 2024; 23:1373–1392.
- 39 3. Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV. *Aliivibrio* gen. nov., a new
40 genus of the family Vibrionaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007a; 57:619–627.
- 41 4. Kloska A, Cech GM, Nowicki D, Maciąg-Dorszyńska M, Bogucka AE, Markert S,
42 Becher D, Potrykus K, Czaplowska P, Szalewska-Pałasz A. Three Microbial
43 Musketeers of the Seas: *Shewanella baltica*, *Aliivibrio fischeri* and *Vibrio harveyi*, and
44 Their Adaptation to Different Salinity Probed by a Proteomic Approach. *Int J Mol Sci*,
45 2022; 23:619.
46
- 47 5. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004;
48 68:403–431.
- 49 6. Lotufo LVC, Bolzani V da S. Medicamentos da Amazônia azul. *Ciênc Cult*, 2017;
50 69:4–5.
- 51 7. Baumann L, Baumann P, Mandel M, Allen RD. Taxonomy of aerobic marine
52 eubacteria. *J Bacteriol*, 1972; 110:402–429.
- 53 8. Feigl V, Ujaczki É, Vaszita E, Molnár M. Influence of red mud on soil microbial
54 communities: application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate
55 approach as a tool in soil microbiological studies. *Sci Total Environ*, 2017; 595:903–
56 911.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 9. Makariti IP, Grivokostopoulos NC, Skandamis PN. Effect of oxygen availability and
2 pH on adaptive acid tolerance response of immobilized *Listeria monocytogenes* in
3 structured growth media. *Food Microbiol*, 2021; 99:103826.
- 4 10. Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol*
5 *Rev*, 1997; 61:533–616.
- 6 11. Silva, K., Quisen, R.C., Degenhardt-Goldbach, J., Natalino, J.V., Balbinotti, J.H.G.,
7 Campos, E.B., Cruz, L.M. (2023) Metodologia para a seleção de bactérias promotoras
8 de crescimento com potencial de aumentar as taxas de enraizamento de *Pinus* spp.
9 Comunicado Técnico 495 – EMBRAPA. 12 p.
- 10 12. Dashtbin R, Mahmoudi N, Besharati H, Ghasemiyan R, Abdoallahi H. Identification
11 of sulfur-oxidizing bacteria from fishponds and their performance to remove hydrogen
12 sulfide under aquarium conditions. *Braz J Microbiol*, 2023; 54:3163–3172.
- 13 13. Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate
14 solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 1999; 170:265–270.
- 15 14. Rajawat MVS, Singh S, Tyagi SP, Saxena AK. A modified plate assay for rapid
16 screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere*, 2016; 26:768–773.
- 17 15. NCCLS (2003) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for
18 Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 6th
19 Edition, Wayne, Pennsylvania.
- 20 16. Slowing I, Wu CW, Vivero-Escoto JL, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticles for
21 reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small*, 2009; 5:57–62.
- 22 17. NCBI. Genome *Vibrionaceae*. Accessed: Apr. 25, 2025a. Available:
23 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=641>.
- 24 18. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
25 throughput. *Nucleic Acids Res*, 2004; 32:1792–1797.
- 26 19. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary
27 Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 2018; 35:1547–1549.
- 28 20. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New
29 algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the
30 performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 2010; 59:307–321.
- 31 21. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 2008;
32 25:1253–1256. doi: 10.1093/molbev/msn083.
- 33 22. Stöver BC, Müller KF. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from
34 different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*, 2010; 11:7.
- 35 23. NCBI. Genome *Aliivibrio*. Accessed: Apr. 25, 2025b. Available:
36 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=511678>.
- 37 24. Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B, Flouri T. ModelTest-NG: A
38 New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Mol*
39 *Biol Evol*, 2020; 37:291–294.
- 40 25. Meier-Kolthoff JP, Carbasse JS, Peinado-Olarte RL, Göker M. TYGS and LPSN: a
41 database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature
42 of prokaryotes. *Nucleic Acid Res*, 2022; 50:D801–D807.
- 43 26. Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J, Dunlap PV. Reclassification of *Vibrio*
44 *fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen.
45 nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and
46 *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007b; 57:2823–2829.
- 47 27. Miyashiro T, Ruby EG. Molecular ecology of the squid-*Vibrio* symbiosis. *Biol Bull*, 2012;
48 223:112–126.
- 49 28. Hunt DE, David DM, Moran MA. Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake
50 among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Appl Environ Microbiol*,
51 2008; 74:315–323.
- 52 29. Miyashiro T, Alis MDL, Ruby EG. The N-acetyl-D-glucosamine repressor NagC of
53 *Vibrio fischeri* facilitates colonization of *Euprymna scolopes*. *Mol Microbiol*, 2011;
54 82:874–888.
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

- 1 30. Verma SC, Miyashiro T. Bacterial bioluminescence: a review. *Crit Rev Microbiol*,
2 2013; 39:396–413.
- 3 31. Meighen EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev*, 1991;
4 55:123–142.
- 5 32. Mohammad MS, Asadpour L, Sharifi S, Rahimi E. Impact of Tween 80 on Fatty Acid
6 Composition in Two Bacterial Species. *Arch Razi Inst*, 2021; 76:1667–1677.
- 7 33. Ruby EG, McFall-Ngai MJ. Communicating with light: a tale of two kingdoms. *Nat*
8 *Med*, 1999; 5:748–750.
- 9 34. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its regulation and functions.
10 *Microbiol Rev*, 1979; 43:496–518.
- 11 35. Schaefer AL, Hanzelka BL, Eberhard A, Greenberg EP. Quorum sensing in the Lux
12 response of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*, 1996; 178:2269–2275.
- 13 36. Christensen DR, Visick KL. *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage, and
14 Common Phenotypic Assays. *Curr Protoc Microbiol*, 2020; 57:e104.
- 15 37. Trifonova E, Il'ichev P, Skriptsova A, Gnuchev S. Structure-Function Relationships
16 in Temperature Effects on Bacterial Luciferases: Nothing Is Perfect. *Biomolecules*,
17 2022; 12:1109.
- 18 38. Kuts SK, Ismailov AD. Physiological and emission characteristics of the
19 luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* from the White Sea.
20 *Microbiology*, 2009; 78:586–591.
- 21 39. Gxalo O, Digban TO, Igere BE, Olapade OA, Okoh AI, Nwodo UU. Virulence and
22 Antibiotic Resistance Characteristics of *Vibrio* Isolates From Rustic Environmental
23 Freshwaters. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021; 11:732001. doi:
24 10.3389/fcimb.2021.732001.
- 25 40. Sun H, Yao J, Long Z, Luo R, Wang J, Liu S-S, Tang L, Wu M. A new parameter for
26 quantitatively characterizing antibiotic hormesis: QSAR construction and joint toxic
27 action judgment. *J Hazard Mater*, 2024; 479:135767.
- 28 41. Zheng Z, Ye L, Xu Y, Chan E W-C, Chen S. Dynamics of antimicrobial resistance
29 and genomic characteristics of foodborne *Vibrio* spp. in Southern China (2013–2022). *J*
30 *Hazard Mater*, 2024; 479:135672.
- 31 42. Scheerer S, Gomez F, Lloyd D. Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous
32 culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *J Microbiol*
33 *Methods*, 2006; 67:321–329.
- 34 43. Cohen DT, Mashanova A, Rosen E, Soto W. Adaptation to temperature stress by
35 *Vibrio fischeri* facilitates this microbe's symbiosis with the Hawaiian bobtail squid
36 (*Euprymna scolopes*). *Evol Biol*, 2019; 46:291–300.
- 37 44. Richards RE, Lomas J, Horgan S, McInerney E. The effect of temperature and
38 NaCl concentration on the kinetic method of toxicity determination using *Vibrio fischeri*.
39 *Biosens Bioelectron*, 2007; 22:1184–1191.
- 40 45. Soto W, Castillo J, Rosén NM, Soto K, Swings J, Huisman J. Salinity and
41 temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse
42 ecological niches. *Microb Ecol*, 2008; 57:140–150.
- 43 46. Jang J, Wang M, Chen Z, Zhang X, Li Y. Antibiotic resistance of species isolated
44 from environmental samples: a review. *J Ocean Sci Technol*, 2017; 2:1–10.
- 45 47. Pinchuk VB, Berezhnoy N V, Lali H. The role of the system in quorum sensing and
46 virulence in spp. *FEMS Microbiol Lett*, 2008; 280:1–9.
- 47 48. Beaz-Hidalgo R, Doce A, Balboa S, Barja JL, Romalde JL. *Aliivibrio finisterrensis*
48 sp. nov., isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description
49 of the genus *Aliivibrio*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010; 60:223–228.
- 50 49. BacDive - The Bacterial Diversity Metadatabase. *Aliivibrio finisterrensis* | Type
51 strain | DSM 23419, CECT 7228, LMG 23869, CMJ 11.1 | BacDiveID:17254. 2025.
52 Disponível em: <https://bacdive.dsmz.de/>.
- 53 50. Yoshizawa S, Karatani H, Wada M, Yokota A, Kogure K. *Aliivibrio sifiae* sp. nov.,
54 luminous marine bacteria isolated from seawater. *J Gen Appl Microbiol*, 2010; 56:509–
55 518.

1 51. Khurulnova SA, Zavorokhina ZN, Krayukhina MA, Gnuchev ST, Dzhataev SA,
2 Rodionov DG. *Aliivibrio logei* KCh1 (Kamchatka Isolate): Biochemical and
3 bioluminescence characteristics and cloning of the *lux* operon. Microbiology, 2010;
4 79:349–355.

5 52. ISO 11348-3:2007. Water quality — Determination of the inhibitory effect of water
6 samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test).

7 CAPTIONS

8
9
10 Figure 1. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG01485) on agar media after 48h of
11 incubation at 30°C. a: MD; b: TCBS; c: BO1485; d: TS; e: Gram stain image
12 demonstrating a Gram-negative stain (100x); f: unstained optical microscopy image
13 (100x); g: colony image under optical microscopy (10x); h: colony image under optical
14 microscopy (4x); i: Light-emission by luminescence recorded in dark room.

15
16 Table 1. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) Biolog EcoPlate results. Biomass
17 values above 0.2 (OD₅₉₀) and light-emission values above 1000 (Lum) were considered
18 as positive results.

19
20
21 Figure 2. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. average growth (180 rpm, 30°C) exposed to
22 different broth media, NaCl concentrations, temperatures (°C), and pH levels. Biomass
23 was evaluated by optical density at 600 nm and light-emission by photons. One-way-
24 ANOVA results are above the graphs. The vertical lines denote 95% confidence
25 intervals standard deviation.

26
27 Table 2. Factorial-ANOVA results for *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) light-
28 emission and biomass. The analysis evaluates the effects of time (24h, 48h, 120h, 7,
29 14, 21, 28, 35, 45, 60 and 100 days), medium (MD, BO1485), pH (6.5 and 9.0) and
30 incubation strategy (0 rpm and 180 rpm).

31
32
33 Figure 3. Light-emission by luminescence (photons) and biomass (OD₆₀₀) of *Aliivibrio*
34 *regenerae* sp. nov. (REG001485) exposed to time (24h, 48h, 120h, 7, 14, 21, 28, 35,
35 45, 60 and 100 days), medium (MD, BO1485), pH (6.5 and 9.0) and incubation strategy
36 (0 rpm and 180 rpm) at 10°C. Factorial-ANOVA results are above the graphs. The
37 vertical lines denote 95% confidence intervals standard deviation.

38
39
40 Table 3. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) antibiotic susceptibility.

41
42 Figure 4. Phylogenetic tree of *Vibrionaceae* species. The phylogenetic tree was
43 inferred through Maximum Likelihood method, with the 16S rRNA gene sequences of
44 *Aliivibrio regenerae* sp. nov. and *Vibrionaceae* species reference genomes deposited in
45 NCBI. The branches with support values below 0.8 were collapsed. The monophyletic
46 group of *Aliivibrio* species and *Aliivibrio regenerae* sp. nov. is highlighted.

47
48
49 Figure 5. Phylogenetic tree of *Aliivibrio* species. The phylogenetic tree was inferred
50 through Maximum Likelihood method with concatenated gene sequences *gyrB*, *recA*,
51 *pyrH* and *rpoA* of isolate REG001485 and *Aliivibrio* species genomes deposited in
52 NCBI. The branches with support values below 0.8 were collapsed, (A) columns colors
53 indicate basal groups and (B) columns colors indicate monophyletic clades.

54
55
56 Table 4. Differential characteristics of *Aliivibrio* species. nd = no data; +/- = strain-
57 dependent [26, 36, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52].

Table 1. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) Biolog EcoPlate results. Biomass values above 0.2 (OD₅₉₀) and light-emission values above 1000 (Lum) were considered as positive results.

Substrate	Result (OD590nm)	Result (Lum)
Water	control	control
Pyruvic Acid Methyl Ester	-	-
Tween 40	-	-
Tween 80	-	+
α -Cyclodextrin	-	-
Glycogen	-	-
D-Cellobiose	-	-
α -D-Lactose	-	-
B-Methyl-D-Glucoside	-	-
D-Xylose	-	-
i-Erythritol	-	-
D-Mannitol	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+
D-Glucosaminic Acid	-	-
Glucose-1-Phosphate	-	-
D,L, α -Glycerol Phosphate	-	-
D-Galactonic Acid γ -Lactone	-	-
D-Galacturonic Acid	-	-
2-Hydroxy Benzoic Acid	-	-
4-Hydroxy Benzoic Acid	-	-
γ -Hydroxybutyric Acid	-	-
Itaconic Acid	-	-
α -Ketobutyric Acid	-	-
D-Mallic Acid	-	-
L-Arginine	-	-
L-Asparagine	-	-
L-Phenylalanine	-	-
L-Serine	-	-
L-Threonine	-	-
Glycyl-L-Glutamic Acid	-	-
Phenylethyl-amine	-	-
Putrescine	-	-

Table 2. Factorial-ANOVA results for *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) light-emission and biomass. The analysis evaluates the effects of time (24h, 48h, 120h, 7, 14, 21, 28, 35, 45, 60 and 100 days), medium (MD, BO1485), pH (6.5 and 9.0) and incubation strategy (0 rpm and 180 rpm).

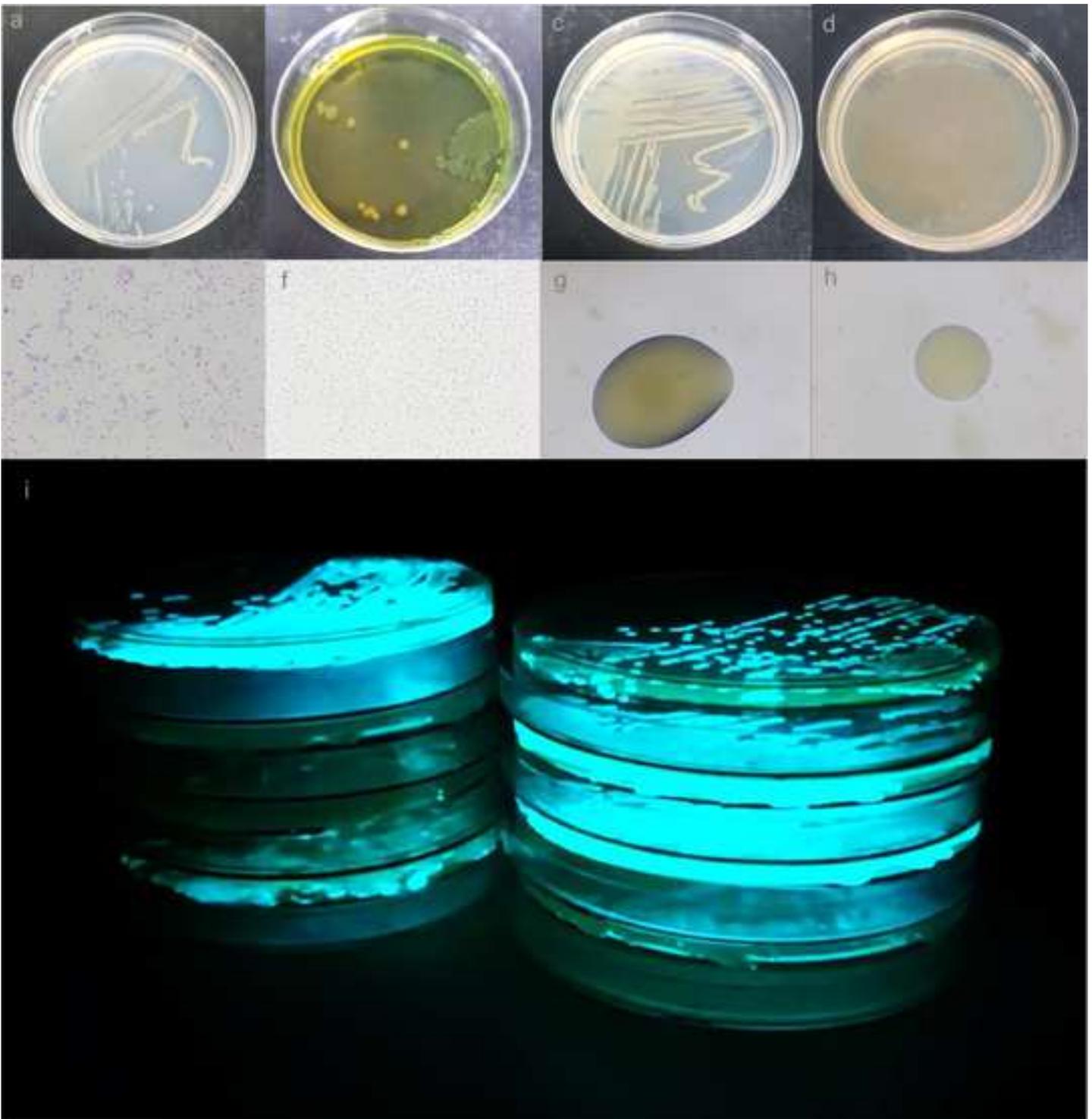
Light -emission					
Effect	SS	Degree of Freedom	MS	F	p
Time	6.25	10	0.63	69	0.000*
Media	1.24	1	1.24	137	0.000*
pH	0.94	1	0.94	104	0.000*
Incubation	11.67	1	11.67	1292	0.000*
Time x Media	4.31	10	0.43	48	0.000*
Time x pH	1	10	0.1	11	0.000*
Media x pH	0.03	1	0.03	3	0.067
Time x Incubation	1.96	10	0.2	22	0.000*
Media x Incubation	0.81	1	0.81	90	0.000*
pH x Incubation	0.04	1	0.04	4	0.041*
Time x Media x pH	0.58	10	0.06	6	0.000*
Time x Media x Incubation	1.17	10	0.12	13	0.000*
Time x pH x Incubation	0.09	10	0.01	1	0.404
Media x pH x Incubation	0	1	0	0	0.895
Time x Media x pH x Incubation	0.63	10	0.06	7	0.000*
Biomass					
Time	4.10E+11	10	4.09E+10	162.4	0.000*
Media	7.82E+08	1	7.82E+08	3.1	0.079
pH	1.32E+08	1	1.32E+08	0.5	0.470
Incubation	4.87E+09	1	4.87E+09	19.3	0.000*
Time x Media	1.10E+11	10	1.11E+10	44.5	0.000*
Time x pH	1.40E+11	10	1.38E+10	54.8	0.000*
Media x pH	7.61E+09	1	7.61E+09	30.2	0.000*
Time x Incubation	2.50E+11	10	2.50E+10	99.4	0.000*
Media x Incubation	4.43E+09	1	4.43E+09	17.6	0.000*
pH x Incubation	1.86E+09	1	1.86E+09	7.4	0.007*
Time x Media x pH	1.60E+11	10	1.58E+10	62.6	0.000*
Time x Media x Incubation	4.06E+10	10	4.05E+09	16.1	0.000*
Time x pH x Incubation	6.34E+10	10	6.35E+09	25.2	0.000*
Media x pH x Incubation	8.10E+09	1	8.10E+09	32.2	0.000*
Time x Media x pH x Incubation	7.70E+10	10	7.69E+09	30.5	0.000*

Table 3. *Aliivibrio regenerae* sp. nov. (REG001485) antibiotic susceptibility.

Antibiotics	Concentration	Unit	Inhibition	Halo (mm)
Ampicillin	10	mcg	-	0.0
Oxacillin	1	mcg	-	0.0
Chloramphenicol	30	mcg	+	12.0
Erythromycin	15	mcg	-	0.0
Gentamicin	10	mcg	-	0.0
Ciprofloxacin	5	mcg	-	0.0
Acid. Nalidixic	30	mcg	-	0.0
Penicillin	10	IU	-	0.0
Streptomycin	10	mcg	-	0.0
Tetracycline	30	mcg	+	2.5
Clindamycin	2	mcg	+	2.0
Ceftriaxone	30	mcg	+	11.0
Kanamycin	30	mcg	-	0.0
Novobiocin	5	mcg	-	0.0

Table 4. Differential characteristics of *Aliivibrio* species. nd = *no data*; +/- = *strain-dependent* [26, 36, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52].

Characteristic		<i>A. regenerae</i> sp. nov.	<i>A. fischeri</i>	<i>A. finisterrensis</i>	<i>A. sifiae</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. logei</i>	<i>A. kagoshimensis</i>
Growth in temperature (°C) at:	4°C	+	-	+	+	+	+	+
	10°C	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	-	+/-	-	-	-	-
	45°C	-	-	-	-	-	-	-
Optimal growth temperature (°C):		10-30	24-28	15-20	10-25	10-15	10-15	20-25
Optimal light-emission temperature (°C):		4-10	24	15-20	nd	4-10	15-20	20
Growth in NaCl at:	0%	+	-	-	-	-	-	+
	6%	+	-	-	-	-	-	-
NaCl optimal growth (%):		0.5-4	2	1-3	3-4	1-2	2-3	1-2
NaCl (%) optimal light -emission:		3	3	1.5-3	3	1	2.5-3	1.5
pH growth range:		5-10	6.5-8.0	5.5-9.5	7.0-8.0	6.0-11	6.5-9.0	5.5-9.5
pH optimal light -emission:		6.5	5.0-6.0	7.0-8.0	nd	7.0	7.0-8.0	7.0
Production of:	amilase	+	+/-	nd	-	-	-	-
	oxidase	+	+	+	+	+	+	+
	catalase	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of:	N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+
	L-Arginine	-	+/-	nd	+	+	+	-
	putrescine	-	+/-	nd	+	-	-	+
Reduce:	nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+
Antibiotic Resistance:	Ampicillin	+	+	nd	nd	+	+	-
	Oxacillin	+	+	+	+	+	+	+
	Chloramphenicol	-	-	nd	nd	-	-	-
	Erythromycin	+	-	+	+	+	+	-
	Gentamicin	+	-	nd	nd	-	-	-
	Ciprofloxacin	+	-	nd	nd	-	-	-
	Acid. Nalidixic	+	+/-	nd	nd	+	+	+
	Penicillin	+	+	+	+	+	+	+
	Streptomycin	+	+/-	nd	nd	+	+	-
	Tetracycline	-	-	nd	nd	-	-	+
	Clindamycin	-	nd	+	+	-	-	+
	Ceftriaxone	-	-	nd	nd	-	-	+
	Kanamycin	+	+/-	nd	nd	+	+	-
	Novobiocin	+	+	+	+	+	+	+
	Genomic information:	DNA G+C content (mol%)	38.3	38.35	39.06	37.35	38.97	38.97
Genome similarity (dDDH - %)		-	67.9	25.3	23.3	22.7	22.3	19.9



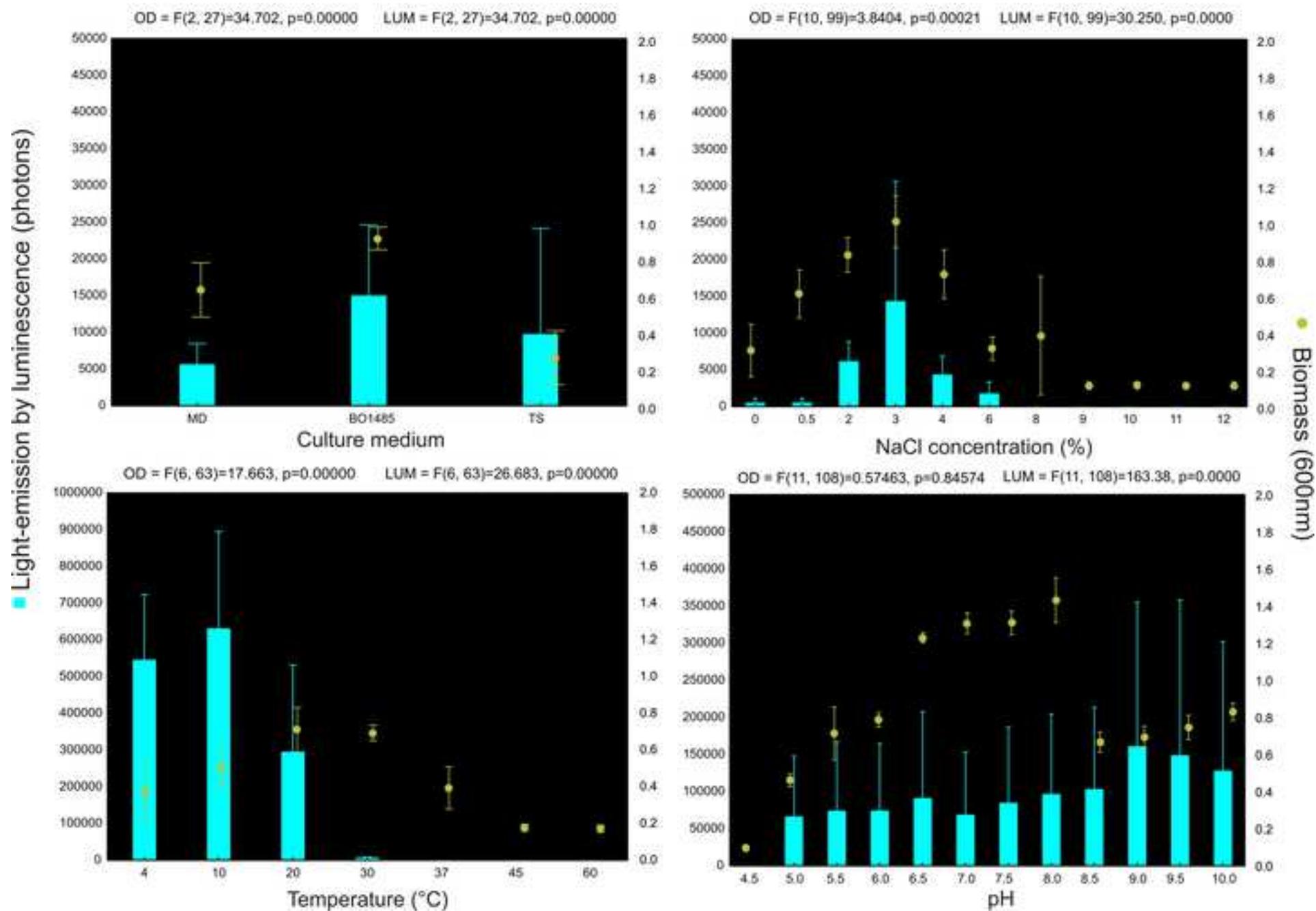


Figure 3

[Click here to access/download;Figure;Figure 3.JPG](#)

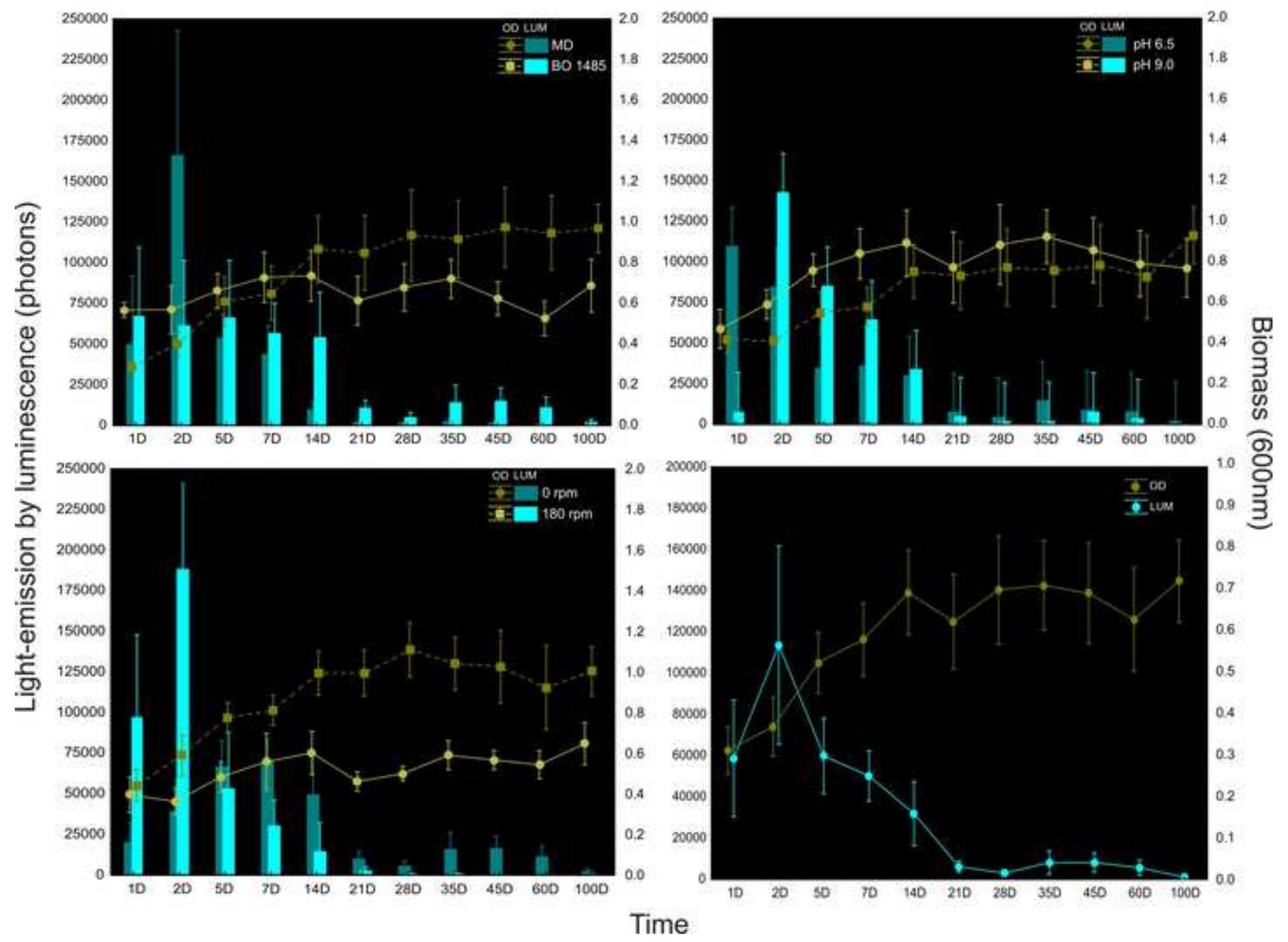
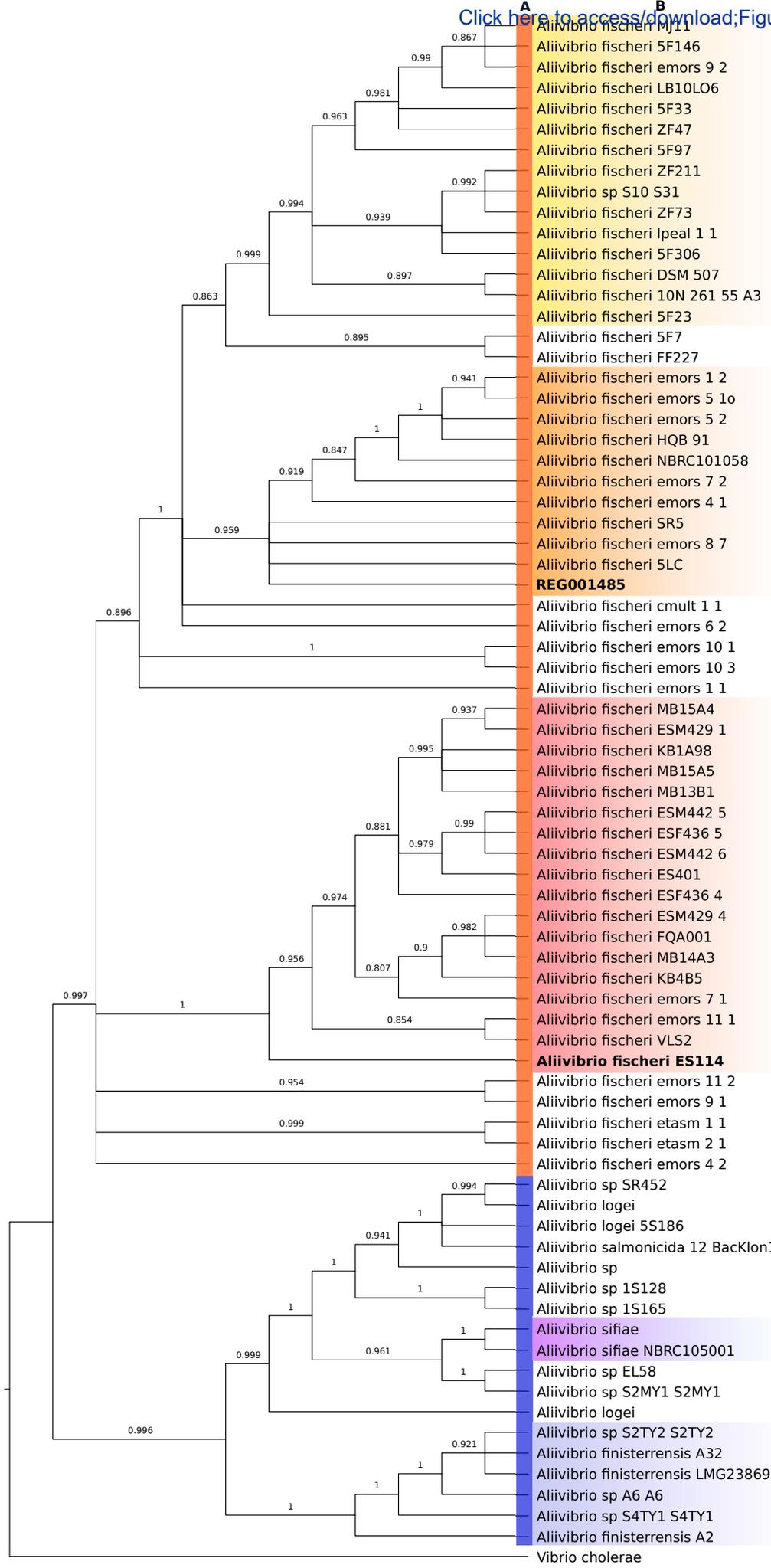


Figure 5

[Click here to access/download;Figure;Figure_05_EPS.eps](#)



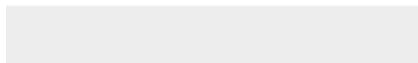
0.05



Click here to access/download

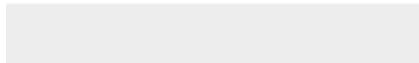
Supplementary Material

Bioluminescencia_ SUPPLEMENTARY MATERIAL.docx





Click here to access/download
Supplementary Material
Certificate_A. regenerae_ass.pdf



Brazilian Journal of Microbiology

Identification of the new species *Shewanella regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable marine bacteria able to produce electricity --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Identification of the new species <i>Shewanella regenerae</i> sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable marine bacteria able to produce electricity
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Environmental and Biodiversity
Funding Information:	RDT (50500.252331/2022-84) Not applicable
Abstract:	<p>A bacterial strain, designated REG000848, was isolated from the Brazilian coastal marine environment, known as Blue Amazon. A comprehensive characterization, including genomic, phylogenetic, biochemical, and morphological data, distinguishes this new species from its known congeners, leading to its identification as <i>Shewanella regenerae</i> sp. nov.. The strain is a Gram-negative, facultative anaerobe, and is motile by means of polar flagella. It is orange-pigmented and rod-shaped. Strain REG000848 grows at temperatures ranging from 4–45°C (with an optimum at 30°C), in NaCl concentrations of 0-12% (with an optimum at 2-8%), and at a pH of 4.5–10.0 (with an optimum at 6.5–8.0). On agar media, it grows best on MD. In broth culture, it thrives best in TN medium. The isolate REG000848 is classified within the genus <i>Shewanella</i> but is clearly distinct from the reference species based on both phylogenetic and phylogenomic analyses. The isolate REG000848 is closely related to <i>S. schlegeliana</i>, <i>S. halifaxensis</i>, and <i>S. pealeana</i>. However, the dDDH and ANI values between REG000848 and these closest relatives fall well below the commonly accepted species delineation threshold of 70% and 95%, respectively, reinforcing its genomic distinctiveness. These findings, therefore, provide strong evidence supporting the classification of REG000848 as a novel species within the genus <i>Shewanella</i>. This strain can produce electricity associated with its ability to transfer electrons to extracellular acceptors, a process known as extracellular electron transfer. This process holds great potential for innovation in sustainable electricity generation. Microbial fuel cells based on <i>Shewanella regenerae</i> sp. nov. presented open-circuit voltage up to 250 mV without prior biofilm formation, which indicates a higher bioelectroactivity potential. The discovery of <i>S. regenerae</i> not only expands our knowledge of the genus's diversity but also reveals novel metabolic properties.</p>
Corresponding Author:	Vanessa Ochi Agostini, PhD Regenera Moléculas do Mar Porto Alegre, RS BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Regenera Moléculas do Mar
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jéssica Scherer
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jéssica Scherer Mário Luiz Conte da Frota Júnior Bryan Augusto da Rosa Tavares Adilar Gonçalves Gabriel Stracke Oliveira Andressa de Moura Silva

	Célia de Fraga Malfatti
	Cristiano Krug
	Alexandre José Macedo
	Vanessa Ochi Agostini, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	<p>Dear Editor-in-Chief from Brazilian Journal of Microbiology, We are pleased to submit our manuscript entitled "Identification of the new species <i>Shewanella regenerae</i> sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable marine bacteria able to produce electricity" for consideration for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.</p> <p>This manuscript presents the comprehensive polyphasic taxonomic description of a novel bacterial species, <i>Shewanella regenerae</i> sp. nov., isolated from the coastal marine environment of the Brazilian Blue Amazon. This work adheres perfectly to the scope of Brazilian Journal of Microbiology by employing a rigorous combination of genomic, phylogenetic, biochemical, and morphological data to delineate this new taxon. The manuscript's relevance extends beyond classification, highlighting a significant finding in microbial bioelectroactivity. <i>S. regenerae</i> sp. nov. is a potent electrogenic bacterium, demonstrating an open-circuit voltage (OCV) of up to 250 mV in microbial fuel cells (MFCs). Critically, this activity was observed without the prerequisite for prior anodic biofilm formation. This suggests a highly efficient and direct extracellular electron transfer (EET) mechanism, a finding of high biotechnological importance for optimizing the design and accelerating the start-up of MFCs for sustainable electricity generation. Specifically, our phylogenomic analyses (dDDH and ANI values) confirm that the strain is clearly distinct from its closest relatives within the genus <i>Shewanella</i>, falling well below the accepted species delineation thresholds of 70% and 95%, respectively.</p> <p>We confirm that this manuscript is original, has not been published elsewhere, and is not currently under consideration for publication by any other journal. All authors have read and approved the final manuscript and agree to its submission to Brazilian Journal of Microbiology.</p> <p>We believe that the rigorous systematic methods combined with the novelty of an efficient, biofilm-independent electrogenic mechanism make this manuscript a compelling and timely fit for your readership.</p> <p>Thank you for your time and consideration. We look forward to your decision.</p> <p>Sincerely, Dr. Vanessa Ochi Agostini* *Corresponding Author: nessaochi@gmail.com Affiliation: Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil</p>

Identification of the new species *Shewanella regenerae* sp. nov. from Blue Amazon reveals unexplored diversity of cultivable marine bacteria able to produce electricity

Jéssica Scherer¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Bryan Augusto da Rosa Tavares¹, Adilar Gonçalves³, Gabriel Stracke Oliveira¹, Andressa de Moura Silva², Célia de Fraga Malfatti³, Cristiano Krug⁴, Alexandre José Macedo¹, Vanessa Ochi Agostini^{1*}

¹ Regenera Moléculas do Mar – Avenida Ipiranga 6681, prédio 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Ecovias Cerrado – Rua Sintra 50 - Sala 01 – CEP 38406-643, Granja Marileusa, Uberlândia – MG, Brazil.

³ LAPEC – Laboratório de Pesquisa em Corrosão – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Av. Bento Gonçalves, 9500 – Setor IV - prédio 43427, 2º Andar, CEP 91501-970, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Av. Bento Gonçalves, 9500 – prédio 43176, CEP 91501-970, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: *voagostini@gmail.com

Abstract

A bacterial strain, designated REG000848, was isolated from the Brazilian coastal marine environment, known as Blue Amazon. A comprehensive characterization, including genomic, phylogenetic, biochemical, and morphological data, distinguishes this new species from its known congeners, leading to its identification as *Shewanella regenerae* sp. nov.. The strain is a Gram-negative, facultative anaerobe, and is motile by means of polar flagella. It is orange-pigmented and rod-shaped. Strain REG000848 grows at temperatures ranging from 4–45°C (with an optimum at 30°C), in NaCl concentrations of 0-12% (with an optimum at 2-8%), and at a pH of 4.5–10.0 (with an optimum at 6.5–8.0). On agar media, it grows best on MD. In broth culture, it thrives best in TN medium. The isolate REG000848 is classified within the genus *Shewanella* but is clearly distinct from the reference species based on both phylogenetic and phylogenomic analyses. The isolate REG000848 is closely related to *S. schlegeliana*, *S. halifaxensis*, and *S. pealeana*. However, the dDDH and ANI values between REG000848 and these closest relatives fall well below the commonly accepted species delineation threshold of 70% and 95%, respectively, reinforcing its genomic distinctiveness. These findings, therefore, provide strong evidence supporting the classification of REG000848 as a novel species within the genus *Shewanella*. This strain can produce electricity associated with its ability to transfer electrons to extracellular acceptors, a process known as extracellular electron transfer. This process holds great potential for innovation in sustainable electricity generation. Microbial fuel cells based on *Shewanella regenerae* sp. nov. presented open-circuit voltage up to 250 mV without prior biofilm formation, which indicates a higher bioelectroactivity potential. The discovery of *S. regenerae* not only expands our knowledge of the genus's diversity but also reveals novel metabolic properties.

Keywords: marine environment; electrogenic bacteria; new species record.

Introduction

The marine environment is a vast and underexplored reservoir of microbial biodiversity. This diversity represents a crucial source of novel compounds and metabolic processes with biotechnological potential, from enzyme production to bioremediation and bioenergy. The increasing demand for sustainable solutions has directed research

1 toward marine microorganisms, aiming to discover new functionalities that can be
2 applied in various fields [1].

3 The family Shewanellaceae includes Gram-negative, facultative anaerobic bacteria that
4 are widely distributed in aquatic environments. Members of the genus *Shewanella* are
5 particularly notable for their ability to transfer electrons to extracellular acceptors, a
6 process known as extracellular electron transfer (EET). This characteristic gives them
7 the capacity to produce electricity in microbial fuel cells (MFCs) [2] and to reduce heavy
8 metals, such as iron and manganese, in bioremediation processes [3, 4].

9 Despite the biotechnological importance of *Shewanella*, the true extent of its diversity
10 and metabolic capabilities remains underexplored. *Shewanella* is a
11 gammaproteobacterial genus globally distributed in marine and freshwater ecosystems,
12 including sediments and host-associated environments. Most of the described species
13 have been isolated from superficial and benthic oceanic environments, but many
14 marine niches have yet to be thoroughly investigated [5].

15 Since the first discovery in food spoilage in 1931, an increasing number of *Shewanella*
16 species have been isolated and identified [6]. *Shewanella* species have a diverse
17 respiratory ability and wide distribution in environments. They play an important role in
18 bioremediation and the biogeochemical cycles of elements, being capable of reducing
19 various electron acceptors such as iron oxide, manganese oxide, dimethyl sulfoxide,
20 some radionuclides, and toxic elements like Cr [7].

21 In this paper, we propose the description of a new bacterial species isolated from the
22 coast of Brazil, known as Blue Amazon, which we have identified as *Shewanella*
23 *regenerae* sp. nov.. A comprehensive characterization, which includes genomic,
24 phylogenetic, biochemical, and morphological data, was used to distinguish this new
25 species from its known congeners.
26
27

28 **Materials and Methods**

29 **Bacteria strain**

30
31
32
33 The bacterial strain REG000848, described as *Shewanella regenerae* sp. nov., was
34 isolated from Blue Amazon region, more specific in Brazilian coastal marine
35 environment by diving at coordinates 27°18.32'S and 48°16.44'W in February 2015.
36 Standard microbiological methods were used for the isolation [8]. The isolate has been
37 deposited in the Regenera' Bank in Porto Alegre, RS, Brazil. The strain was maintained
38 as stab cultures in MD, ACM, and SM broth, supplemented with 15% glycerol, and
39 stored at -20°C. (See the media description in Supplementary Material – SM Table 1).
40
41

42 **Morphology and Growth**

43
44 The cellular morphology and motility of the novel isolate were observed using optical
45 microscopy (100x) via the drop technique. Gram staining was performed using the
46 modified Hucker method (Conn et al. 1957). The bacteria were grown on different agar
47 (MD, TCBS, TN, and TS) and in broth (MD, TN and TS) media (see SM Table 1). The
48 bacterium from the agar media was incubated at 30°C for 48h, while the bacterium
49 from the broth media was incubated with agitation (180 rpm) at 30°C for 168h. In this
50 case, the optical density (OD) was recorded using a spectrophotometer (600nm)
51 (BioTek Synergy H1 - Agilent) at 6h, 24h, 48h, 72h, and 168h, and was used as an
52 estimation of bacterial biomass.
53

54 Ranges of NaCl concentration for growth were determined on TS medium
55 supplemented with NaCl at concentrations ranging from 0% to 12% (0, 0.5, 2, 3, 4, 6,
56 8, 9, 10, 11, 12%). Growth at different temperatures (4, 10, 20, 30, 37, 45, 60°C) and
57 buffered pH levels (4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10) were determined on MD
58 medium. The assays had an initial optical density of 0.05 at 600 nm and were
59 incubated with agitation (180 rpm) at 30°C. Biomass was estimated at 6h, 24h, 48h,
60
61
62
63
64
65

1 72h, and 168h using a spectrophotometer to measure absorbance at 600 nm. Oxygen
2 requirements were evaluated using thioglycolate semi-solid medium [9].
3

4 **Extracellular electron transfer characteristics**

5 To evaluate the bioelectroactivity of *Shewanella regenerae* sp. nov., an assay was
6 performed in two liquid media, MD and TN, both with and without the addition of 3%
7 NaCl. The cultures were exposed to both static (0 rpm) and agitated (180 rpm)
8 conditions at pH 8 and 30°C, representing optimal growth conditions based on previous
9 results. The assay lasted 28 days, with analyses of OD₆₀₀ (in a 50 mL Falcon tube
10 containing a 15 mL inoculum) and open-circuit voltage – OCV (in a microbial fuel cell –
11 MFC with a 7 mL inoculum) performed at 0, 24, 48, 120, 168 hours, and on days 14,
12 21, and 28. Optical density was measured using a spectrophotometer and OCV was
13 measured with a multimeter (BOM-6007-BOMVINK). A standard multimeter is
14 commonly used to measure the output voltage of a MFC [10, for instance]. Though it is
15 important to note that a basic multimeter measures the electric potential difference
16 (voltage) between two points in a circuit, not the intrinsic "potential" of the bacteria
17 themselves, the maximum power generation of the device is proportional to the square
18 of the OCV [11]. The initial OD was 0.05 and the inoculum was added to the MFC
19 without prior biofilm formation. The MFC model is shown in SM Figure 1.
20
21
22
23

24 **Functional Diversity and Biochemical Tests**

25 The Biolog EcoPlate™ (Biolog, Hayward, California) assay is a method used to assess
26 bacterial functional diversity [12]. It utilizes a 96-well microplate containing 31 different
27 carbon sources, categorized into carbohydrates, carboxylic acids, amino acids, amines,
28 and polymers, along with a control well. The microorganisms are inoculated into the
29 plate, and their metabolic activity is monitored by observing the color change of a
30 redox-sensitive dye as they consume the substrates. The degree of color development
31 in each well indicates the extent to which the microorganisms have utilized a particular
32 carbon source. To perform the assay, the bacteria were grown on solid MD medium for
33 24 hours at 30°C. The bacteria were then suspended in 0.9% saline, and the OD₆₀₀
34 was measured. In each plate well, 150 µL of a strain suspension (OD₆₀₀ = 0.085–
35 0.095) was added. Plates were maintained at 30°C for 72 hours. Absorbance readings
36 were performed at 590 nm at 0h and 72h.
37
38
39
40

41 **Enzymatic and other metabolic assays**

42 The catalase assay was used to identify the presence of the enzyme responsible for
43 decomposing hydrogen peroxide (H₂O₂). The bacterium was cultured on MD agar
44 medium and incubated at 30°C for 24 hours. The reagent, 30% H₂O₂, was pipetted
45 onto the colony. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) was used as a negative control,
46 while *Staphylococcus aureus* (ATCC 33592) was used as a positive control.
47

48 The oxidase assay is used to identify bacteria that possess the cytochrome c oxidase
49 enzyme, which participates in the electron transport chain using oxygen as the final
50 electron acceptor. The test uses the reagent tetramethyl-p-phenylenediamine (1%),
51 which is pipetted onto the colony. For this test, the bacteria were cultured on MB
52 medium and incubated at 30°C for 24 hours. When present, the enzyme oxidizes the
53 reagent, resulting in a color change to purple or dark blue. *Escherichia coli* (ATCC
54 25922) was used as a negative control, and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)
55 was used as a positive control. The production of the amylase (hydrolyzes starch),
56 protease (catalyzes the breakdown of peptide bonds in proteins), lipase (breaks down
57 fats), alginate lyase (degrades alginate), and DNase (degrades DNA) enzymes was
58
59
60
61
62
63
64
65

1 evaluated on a specific solid medium (see SM Table 1). After 48 hours of incubation at
2 30°C, strain growth and halo formation were observed.

3 The nitrate reduction assay in BHI broth was used to determine whether the bacteria
4 were capable of reducing nitrate (NO₃⁻) to nitrite (NO₂⁻) or other nitrogenous
5 compounds [13]. The presence of nitrite is detected by the formation of a red color after
6 the addition of specific reagents (sulfanilamide and N-(1-Naphthyl)ethylenediamine
7 dihydrochloride). *Escherichia coli* (ATCC 25922) was used as a positive control.

8 The ability of *Shewanella regenerae* sp. nov. to produce the enzyme 1-
9 aminocyclopropyl-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) was evaluated. To
10 determine the presence of ACC deaminase, DF minimal salt agar medium was
11 prepared with and without nitrogen (NH₄Cl) and with the addition of bromothymol blue.
12 Bacterial growth was observed in the different media. Positive results were considered
13 when growth occurred in both DF+ACC and DF+NH₄Cl media, but not in DFBase
14 medium (without ACC or NH₄Cl) [14].

15 The ability of *Shewanella regenerae* sp. nov. to oxidize sulfur was also evaluated on
16 STARKEY agar medium, with a positive result indicated by the observation of yellow
17 colonies and halo formation [15]. The ability of *Shewanella regenerae* sp. nov. to
18 solubilize phosphate and potassium was evaluated on NBRIP [16] and ALEK [17] agar
19 media, respectively. In all cases, a suspension of *Shewanella regenerae* sp. nov. in
20 0.9% saline (OD₆₀₀ = 0.085–0.095) was inoculated (10 µL) in quadruplicate in each
21 medium and incubated at 30°C for 48 hours.

22 **Antibiotic susceptibility and hemolytic assay**

23
24
25
26
27 Antimicrobial-impregnated filter paper discs (Cecon©) were placed in duplicate on the
28 surface of MD agar previously inoculated with a uniform lawn of *Shewanella regenerae*
29 sp. nov. After the antimicrobial diffused into the culture medium, a concentration
30 gradient formed around each disc. After incubation (48h at 30°C), the presence of the
31 antimicrobial in the medium either inhibited bacterial growth or it did not, as observed
32 by the formation or absence of an inhibition zone [adapted from 18].

33 The hemolytic capacity of *Shewanella regenerae* sp. nov. was also evaluated. To this
34 end, a suspension of the bacterial strain in 0.9% saline (OD₆₀₀ = 0.085-0.095) was
35 inoculated (10 µL) in quadruplicate on blood agar and incubated at 30°C for 24 hours.
36 This assay allows for a preliminary assessment of possible pathogenicity and/or toxicity
37 through the alteration, dissolution, or destruction of red blood cells. The result is
38 classified as: beta-hemolytic, when complete hemolysis of red blood cells occurs,
39 forming a transparent zone around the colony; alpha-hemolytic, characterized by partial
40 hemolysis associated with a partial loss of hemoglobin from red blood cells, resulting in
41 a gray-green zone in the culture medium and around the colony; gamma-hemolytic,
42 represented by the absence of hemolysis [19].

43 **Phylogenetic and phylogenomic analyses**

44
45
46
47
48 The evolutionary relationships and species identification of the isolate *Shewanella*
49 *regenerae* sp. nov. were investigated through a two-step approach combining
50 phylogenetic and phylogenomic analyses. In the first step, a phylogenetic analysis was
51 conducted to infer the isolate's taxonomic placement at the genus level within the
52 Shewanellaceae family (inter-genus resolution). In the second step, phylogenomic
53 analyses were performed to resolve its species-level classification within the identified
54 genus (intra-genus resolution).

55 The identification of the isolate genus was conducted through phylogenetic analysis by
56 comparing the 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequence *Shewanella regenerae*
57 sp. nov. with 16S rRNA gene sequences recovered from the reference genomes of all
58 species within the Shewanellaceae family available in NCBI [20]. The recovered
59 sequences were filtered to select the largest 16S rRNA gene per genome, with a length
60
61
62
63
64
65

1 greater than 1000 nucleotides, resulting in a dataset of 93 reference genomes. These
2 sequences were aligned using MUSCLE [21], as implemented in MEGA software [22].
3 Phylogenetic inference was performed using PhyML [23] under the Transversional
4 Model with Invariable sites and Gamma-distributed rate variation across four categories
5 (TVM+I+G4), as predicted by ModelTest-NG [24]. Branch support was evaluated using
6 Shimodaira-Hasegawa-like (SH-like) values in PhyML software, and branches with
7 support values below 0.8 were collapsed. The resulting phylogenetic tree was
8 subsequently visualized and edited using TreeGraph [25] and FigTree software.

9 The species determination of the isolate was conducted through phylogenomic
10 analyses by comparing the sequences of the *gyrA*, *gyrB*, *infB*, *recN*, *rpoA*, and *tpoA*
11 genes of *Shewanella regenerae* sp. nov. with homologous sequences recovered from
12 all Shewanellaceae reference strains available in NCBI, considering only reference
13 genomes annotated by the NCBI RefSeq database. The recovered sequences were
14 filtered to select the *gyrA*, *gyrB*, *infB*, *recN*, *rpoA*, and *tpoA* sequences. A total of 107
15 reference strain genomes were recovered. These sequences were aligned using
16 MUSCLE [21] implemented in MEGA software [22]. The phylogenetic inference was
17 performed using PhyML [23] under General Time Reversible model with Invariable sites
18 and Gamma-distributed rate variation across four categories (GTR+I+G4) as predicted
19 by ModelTest-NG [24]. Branch support was evaluated using Shimodaira-Hasegawa-like
20 (SH-like) values and performed with PhyML software, and branches with support
21 values below 0.8 were collapsed. The final phylogenetic tree was visualized and edited
22 using TreeGraph [25] and FigTree software.

23 The evolutionary relationships and species identification of isolate were also
24 investigated using a genome-based taxonomic approach. Phylogenomic analyses were
25 conducted with the Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) platform [26] to
26 calculate the digital DNA-DNA hybridization (dDDH) with the closest related species to
27 *Shewanella regenerae* sp. nov.. The dDDH values were reported along with their
28 confidence intervals for three different GGDC formulas: formula d0, which corresponds
29 to the total length of all High-Scoring Segment Pairs (HSPs) divided by the total
30 genome length; formula d4, which is the sum of all identities found in HSPs divided by
31 the total length of all HSPs; and formula d6, which is the sum of all identities found in
32 HSPs divided by the total genome length. Notably, formula d4 is independent of
33 genome length. For this reason, formula d4 is often preferred in phylogenomic studies,
34 as it minimizes biases caused by differences in genome sizes and completeness. In
35 addition to dDDH, Average Nucleotide Identity (ANI) was calculated using FastANI [27].
36 The ANI values were consistent with the dDDH results, with ANI values $\geq 95\%$
37 corresponding to dDDH values $\geq 70\%$, which is a widely accepted threshold for species
38 delineation.
39
40
41
42

43 **Results and Discussion**

44 **Morphology**

45 The novel isolate was able to grow on all agar media described in SM Table 1,
46 however, MD medium showed the most representative growth (Figure 1a, b, c, d). The
47 cells were classified as Gram-negative rods (Figure 1e), and were motile by means of
48 polar flagella (Figure 1f; see SM Video 1).

49 Under optimal conditions (MD; 30°C; 48h), the cells of the novel isolate were 2–3 μm in
50 length. The colonies were entire, smooth, opaque, and ivory-colored (0.5–2.5 mm in
51 diameter) (Figure 1g, h). When the biomass was high, it presented an orange color.

52 **Growth and extracellular electron transfer characteristics**

1 Regarding oxygen requirement, the strain was considered a chemoheterotrophic
2 facultative anaerobe (see SM Figure 2). In broth media, the bacterial strain grew best in
3 TN, followed by MD, and TS (Figure 2). The novel isolate was able to grow at NaCl
4 concentrations ranging from 0–12%, with an optimal concentration for growth between
5 2–8%. The bacteria were able to grow at temperatures from 4–45°C, with optimum
6 growth occurring at 30°C. The strain also grew at pH levels from 4.5 to 10, with
7 optimum growth at pH 6.5–8 (see Figure 2 and SM Table 2).

8 Differences were observed between the factors that most positively affected OCV and
9 biomass of *Shewanella regenerae* sp. nov. For OCV, only the time factor and the
10 interaction between time and culture medium were significant (Table 1).

11 The TN medium showed a significant OCV between 24 and 168 hours when compared
12 to control (dashed line). The MD medium showed a significant OCV between 48 hours
13 and 28 days. The media with added salt, on the other hand, showed a significant OCV
14 between 48 hours and 28 days (TN + 3% NaCl) and 120 hours and 14 days (MD + 3%
15 NaCl) (Figure 3). TN was the treatment that reached a significant OCV the fastest,
16 while the longest durability was recorded for the MD and TN + 3% NaCl treatments.
17 The highest OCV value recorded was observed for TN + 3% NaCl (Table 2).

18 *Shewanella* species are known for their ability to transfer electrons to an electrode, a
19 process called Extracellular Electron Transfer (EET). This ability makes them ideal for
20 use in Microbial Fuel Cells (MFCs). MFC performance has been evaluated in terms of
21 voltage, current, power, current density (electric current divided by electrode surface
22 area) or power density (electric power divided by electrode surface area) [28]; in the
23 present study we use OCV as figure of merit. The results indicate that the energy
24 production potential of *Shewanella regenerae* sp. nov. is highly influenced by its
25 environment. The highest OCV (maximum = 250 mV) was obtained in TN medium with
26 the addition of 3% NaCl and without agitation. This suggests that this species may be
27 particularly efficient in high-salinity environments and under undisturbed conditions.

28 According to Guo et al. [29], substrate salinity is a critical factor in MFC performance.
29 However, a further increase in salinity can cause inhibition of bacterial activity. The
30 salinities recorded for each medium (TN, MD, TN+3% NaCl, MD+3% NaCl) were 50,
31 35, 83, and 62 PSU. In this case, the increase in salt does not appear to have
32 significantly compromised the growth of the microorganism. *Shewanella regenerae* sp.
33 nov. can tolerate a range of salt concentrations, as observed in Table 1. While
34 important, biomass does not directly correlate with maximum OCV, indicating that
35 electron transfer efficiency (EET) is a more critical factor than cell number.

36 *Shewanella putrefaciens* is one of the most studied species in MFCs and is often used
37 as a reference. It demonstrates robust performance, generating OCV of up to 395 mV
38 under ideal conditions [30]. *Shewanella frigidimarina* (NCIMB 400) and *Shewanella*
39 *livingstonensis* are psychrophilic species, which are promising for MFCs operating at
40 low temperatures (4–10°C). Their ability to generate energy in cold environments
41 makes them selective for applications in polar regions or in the treatment of cold
42 wastewater, where most mesophilic bacteria would not be efficient [31, 32, 33].
43 Although the optimal temperature for *Shewanella regenerae* sp. nov. is 30°C, this strain
44 is capable of surviving at temperatures ranging from 4°C to 45°C, making it an
45 excellent candidate for applications in both low and high-temperature environments.

46 The potential of *Shewanella regenerae* sp. nov. for electrical energy production is
47 remarkable, without the need for prior anodic biofilm formation. In contrast, the high
48 current density of other electrogenic microorganisms, such as the widely studied
49 *Shewanella oneidensis* MR-1 [3] and other species such as *S. putrefaciens* [34],
50 fundamentally depends on the formation and maturation of an anodic biofilm. This is a
51 time-consuming step that can limit the efficiency of the system [2]. The ability of *S.*
52 *regenerae* to produce energy robustly and independently of a biofilm suggests a highly
53 efficient and direct extracellular electron transfer mechanism, which may involve the
54 high production of soluble mediators such as flavins. This revolutionary potential not
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 only accelerates the start-up process of MFCs but also paves the way for optimizing
2 the design of these devices, focusing on high-performance planktonic species.

3 **Functional Diversity and Biochemical Tests**

4
5 The substrate that showed the highest growth of *Shewanella regenerae* sp. nov. was L-
6 serine. A study by Yang et al. [35] evaluated the potential of eight different amino acids
7 for electricity production in microbial fuel cells. The results showed that potential was
8 directly related to the amino acids L-serine (720 mg L⁻¹), demonstrating its potential to
9 enhance the desired activity. Other substrates such as L-threonine, glycyl-L-glutamic
10 acid, N-acetyl-D-glucosamine, and Tween 40 should also be considered as carbon
11 sources for this strain (Table 3).

12
13 The cultivation of microorganisms for bioenergetic applications, particularly within
14 MFCs, hinges on a precise understanding of their nutritional requirements. For the
15 genus *Shewanella*, a group of bacteria renowned for their ability to perform EET, the
16 availability of specific amino acids and carbon substrates is not merely a matter of
17 survival, but a critical determinant of their growth efficiency and bioelectricity generation
18 [2]. Amino acids like L-serine and L-threonine are fundamental building blocks for
19 proteins and enzymes, which are essential for all cellular processes, including
20 replication and repair. Glycyl-L-glutamic acid, a dipeptide, provides a source of both
21 glycine and glutamic acid, crucial for protein synthesis and as a precursor for other
22 metabolic pathways [36]. The carbon substrates provide the necessary energy for
23 these processes. N-acetyl-D-glucosamine, a derivative of glucose, is a readily
24 assimilated carbon source that fuels the central metabolic pathways, ensuring the rapid
25 proliferation of *Shewanella*. Tween 40, a surfactant, serves as a source of fatty acids
26 and carbon, vital for building cell membranes. Its surfactant properties may also
27 enhance the solubility and bioavailability of other nutrients, further optimizing bacterial
28 growth [37, 38].
29
30

31 **Enzymatic and other metabolic assays**

32
33
34 *Shewanella regenerae* sp. nov. showed a positive result for both catalase (see SM
35 Figure 3a) and oxidase production (see SM Figure 3b). The strain grew on amylase,
36 protease, and lipase media; however, it only produced the protease enzyme, which
37 was confirmed by a 6 mm halo formation (see SM Figure 3c). *Shewanella regenerae*
38 sp. nov. also showed a positive result for the reduction of NO₃⁻ to NO₂⁻ (see SM Figure
39 4).
40

41 The strain was not able to produce the enzyme 1-aminocyclopropyl-1-carboxylate
42 deaminase (see SM Figure 5a, b, c). It was, however, able to oxidize sulfur, with a halo
43 of 3 mm (see SM Figure 5d). The strain was not able to solubilize either phosphate or
44 potassium (see SM Figure 5e, f).
45

46 **Antibiotic susceptibility and hemolytic assay**

47
48
49 *Shewanella* spp. are often susceptible to antimicrobials, but an increase in resistance
50 has been observed [39]. *Shewanella regenerae* sp. nov. shows resistance to oxacillin,
51 chloramphenicol, gentamycin, ciprofloxacin, nalidixic acid, streptomycin, kanamycin,
52 and novobiocin (Table 4). Although still rare, some *Shewanella* species may lead to
53 human infections [40]. *Shewanella* species are mainly found in marine environments
54 [41], and *S. algae*, *S. putrefaciens*, and *S. xiamenensis* have become emerging
55 opportunistic pathogens [42]. Regarding the hemolysis assay, *Shewanella regenerae*
56 sp. nov. is considered alpha-hemolytic.
57
58

59 **Phylogenetic and phylogenomic analyses**

60
61
62
63
64
65

1 The 16S rRNA analysis result in phylogenetic tree (Figure 4). Within this structure, the
2 16S rRNA gene sequence of *Shewanella regenerae* sp. nov. grouped with *Shewanella*
3 species, forming a clade alongside *S. halifaxensis*, *S. pealeana*, *S. sairae*, *S.*
4 *marinintestina*, *S. schlegeliana*, *S. pneumatophori*, and *S. sp.* DAU334. This result
5 indicates that *Shewanella regenerae* sp. nov. clusters within the *Shewanella* clade,
6 supporting its taxonomic classification within this genus.

7 The phylogenetic analysis, based on concatenated sequences of the *gyrA*, *gyrB*, *infB*,
8 *recN*, *rpoA*, and *tpoA* genes, used *P. haloplanktis* as an outgroup to root the
9 phylogenetic tree. The phylogeny grouped *Shewanella regenerae* sp. nov. with species
10 of the *Shewanella* genus in a clade. Within this clade, the isolate grouped with *S.*
11 *schlegeliana*, *S. halifaxensis*, and *S. pealeana* in a well-supported cluster. This
12 distinction, supported by the concatenated gene analysis, underscores the ability of this
13 phylogenetic approach to resolve fine-scale differences among species currently
14 classified under *Shewanella*.

15 The phylogenomic analyses of *Shewanella regenerae* sp. nov. in comparison with the
16 related species *S. schlegeliana*, *S. halifaxensis*, and *S. pealeana* revealed notable
17 differences. The dDDH values, calculated using formula d4 on the GGDC platform,
18 were 23.9%, 26.8%, and 25.1% for *S. schlegeliana*, *S. halifaxensis*, and *S. pealeana*,
19 respectively. The average GC content difference was 0.20%. Additionally, the ANI
20 values, calculated using FastANI, were 84.87%, 84.12%, and 82.86% relative to *S.*
21 *schlegeliana*, *S. halifaxensis*, and *S. pealeana*, respectively (see SM Table 3, and Table
22 5).

23 These results indicate a level of genomic divergence sufficient to support the
24 classification of REG000848 as a new, distinct species related to *S. schlegeliana*, *S.*
25 *halifaxensis*, and *S. pealeana*. The results of the ANI comparison among *Shewanella*
26 species are shown in Table 5 (Part I and II). The ANI values obtained in all comparisons
27 were consistently below the 95% threshold, which is the accepted gold standard for
28 bacterial species delimitation. Therefore, the ANI analysis results provide strong
29 genomic evidence that our isolate represents a new species.

30 **Description of *Shewanella Regenerae* sp. nov. (re.ge.ne.rae. L. adj. regeneration; 31 N.L. fem.).**

32 Strain REG00848 was isolated from the Brazilian coastal sea. Its cells are Gram-
33 negative, orange-pigmented rods, and are motile by means of polar flagella. Circular,
34 opaque, and ivory-colored colonies (0.5–2.5 mm in diameter) are formed on MD agar
35 after 48 hours at 30°C. The strain is a facultative anaerobic chemoheterotroph. Growth
36 occurs at temperatures ranging from 4 to 45°C, with an optimum of 30°C. The pH
37 range for growth is 4.5–10, with an optimum of pH 6.5–8.0. The strain does not require
38 NaCl for growth (it grows from 1–12%), but optimal growth occurs at concentrations of
39 2–8% (w/v). On agar media, it grows best on MD. In broth culture medium, it grows
40 best on TN. The strain tests positive for catalase, oxidase, N-acetyl- β -glucosaminidase,
41 and DNase, and it reduces nitrate to nitrite. It is negative for amylase, alginase, and
42 lipase. *Shewanella regenerae* sp. nov. shows resistance to ampicillin, oxacillin,
43 erythromycin, gentamycin, nalidixic acid, and tetracycline. Hemolytic activity is positive
44 (alpha-hemolytic). Substrates such as L-serine, L-threonine, glycyl-L-glutamic acid, N-
45 acetyl-D-glucosamine, and Tween 40 should be considered as carbon sources for this
46 strain. Microbial fuel cells inoculated with *Shewanella regenerae* sp. nov. yield up to
47 250 mV open-circuit voltage when exposed to TN medium with the addition of 3% NaCl
48 (pH 8) without prior biofilm formation on graphite electrodes.

49 **Conclusions**

50 A bacterial strain, designated REG000848, was isolated from the Brazilian coastal
51 marine environment. A comprehensive characterization, including genomic,
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 phylogenetic, biochemical, and morphological data, distinguishes this new species,
2 identified as *Shewanella regenerae* sp. nov., from its known congeners. This bacterium
3 is clearly distinct from reference species based on both phylogenetic and phylogenomic
4 analyses. The isolate REG000848 is closely related to *S. schlegeliana*, *S. halifaxensis*,
5 and *S. pealeana*; however, the dDDH and ANI values between REG000848 and these
6 closest relatives fall well below the commonly accepted species delineation thresholds
7 of 70% and 95%, respectively, reinforcing its genomic distinctiveness. Therefore, these
8 findings provide strong evidence supporting the classification of REG000848 as a novel
9 species within the genus *Shewanella*. This strain can produce electricity associated
10 with its ability to transfer electrons to extracellular acceptors, a process known as
11 extracellular electron transfer. This process holds great potential for innovation in
12 sustainable electricity generation. Microbial fuel cells inoculated with *Shewanella*
13 *regenerae* sp. nov. yield up to 250 mV open-circuit voltage when exposed to TN
14 medium with the addition of 3% NaCl (pH 8) without prior biofilm formation on graphite
15 electrodes, which indicates a higher bioelectroactivity potential. It should be noted that
16 *Shewanella regenerae* sp. nov. is a promising candidate for various applications,
17 including those in extreme temperature environments, due to its ability to grow across a
18 wide temperature, NaCl and pH spectrum. The discovery of *S. regenerae* not only
19 expands our knowledge of the genus's diversity but also reveals novel metabolic
20 properties.
21

22 **Acknowledgements**

23 We thank the National Land Transportation Agency (ANTT), Technological
24 Development Resources (RDT), ECOVIAS CERRADO road concessionaire, and the
25 Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) for their assistance during the
26 project's development.
27
28
29

30 **Author contributions**

31 V.O.A., M.L.C.F.J., C.K. and A.M.S. designed the study. V.O.A., B.A.R.T., G.S.O.,
32 A.G.J., and J.S. performed the experiments and collected the data. V.O.A. and A.J.M.
33 analyzed the data. J.S. wrote the original draft of the manuscript. V.O.A., A.M.S., A. J.
34 M., C.F.M., C.K., and M.L.C.F.J. reviewed and edited the manuscript. All authors have
35 read and agreed to the final version of the manuscript.
36
37
38
39

40 **Funding**

41 This work was carried out with the support of Technological Development Resources
42 (RDT) [50500.252331/2022-84], provided by the Brazilian Concessionaire ECOVIAS
43 CERRADO, under the regulation of the National Land Transportation Agency (ANTT).
44
45

46 **Declarations**

47 **Conflicts of interest**

48 V.O.A.; J.S.; B.A.R.T. are REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. employees; M.L.C.F.J.,
49 and A.J.M. are REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. shareholders; A.M.S. is ECOVIAS
50 CERRADO S.A. employee. The remaining authors declare no competing interests.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Ethical approval and consent to participate

Ethical approval was not required for this study as it did not involve vertebrate animals. All microbial samples were collected and handled in accordance with the licenses provided by the relevant Brazilian environmental agencies.

Consent for publication

All authors consent to this publication.

References

1. Bowler C et al. (2012) The ocean microbiome. a new frontier in the study of biodiversity. *Nat Rev Microbiol* 10: 251–262.
2. Bretschger O et al. (2007) Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 in a microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol* 73: 2217–2224.
3. Neals K H et al. (2002) *Shewanella oneidensis* MR-1: a bacterium with a talent for metal reduction. *J Bacteriol* 184: 5074–5082.
4. Zhang L, Zhang Y, Liu Y et al. (2024) High power density redox-mediated *Shewanella* microbial flow fuel cells. *Nat Commun* 15: 8302.
5. Martín-Rodríguez A J, Thorell K, Joffré S, Jense-Markopoulos S, Moore E R B, Sjöling Å. (2023) *Shewanella septentrionalis* sp. nov. and *Shewanella holmiensis* sp. nov., isolated from Baltic Sea water and sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 73: 005767.
6. Derby H A, Hammer B W. (1931) Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies of surface taint butter. *Iowa Agric Exp Stn Res Bull* 145: 387–416.
7. Li B-B, Cheng Y-Y, Fan Y-Y, Liu D-F, Fang C-Y, Wu C, Li W-W, Yang Z-C, Yu H-Q. (2018) Estimates of abundance and diversity of *Shewanella* genus in natural and engineered aqueous environments with newly designed primers. *Sci Total Environ* 637–638: 926–933.
8. Baumann L, Baumann P, Mandel M, Allen R D. (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol* 110: 402–429.
9. Makariti I P, Grivokostopoulos N C, Skandamis P N. (2021) Effect of oxygen availability and pH on adaptive acid tolerance response of immobilized *Listeria monocytogenes* in structured growth media. *Food Microbiol* 99: 103826.
10. Liu H, Logan B. (2004) Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environ Sci Technol* 38: 14.
11. Logan B E, Regan J M. (2006) Microbial Fuel Cells—Challenges and Applications. *Environ Sci Technol* 40: 17.
12. Feigl V, Ujaczki É, Vaszita E, Molnár M. (2017) Influence of red mud on soil microbial communities: application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Sci Total Environ* 595: 903–911.
13. Zumft W G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533–616.
14. Silva K, Quisen R C, Degenhardt-Goldbach J, Natalino J V, Balbinotti J H G, Campos E B, Cruz L M. (2023) Metodologia para a seleção de bactérias promotoras de crescimento com potencial de aumentar as taxas de enraizamento de *Pinus* spp. *Comunicado Técnico* 495 – EMBRAPA. 12 p.
15. Dashtbin R, Mahmoudi N, Besharati H et al. (2023) Identification of sulfur-oxidizing bacteria from fishponds and their performance to remove hydrogen sulfide under aquarium conditions. *Braz J Microbiol* 54: 3163–3172.

16. Nautiyal C S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265–270.
17. Rajawat M V S, Singh S, Tyagi S P, Saxena A K. (2016) A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere* 26: 768–773.
18. NCCLS (2003) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 6th Edition, Wayne, Pennsylvania.
19. Slowing I, Wu C W, Vivero-Escoto J L, Lin V S Y. (2009) Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small* 5: 57–62.
20. NCBI. (2025) Genome *Shewanella*. Acessado em: 25 abr. 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=511678>.
21. Edgar R C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
22. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549.
23. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307–321.
24. Darriba D, Posada D, Kozlov A M, Stamatakis A, Morel B, Flouri T. (2020) ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Mol Biol Evol* 37: 291–294.
25. Stöver B C, Müller K F. (2010) TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11: 7.
26. Meier-Kolthoff J P, Carbasse J S, Peinado-Olarte R L, Göker M. (2021) TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 50: D801–D807.
27. Jain C, Rodriguez-R L M, Phillippy A M, Konstantinidis K T, Aluru S. (2018) High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9: 5114.
28. Sato C, Martinez R G, Shields M S, Perez-Gracia A, Schoen M P. (2009) Behaviour of Microbial Fuel Cell in a start-up phase. *International Journal of Environmental Engineering* 1: 1.
29. Guo F, Luo H, Shi Z, Wu Y, Liu H. (2021) *Sci Total Environ* 763: 143021.
30. Rewatkar P, Goel S. (2022) *Shewanella putrefaciens* powered microfluidic microbial fuel cell with printed circuit board electrodes and soft-lithographic microchannel. *Chemosphere* 286: 3.
31. Luo Y, Liu F, Li E, Fang Y, Zhao G, Dai X et al. (2020) FRET-based fluorescent nanoprobe platform for sorting of active microorganisms by functional properties. *Bio Bioelect* 148: 111832.
32. Luo Y, Liu F, Song J, Yang Y, Mei C, Xu M, Liao B. (2021) Function-Oriented Graphene Quantum Dots Probe for Single Cell *in situ* Sorting of Active Microorganisms in Environmental Samples. *Front Microbiol* 12.
33. Deng Y-J, Wang S Y. (2016) Synergistic growth in bacteria depends on substrate complexity. *J Microbiol* 54: 23–30.
34. Wu C, Cheng Y Y, Yin H et al. (2013) Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. *Sci Rep* 3: 1945.
35. Yang Q, Wang X, Feng Y, Lee H, Liu J, Shi X, Qu Y, Ren N. (2012) Electricity generation using eight amino acids by air–cathode microbial fuel cells. *Fuel* 102: 478–482.
36. Tang Y, Meadows A L, Kirby J, Keasling J D. (2007) Anaerobic Central Metabolic Pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 Reinterpreted in the Light of Isotopic Metabolite Labeling. *J Bacteriol* 189: 894–901.

37. Zhao J-S, Manno D, Beaulieu C, Paquet L, Hawari J. (2005) *Shewanella sediminis* sp. nov., a novel Na⁺-requiring and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading bacterium from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1511–1520.
38. La J A, Jeon J-M, Sang B-I, Yang Y-H, Cho E C. (2017) A Hierarchically Modified Graphite Cathode with Au Nanoislands, Cysteamine, and Au Nanocolloids for Increased Electricity-Assisted Production of Isobutanol by Engineered *Shewanella oneidensis* MR-1. *ACS Appl Mater Interfaces* 9: 44106–44114.
39. Yousfi K, Bekal S, Usongo V, Touati A. (2017) Current trends of human infections and antibiotic resistance of the genus *Shewanella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36: 1353–1362.
40. Costa W F, Giambiagi-deMarval M, Laport M S. (2020) *Infection Genetics and Evolution* 85: 104437.
41. Holt H M, Gahrn-Hansen B, Bruun B. (2005) *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clin Microbiol Infect* 11: 347–352.
42. Yu K, Huang Z, Xiao Y, Wang D. (2022) *Virulence* 13: 1515–1532.
43. Sucharita K, Sasikala C, Ramana C V. (2009) *Shewanella chilikensis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from marine sediment of Chilika lagoon, India. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 3111–3115.
44. Bozal N, Montes M J, Tudela E, Jiménez F, Guinea J. (2002) *Shewanella livingstonensis* sp. nov., a new psychrophilic bacterium that produces eicosapentaenoic acid. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 619–623.
45. Bowman J P, McCammon S A, Nichols D S, Skerratt J H, Rea S M, Nichols P D, McMeekin T A. (1997) *Shewanella gelidimarina* sp. nov. and *Shewanella frigidimarina* sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1040–1047.
46. Fang Y, Wang Y, Liu Z, Lu B, Dai H, Kan B, Wang D. (2017) *Shewanella carassii* sp. nov., a psychrophilic, facultatively anaerobic bacterium isolated from the marine fish *Carassius carassius*. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 5284–5289.
47. Ignak S, Demirel O U, Soydan S et al. (2018) *Drug Discov Ther* 12: 108–110.
48. Ivanova E P, Sawabe T, Gorshkova N M, Svetashev V I, Mikhailov V V, Nicolau D V, Christen R. (2001) *Shewanella japonica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1027–1033.
49. Ivanova E P, Sawabe T, Hayashi K, Gorshkova N M, Zhukova N V, Nedashkovskaya O I, Mikhailov V V, Nicolau D V, Christen R. (2003) *Shewanella fidelis* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 577–582.
50. Jensen M J, Tebo B M, Baumann P, Mandel M, Nealson K H. (1980) *Alteromonas hanedai* sp. nov., an isolate from the gut of a fish, *Sebastiscus marmoratus*. *Curr Microbiol* 3: 311–315.
51. Kim H J, Lee M H, Lee M H, Kim M K, Park S, Lee W Y. (2007) *Shewanella haliotis* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2521–2524.
52. Kim H W, Kim J Y, Jang J H, Nam J S, Lee D H, Kim Y H. (2008) *Shewanella basaltis* sp. nov., a psychrophilic, facultatively anaerobic bacterium isolated from basalt rocks in the Juan de Fuca Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2841–2845.
53. Kumar R S, Verma P, Pandey P K, Gupta A K, Kim H J, Baik K S, Seong C N, Patole M S, Shouche Y S. (2011) *Shewanella indica* sp. nov., a bacterium isolated from estuarine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2058–2064.
54. Leonardo M R, Moser D P, Barbieri E, Brantner C A, MacGregor B J, Paster B J, Stackebrandt E, Nealson K H. (1999) *Shewanella pealeana* sp. nov., a member of the microbial community associated with the accessory nidamental gland of the squid *Loligo pealei*. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1341–1351.

- 1 55. Liu H L, Geng J H, Zhao X Y, Chen J, Chen S G, Wang H C. (2009) *Shewanella*
2 *xiamenensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from sediment in a mariculture pond.
3 Int J Syst Evol Microbiol 59: 2921–2924.
- 4 56. Liu G H, Yang S, Narsing Rao M P, Han S, Xie C J, Alwathnani H A, Herzberg M,
5 Rensing C, Zhou S. (2023) *Shewanella alkalitolerans* sp. nov., a novel alkaliphilic
6 bacterium isolated from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol 73: 5929.
- 7 57. Makemson J C, Fulayfil N R. (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., a new
8 polyunsaturated fatty acid-producing marine bacterium isolated from a marine
9 environment. Int J Syst Bacteriol 47: 1034–1039.
- 10 58. Nozue H, Hayashi T, Hashimoto Y, Ezaki T, Hamasaki K, Ohwada K, Terawaki Y.
11 (1992) Isolation and Characterization of *Shewanella alga* from Human Clinical
12 Specimens and Emendation of the Description of *S. alga* Simidu et al., 1990, 335. Int J
13 Syst Bacteriol 42: 628–634.
- 14 59. Park J H, Rhee M S, Kim D H. (2012) *Shewanella seohaensis* sp. nov., a
15 bacterium isolated from the gut of a fish, *Sebastiscus marmoratus*. Int J Syst Evol
16 Microbiol 62: 2341–2346.
- 17 60. Satomi M, Oikawa H, Yano Y. (2003) *Shewanella marinintestina* sp. nov.,
18 *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel
19 eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines.
20 Int J Syst Evol Microbiol 53: 491–499.
- 21 61. Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Yasumoto T, Yotsu M. (1990) *Shewanella algae* sp.
22 nov., a halophilic marine bacterium isolated from an algae sample. Int J Syst Bacteriol
23 40: 331–336.
- 24 62. Weiner R M, Coyne V E, Brayton P, West P, Raiken S F. (1988) *Alteromonas*
25 *colwelliana* sp. nov., a marine bacterium that produces the polyunsaturated fatty acid
26 eicosapentaenoic acid (EPA). Int J Syst Bacteriol 38: 240–244.
- 27 63. Heidelberg J, Paulsen I, Nelson K et al. (2002) Genome sequence of the
28 dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. Nat Biotechnol 20:
29 1118–1123.
- 30 64. Kumar R S, Jyothsna T S S, Sasikala C, Seong C N, Lim C H, Park S C, Ramana
31 C V. (2010) *Shewanella fodinae* sp. nov., a bacterium isolated from a marine gold mine.
32 Int J Syst Evol Microbiol 60: 1649–1654.
- 33
34
35
36
37

38 CAPTIONS

39
40 Figure 1. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG00848) on agar media after 48h of
41 incubation at 30°C. a: MD; b: TCBS; c: TN; d: TS; e: Gram stain image demonstrating a
42 Gram-negative stain (100x); f: unstained optical microscopy image (100x); g: colony
43 image under optical microscopy (4x); h: colony image under optical microscopy (10x).

44
45 Figure 2. *Shewanella regenerae* sp. nov. average growth (180 rpm, 30°C) exposed to
46 different broth media, NaCl concentrations, temperatures, and pH levels. Biomass was
47 evaluated by optical density at 600 nm. One-way-ANOVA results are above the graphs.
48 The vertical lines denote 95% confidence intervals standard deviation.

49
50 Table 1. Factorial-ANOVA results for *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848)
51 biomass and OCV. The analysis evaluates the effects of time (24h, 48h, 120h, 168h,
52 14, 21, and 28 days), medium (TN, MD, TN+3% NaCl, MD+3% NaCl), and incubation
53 strategy (0 rpm and 180 rpm).

54
55 Figure 3. OCV and biomass (OD₆₀₀) of *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) in
56 various broth media (TN, MD, TN + 3% NaCl, MD + 3% NaCl) incubated at 30°C. The
57 dashed line represents the control OCV (culture medium only, without inoculum). One-
58
59
60
61
62
63
64
65

way-ANOVA results are above the graphs. The vertical lines denote 95% confidence intervals standard deviation.

Table 2. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) OCV and biomass exposed to different treatments.

Table 3. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) Biolog EcoPlate results. Biomass values above 0.2 (OD₅₉₀) were considered as positive results.

Table 4. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) antibiotic susceptibility.

Figure 4. Phylogenetic inference of *Shewanellaceae* species. (A) The phylogenetic tree clade of *Shewanella regenerae* sp. nov. was inferred through Maximum Likelihood Tree with 16S rRNA gene of isolate *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) and *Shewanellaceae* species reference genomes deposited in NCBI. (B) The phylogenetic tree was inferred through Maximum Likelihood Tree with concatenated gene sequences *gyrA*, *gyrB*, *infB*, *recN*, *rpoA* and *tpoA* of isolate REG000848 and *Shewanellaceae* species genomes deposited in NCBI. In both phylogenetic trees, branches with support values below 0.5 were collapsed.

Table 5 (Part I). Differential characteristics of *Shewanella* species. *nd* = no data; +/- = strain-dependent [5, 6, 19, 22, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64].

Table 5 (Part II). Differential characteristics of *Shewanella* species. *nd* = no data; +/- = strain-dependent [5, 6, 19, 22, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64].

Table 1. Factorial-ANOVA results for *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) biomass and OCV. The analysis evaluates the effects of time (24h, 48h, 120h, 168h, 14, 21, and 28 days), medium (TN, MD, TN+3% NaCl, MD+3% NaCl), and incubation strategy (0 rpm and 180 rpm).

OCV					
Effect	SS	Degree of Freedom	MS	F	p
Time	1.95E+05	7	2.79E+04	15.22	0.000*
Media	8237	3	2746	1.50	0.223
Incubation	6001	1	6001	3.28	0.075
Time × Media	6.96E+04	21	3317	1.81	0.036*
Time × Incubation	9444	7	1349	0.74	0.642
Media × Incubation	1.44E+04	3	4801	2.62	0.058
Time × Media × Incubation	1.19E+04	21	565	0.31	0.998
Biomass					
Time	0.573	6	0.096	7.4	0.000*
Media	1.199	3	0.400	31.1	0.000*
Incubation	1.347	1	1.347	104.6	0.000*
Time × Media	1.567	18	0.087	6.8	0.000*
Time × Incubation	0.748	6	0.125	9.7	0.000*
Media × Incubation	0.080	3	0.027	2.1	0.106
Time × Media × Incubation	0.596	18	0.033	2.6	0.001*

Table 2. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) OCV and biomass exposed to different treatments.

Medium	Incubation	OCV (mV)		Biomass		
		Maximum	Average	Minimum	Maximum	Average
TN	180 rpm	171	74	0.761	1.331	1.041
	0 rpm	173	64	0.515	1.37	0.845
MD	180 rpm	196	93	0.908	1.438	1.151
	0 rpm	185	88	0.859	1.349	0.992
TN+3%NACL	180 rpm	162	65	0.643	1.359	0.931
	0 rpm	250	118	0.487	1.243	0.837
MD+3%NACL	180 rpm	201	69	0.768	1.192	0.989
	0 rpm	182	96	0.711	1.066	0.816

Table 3. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) Biolog EcoPlate results. Biomass values above 0.2 (OD₅₉₀) were considered as positive results.

Substrate	Result
Water	control
Pyruvic Acid Methyl Ester	-
Tween 40	+
Tween 80	+
α -Cyclodextrin	+
Glycogen	+
D-Cellobiose	+
α -D-Lactose	+
B-Methyl-D-Glucoside	+
D-Xylose	-
i-Erythritol	+
D-Mannitol	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+
D-Glucosaminic Acid	-
Glucose-1-Phosphate	+
D,L, α -Glycerol Phosphate	+
D-Galactonic Acid γ -Lactone	+
D-Galacturonic Acid	+
2-Hydroxy Benzoic Acid	-
4-Hydroxy Benzoic Acid	-
γ -Hydroxybutyric Acid	+
Itaconic Acid	+
α -Ketobutyric Acid	+
D-Mallic Acid	-
L-Arginine	+
L-Asparagine	-
L-Phenylalanine	+
L-Serine	+
L-Threonine	+
Glycyl-L-Glutamic Acid	+
Phenylethyl-amine	-
Putrescine	-

Table 4. *Shewanella regenerae* sp. nov. (REG000848) antibiotic susceptibility.

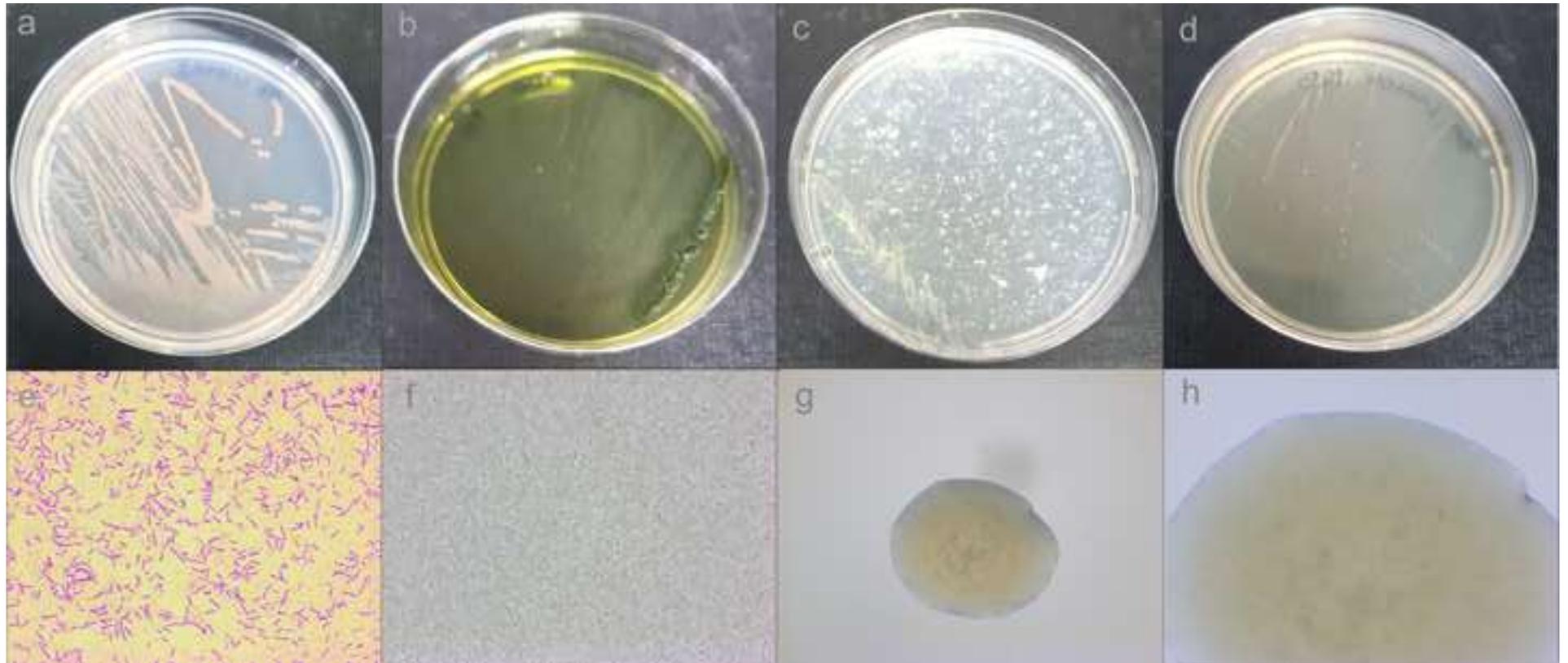
Antibiotics	Concentration	Unit	Inhibition	Halo (mm)
Ampicillin	10	mcg	+	5.5
Oxacillin	1	mcg	-	0.0
Chloramphenicol	30	mcg	-	0.0
Erythromycin	15	mcg	+	3.5
Gentamicin	10	mcg	-	0.0
Ciprofloxacin	5	mcg	-	0.0
Acid. Nalidixic	30	mcg	-	0.0
Penicillin	10	IU	+	11.0
Streptomycin	10	mcg	-	0.0
Tetracycline	30	mcg	+	9.5
Clindamycin	2	mcg	+	2.5
Ceftriaxone	30	mcg	+	7.0
Kanamycin	30	mcg	-	0.0
Novobiocin	5	mcg	-	0.0

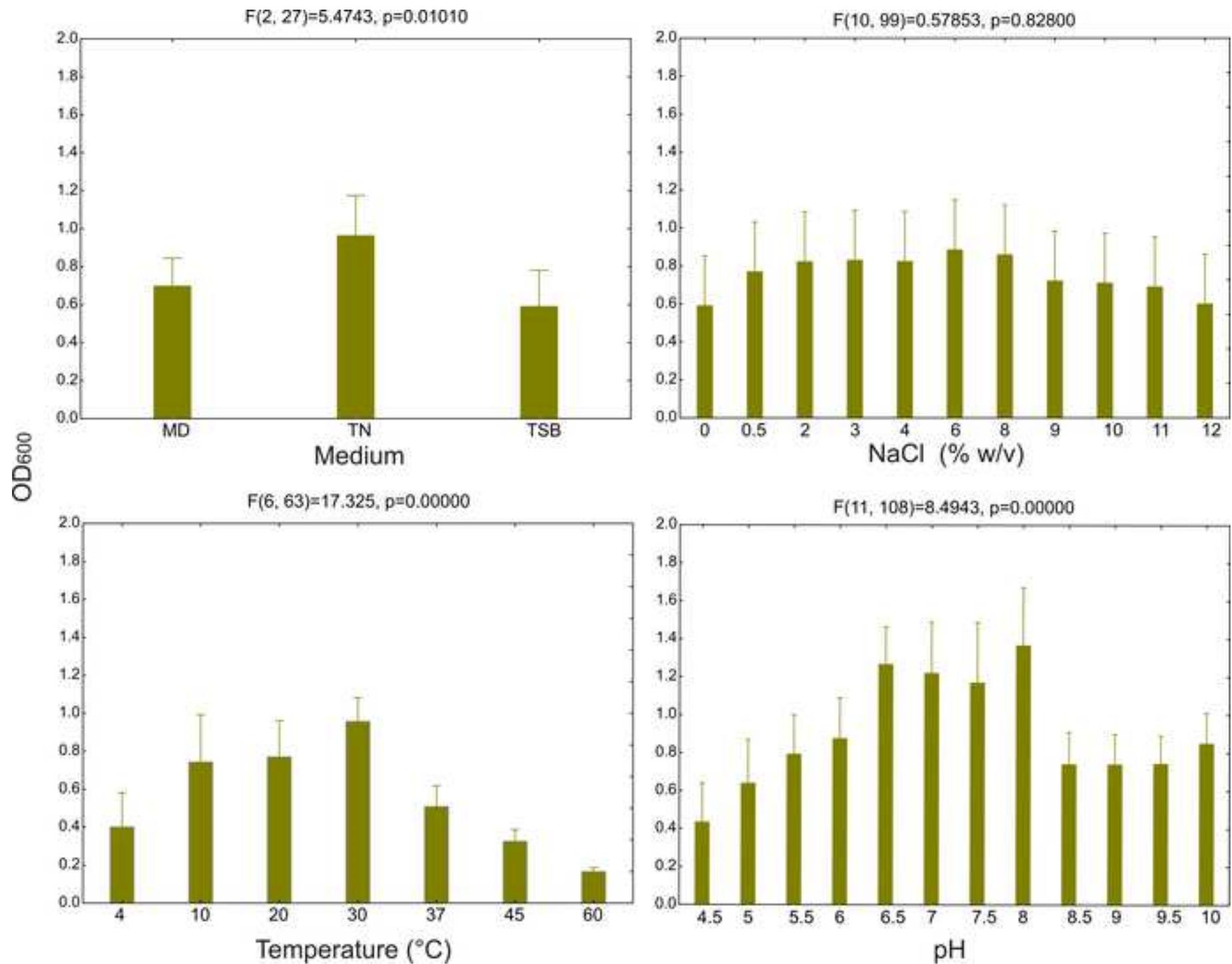
Table 5 (Part I). Differential characteristics of *Shewanella* species. *nd* = no data; +/- = strain-dependent [5, 6, 19, 22, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64].

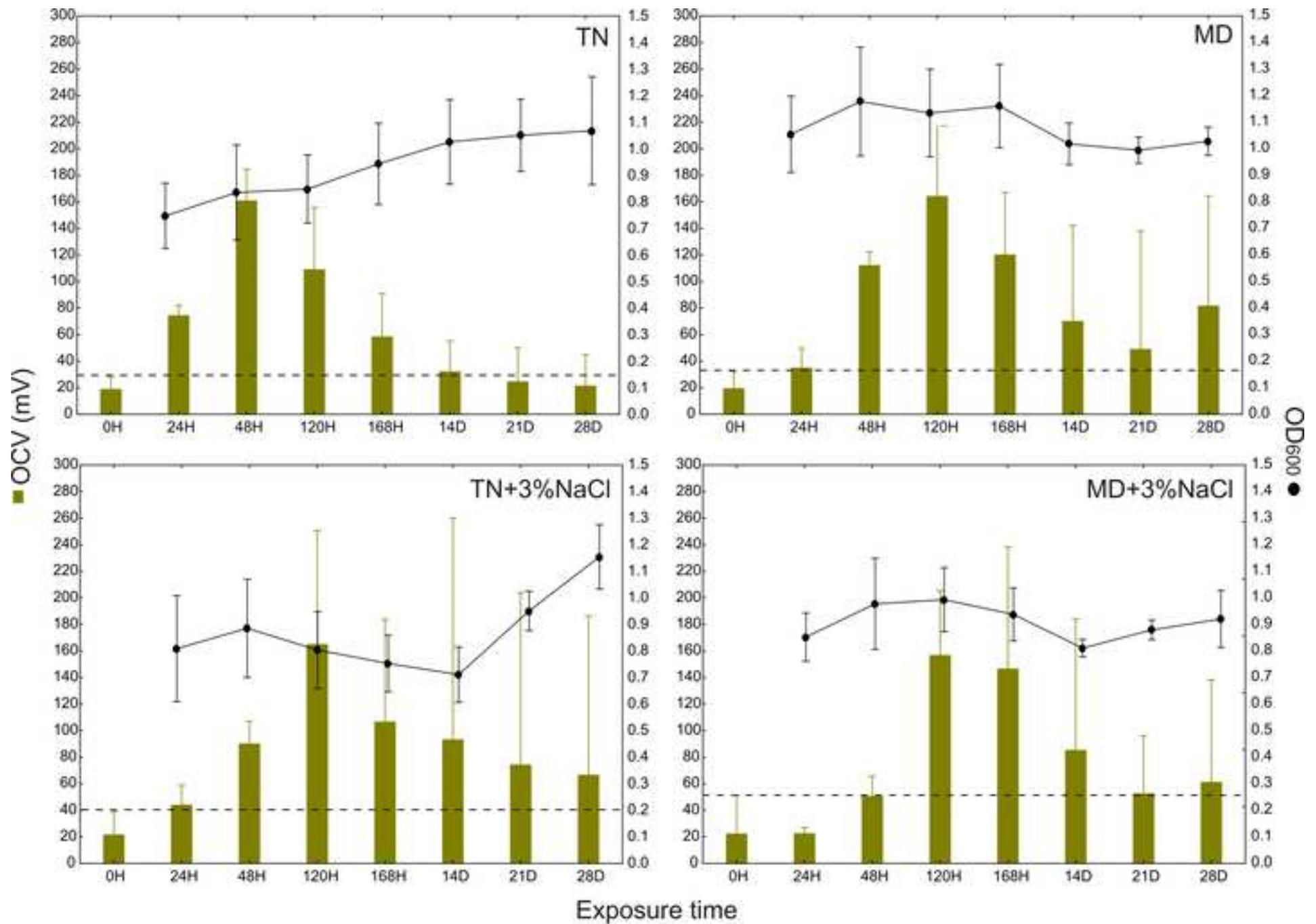
Characteristic	<i>S. regenerae</i> sp. nov.	<i>S. marinintestina</i>	<i>S. schlegeliana</i>	<i>S. sairae</i>	<i>S. pealeana</i>	<i>S. gelidimarina</i>	<i>S. colwelliana</i>	<i>S. hanedai</i>	<i>S. woodyi</i>	<i>S. frigidimarina</i>	<i>S. japonica</i>	<i>S. livingstonensis</i>	<i>S. putrefaciens</i>
Growth in temperature (°C) at:													
4°C	+	nd	nd	nd	nd	-	nd	+	+	+	nd	+	+
10°C	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	+	+	+	nd	+	+
37°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
45°C	+	nd	nd	nd	nd	-	nd	-	-	-	nd	-	-
optimal	30	20-25	20-25	20-25	25-30	15-17	25	15-20	25	20-22	20-25	15-20	25-30
Growth in NaCl at:													
0%	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6%	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
NaCl range (%):	0-12	0.5-5.5	nd	nd	0.5-5	0.5-8	0-11	0.5-7	0-4	0.5-3.5	0.3-3	0.5-6	0-8
pH range:	4.5-10	5.5-10	nd	nd	5-9	7-8	6-10	6-9	5-9	4.5-9	5-10	4-10	5-10
pH optimum:	6.5-8	7.0	nd	nd	6.5-7.5	7.0	7.0	7.0	7.0	7.5	7.0	7.0-7.5	7.0
Production of:													
luminescence	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
amilase	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of:													
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
L-Arginine	+	+	-	+	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-
putrescine	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	nd	nd	-
Reduce:													
nitrate to nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibiotic Resistance:													
Ampicillin	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-	-
Oxacillin	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	-	nd
Chloramphenicol	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	nd

	Erythromycin	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-	-
	Gentamicin	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	-	nd
	Ciprofloxacin	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	+
	Acid. Nalidixic	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	-	-
	Penicillin	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	+	nd
	Streptomycin	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	-	nd
	Tetracycline	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	+	-
	Clindamycin	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Ceftriaxone	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Kanamycin	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	nd
	Novobiocin	+	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	-	nd
Genomic information:	DNA G+C content (mol%)	44.76	42.63	53.98	46.28	44.59	40.45	44.30	40.23	44.72	43.30	50.0	54.81	44.99
	Genome similarlty ANI (%)	--	83.20	83.95	83.48	84.85	79.53	78.53	78.37	79.06	77.72	77.7	77.75	77.68

	Chloramphenicol	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Erythromycin	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Gentamicin	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Ciprofloxacin	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Acid. Nalidixic	+	-	+	nd								
	Penicillin	nd											
	Streptomycin	nd											
	Tetracycline	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Clindamycin	nd											
	Ceftriaxone	nd											
	Kanamycin	nd											
	Novobiocin	nd											
Genomic information:	DNA G+C content (mol%)	46.66	45.23	42.79	52.91	52.28	50.60	41.48	42.40	40.39	53.51	44.45	53.24
	Genome similarity ANI (%)	77.80	79.76	77.85	77.64	77.29	77.53	77.59	77.51	77.86	78.24	78.39	76.73





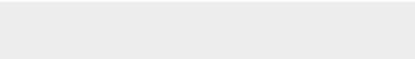
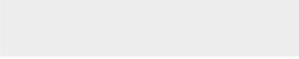




Click here to access/download

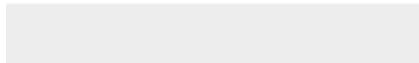
Supplementary Material

Bioeletroatividade_SUPPLEMENTARY MATERIAL visto
celia-CK.docx





Click here to access/download
Supplementary Material
Certificate_S. regenerae_ass.pdf



Scaling-Up of the Bioluminescent Strain *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) from Blue Amazon: Implications for the Formulation of Sustainable Signaling Devices

Jéssica Scherer¹, Mário Luiz Conte da Frota Júnior¹, Andressa de Moura Silva², Dayse Pereira Dias Silva¹, Laura Fernanda Costantin¹, Alexandre José Macedo¹, Vanessa Ochi Agostini¹

Affiliations: ¹ Regenera Molecules do Mar – Avenida Ipiranga 6681, edifício 96D, sala 210 – CEP 90160-091, Partenon, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: contato@regeneramoleculas.com.br

² Ecovias Cerrado – Rua Sintra 50, sala 01 – CEP 38406-643, Granja Marileusa, Uberlândia, MG, Brazil.

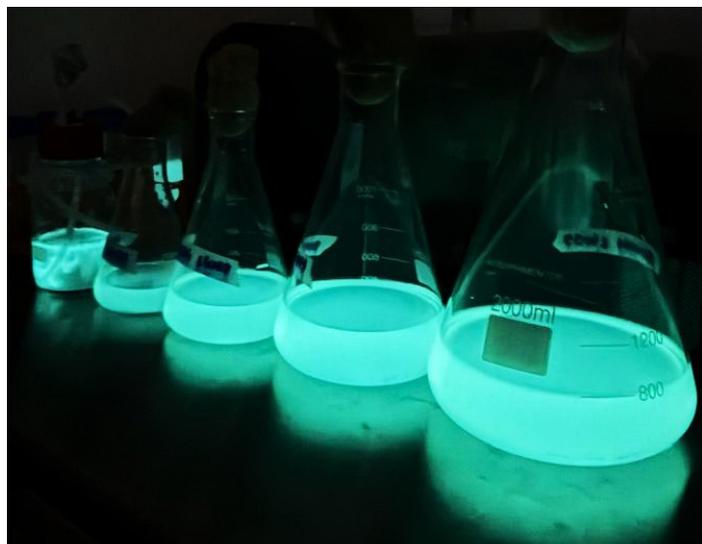
Abstract

This study detailed and validated the scaling-up protocol for the bioluminescent marine strain, *Aliivibrio* sp. (ref. 1485), sourced from the REGENERA BANK, using an INFORS HT Minifors 2 bioreactor. The primary goal was to establish optimal parameters for the light emission of the strain for use in sustainable signaling systems. The strain, collected in the coastal zone of Rio Grande do Sul, Brazil, was cultivated in batch mode at 28 °C with buffered pH at 6.50 in commercial Marine Broth (MB) medium. The results showed successful biomass production, with the culture reaching the stationary phase ($OD_{600nm} = 1.2$) at approximately 68 hours. However, the bioluminescence kinetics revealed a significant divergence from the canonical Quorum Sensing (QS) pattern. The maximum luminescent peak (276,000 photons) occurred just 3 hours after inoculation, demonstrating an inverse proportionality to cell growth. This suggests the presence of catabolite repression or inhibition by metabolic by products at high cell density, resulting in a “switching off” effect instead of the typical light induction in the stationary phase.

The protocol was validated as an efficient and reproducible method for mass production. Nevertheless, the commercial medium MB proved inadequate for long-term stability. The ideal harvesting window was confirmed to be immediately after inoculation (0-5 hours). The strategic solution involves replacing the commercial medium with optimized medium (BO1485 - under industrial secrecy) developed by REGENERA via Design of Experiments (DoE), which is designed to maintain bioluminescence viability for up to 100 days. Further optimization studies involving temperature and stirrer variations are recommended to maximize the initial light output and longevity of the strain.

Keywords

Minifors 2 bioreactor, eve bioprocess software, INFORS HT, marine bacteria, biotechnology, light emission



Objective

The objective of this study is to validate the scaling-up protocol for the bioluminescent *Aliivibrio* strain from the REGENERA BANK using a Minifors 2 bioreactor (INFORS HT), by determining the growth performance, bioluminescence stability and establishing the maximum luminescent emission and cell viability parameters necessary for developing sustainable signage systems.

Introduction

Marine bioluminescent bacteria represent a powerful resource at the intersection of biology and engineering. These microorganisms, primarily residing in symbiotic relationships or in the deep ocean, possess the remarkable ability to naturally emit light via the luciferase enzymatic reaction [1]. This intrinsic mechanism is not merely an ecological curiosity but a robust, non-invasive biological signaling system with profound technological implications across multiple sectors [2].

The stable and quantifiable light emission from these organisms makes them invaluable tools. They are currently being leveraged in fields such as biosensing for real-time toxicity testing, environmental monitoring, and the rapid detection of pollutants [3]. Furthermore, the potential of harnessing this natural illumination extends to novel applications, including the development of sustainable biological lighting systems [4]. A particularly promising and innovative area is the use of these bacteria for road and safety signage. By incorporating naturally glowing microorganisms, it is possible to design markers that are self-sustaining, energy-efficient, and responsive to environmental cues, potentially offering a revolutionary step away from traditional energy-intensive lighting methods [5].

From a production standpoint, marine microorganisms often present an advantage for bioreactor scaling compared to their terrestrial counterparts. These organisms are specifically adapted to aquatic environments with low nutrient availability and climate instability, distinguishing them for their nutrient plasticity and resilience. Therefore, they are suitable for large-scale controlled cultivation under laboratory conditions. These organisms are typically adapted to stable and nutrient aquatic environments, making them particularly amenable to large-scale, controlled cultivation under laboratory conditions [6]. Their relatively straightforward nutritional requirements and established tolerance to high cell densities facilitate the process of industrial upscaling and fermentation, ensuring the robust supply needed for technological development, especially in applications like light emission where consistent output is critical [7].

This technical document details the scaling-up protocol for a bioluminescent bacterial strain, a procedure of strategic interest to REGENERA. The strain was selected from the REGENERA BANK (BANCO REGENERA) — the first bank of marine and coastal microorganisms in the country legally available for bioprospection and technological development. Collected in the Blue Amazon, through a strategy previously directed by company studies, the bacterium belongs to the genus *Aliivibrio* and represents the Brazilian marine biodiversity, being notable for its high light emission capability.

The primary goal of this scaling-up is the development of sustainable signage systems. The scaling-up procedure is fundamental to verify the stability and bioluminescence characteristics of the strain following cryopreservation. Therefore, the central objective of this protocol is to ensure the quality, purity, and luminescent intensity of the sample, thus guaranteeing its successful introduction into subsequent production and research environments.

Methods and materials

The family of Vibrionaceae contains a large number of bacterial species, many of which are described from marine habitats [8]. *Aliivibrio* spp. (formerly *Vibrio* spp.) is a Gram-negative bacterium found globally in marine environments. The strain utilized for scaling-up was collected in the coastal zone of the state of Rio Grande do Sul (RS) from samples of seaweed and fouling invertebrates, thereby representing the Brazilian marine biodiversity. The bacterium had its genome sequenced and was identified as *Aliivibrio* sp. (ref. 1485), with the species designation being maintained under industrial secrecy.

Before cultivation in the Minifors 2 bioreactor, the scale-up process was carried out gradually, beginning with smaller volumes and increasing stepwise. The sequence followed was 15 mL (Falcon tube), 100 mL, 200 mL, 400 mL, and 800 mL (Erlenmeyer flasks), culminating in the 1.6 L Minifors 2 stage. This gradual increase in culture volume allowed the continuity of growth across each step prior to large-scale cultivation.

The scaling-up process was conducted in an 6 L Minifors 2 bioreactor under strictly controlled conditions. The eve® bioprocess platform software (2025 H1 R1 - 1.149.11.1) was used to monitor and control the parameters during the process. Inoculum preparation involved the re-activation of the *Aliivibrio* strain, which was sub-cultured onto 40 plates of solid Marine Broth (MB) medium (Difco BD) and incubated at 28 °C for 24 hours (Figure 1A). Following growth, the biomass was resuspended in a 0.9 % (w/v) saline solution (Figure 1B). The cultivation was carried out in a final working volume of 4 L of commercial Marine Broth medium (Difco BD). The initial conditions in the bioreactor were established with an Initial Optical Density (OD_{600nm}) of 0.05 and an Initial Luminescence of 55,000 photons.

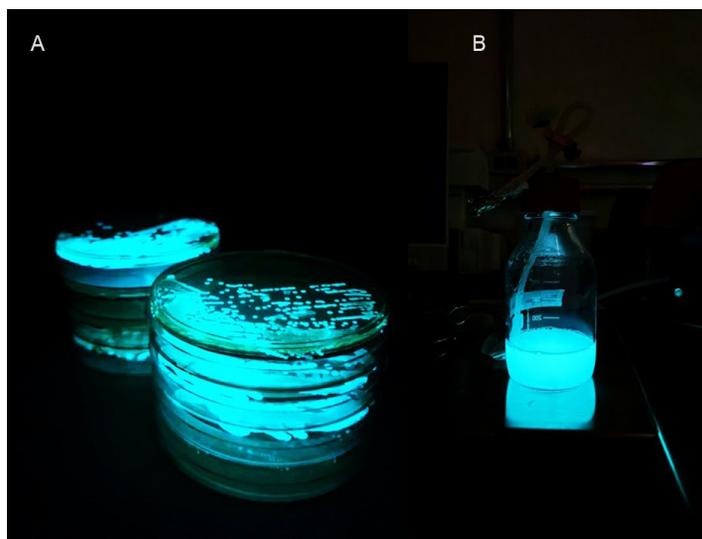


Figure 1. *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) from REGENERA BANK. A. Growth bacteria in agar Marine medium. B: bioreactor inoculum in saline 0.9 %.

The culture was operated in Batch mode for a total duration of 92 hours. The operational parameters were maintained at the following setpoints: temperature at 28 °C, stirrer speed at 100 min⁻¹, GasMix at 21 % O₂, and Total Flow at 0.5 L min⁻¹. The pH was buffered and controlled at 6.50 throughout the process, which is the optimal value for the strain's maximum bioluminescence production. Samples were drawn periodically to monitor growth kinetics (assessed by OD_{600nm}) and luminescence (measured in photons), using a Synergy H1 - Agilent spectrophotometer in 96-well plate (Kasvi), transparent and black, respectively. Additionally, periodic photographs were captured to provide visual confirmation of the bacterial light emission during the cultivation period. Figure 2 shows the beginning of the process, just after the inoculum.

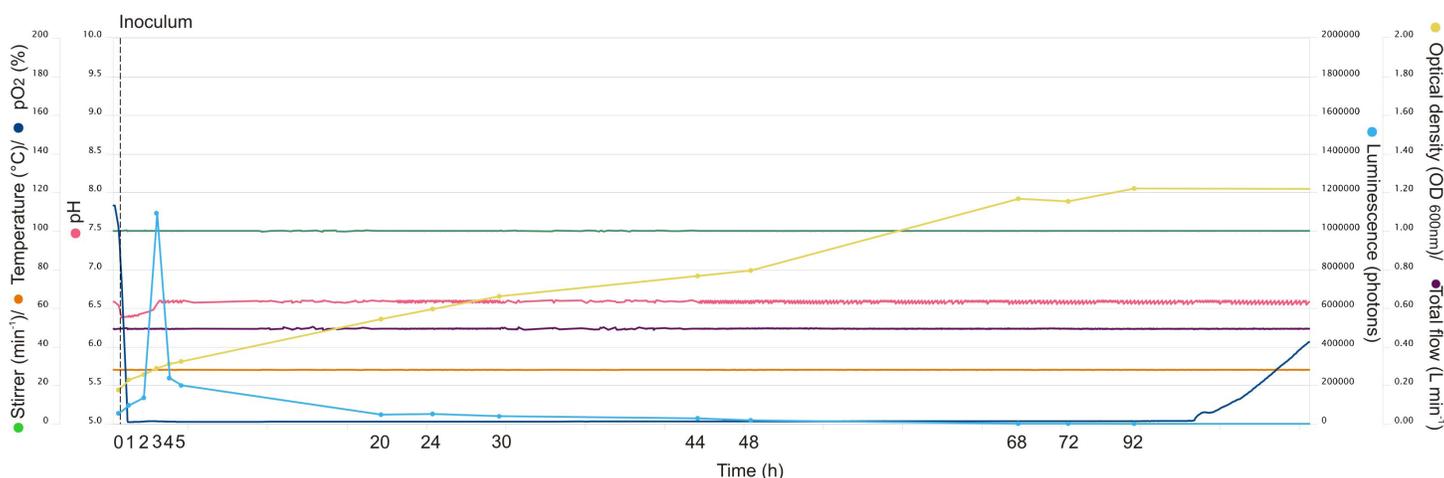
Results

During the process, the operational conditions of temperature at 28 °C and the buffered pH at 6.50 were rigorously maintained, as were the stirrer (100 min⁻¹), total flow (0.5 L min⁻¹). The pO₂ (dissolved oxygen) is a key parameter for bioluminescent organisms, as oxygen is an essential co-substrate for the luciferase reaction. Regarding the Initial behavior (0-5 hours), a high rate of initial consumption was observed, coinciding with the peak of luciferase activity. This validates that oxygen was available but was rapidly consumed due to the high initial metabolic activity of the strain.

After the initial drop, maintaining adequate oxygen levels demonstrated that the limitation of bioluminescence was not due to a lack of the element, but rather to internal metabolic repression. Starting from 92 hours, the oxygen level begins to rise, indicating cell death (Figure 3).



Figure 2. *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) from REGENERA BANK inoculated in Minifors 2 bioreactor (INFORS HT).



The results of the scaling-up of the *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) strain in the Minifors 2 bioreactor are presented in Figure 4, for both cell growth (OD_{600nm}) and bioluminescence (photons) production. Both endpoints show statistically significant differences (One-way ANOVA) between the observation times, $F(13, 28) = 416.5, p=0.0000$ e $F(13, 28) = 1495.6, p=0.0000$, respectively (Figure 4).

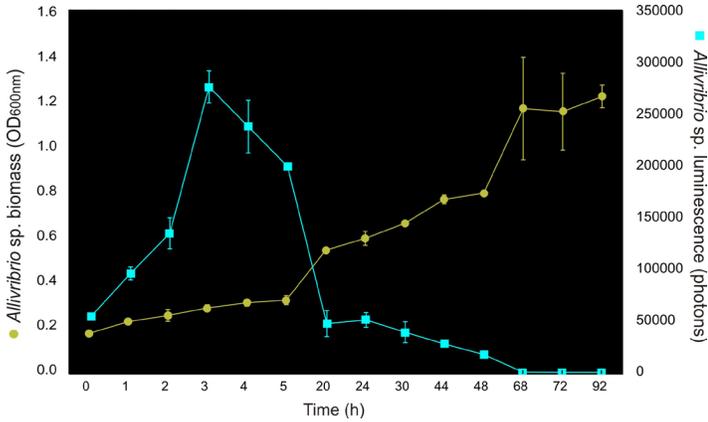


Figure 4. Representative graph of growth and bioluminescence kinetics of *Aliivibrio* sp. (ref. 1485). Vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

The analysis of the Optical Density (OD_{600nm}) data revealed that the culture demonstrated a lag phase (latency) between 0h and 5h, indicating that the inoculum and the culture medium (MB) were adequate for biomass production. The exponential growth phase began approximately after 5 hours and continued until around 68 hours of cultivation. The culture reached the stationary phase (OD maximum) at approximately 68 hours, achieving a maximum value of around 1.2, where the stationary phase is presumed to have commenced.

The analysis of the Luminescence (photons) data revealed that the bioluminescence emission followed the opposite pattern of cell growth, demonstrating an inverse proportionality. The maximum luminescent emission peak was reached just 3 hours after the inoculum was performed, recording 276,000 photons. Following the peak, luminescence showed a decrease, concurrently with the biomass beginning to increase (OD > 0.5), starting from 20 hours into the process. Visibly, bioluminescence was observable between 0 hours and 48 hours (> 18,000 photons) (Figure 5). The scaling-up protocol was successfully validated. The operational conditions of temperature at 28 °C and the buffered pH at 6.50 were effective, allowing for robust and rapid growth (stationary phase at 68 hours) of the marine *Aliivibrio* strain.

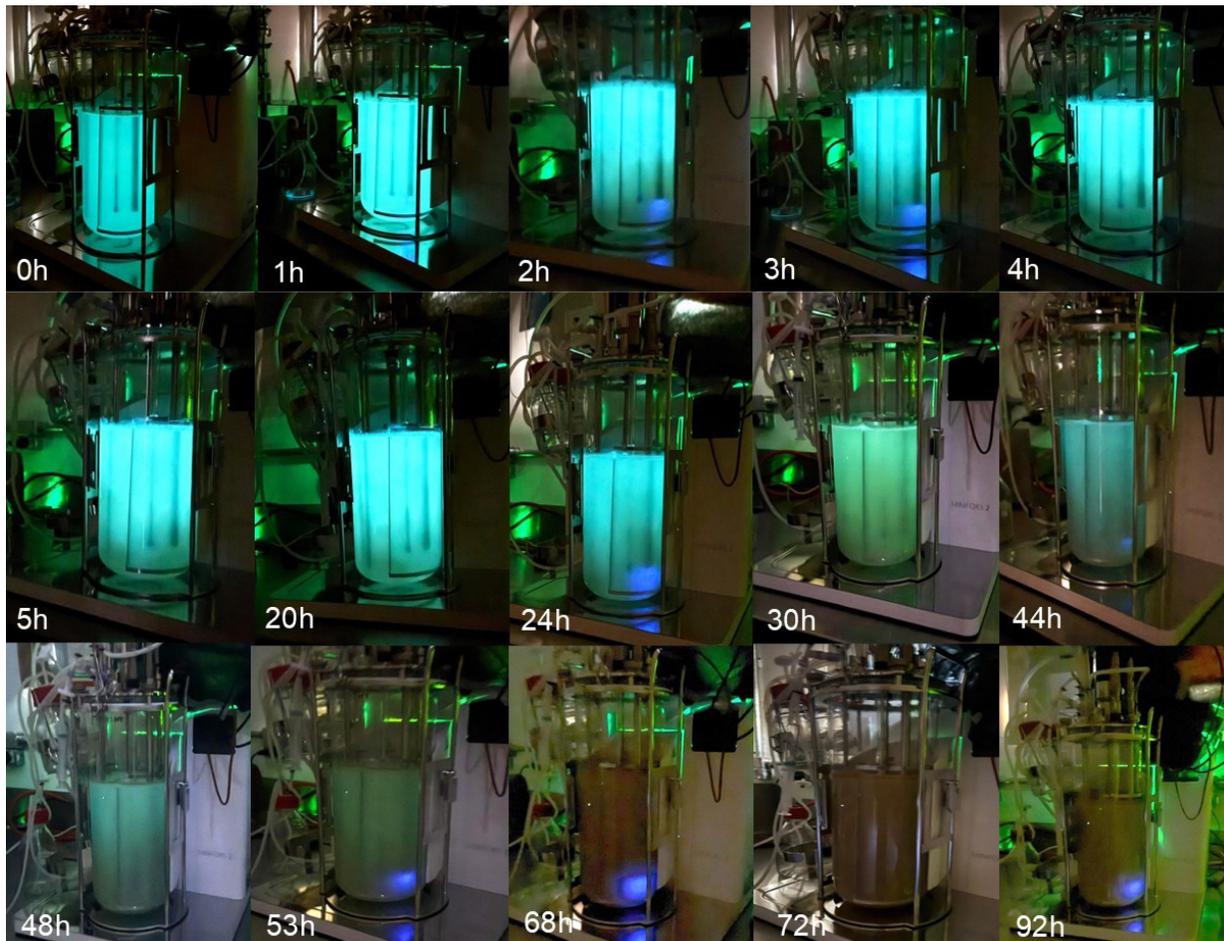


Figure 5. Images of the *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) bioprocess over time.

The observed dissociation between the maximum biomass (between 68 and 92 hours) and the luminescence peak (between 0 and 5 hours) is a fundamental result. Maintaining the at pH 6.50, a critical abiotic factor for luciferase activity, ensured that the metabolism was directed towards light production, as expected for *Aliivibrio* bacteria [9]. The obtained data confirm that the ideal harvesting window for this strain in the medium is immediately after inoculation to capture maximum luminescent performance.

The bioluminescence kinetic results diverge from the canonical behavior of *Aliivibrio fischeri* (formerly *Vibrio fischeri*), which typically regulates light emission via Quorum Sensing (QS), reaching the peak in the stationary phase [10]. The observed kinetics suggest a distinct metabolic control in the REGENERA BANK strain: the light peak at 3 hours, well before massive growth, indicates that the initial pool of precursors or the enzymatic state of luciferase (lux) was highly active at the time of inoculation. The drop in luminescence, which coincides with the increase in biomass (OD = 0.5 starting from 20 hours), suggests catabolite repression or inhibition by metabolic by products released at high concentration during the exponential phase [11]. This “switching off” effect at high density, instead of “switching on” (typical of QS), requires further investigation but has direct implications for the application.

The commercial medium used compromises the long-term stability of the bioluminescence, making it unsuitable for the final purpose of sustainable signaling [5]. To overcome this limitation, REGENERA, through Design of Experiments (DoE) [12], developed medium BO1485, which is currently under industrial secrecy. This medium is specifically designed to retard cell growth and maintain viable bioluminescence for up to 100 days.

Therefore, the next strategic step is to apply the scaling-up protocol validated in this study using medium BO1485. Furthermore, an optimization study involving different temperatures and stirrer must be carried out, as temperature is another primary factor regulating luciferase activity and the static condition can slow down the biomass growth, can maximizing the bioluminescence and the longevity of the strain activity.

Conclusion

The scaling-up protocol for the marine bioluminescent wild strain *Aliivibrio* sp. (ref. 1485) was successfully validated in the Minifors 2 bioreactor, establishing an efficient and reproducible method for the mass production of the biomaterial. The rigorous maintenance of operational parameters (pH 6.50, 28 °C, and pO₂ control) confirmed the suitability of the culture system for the genus.

The main kinetic result lies in the fundamental dissociation between maximum biomass (reached at 68 hours) and the luminescence peak (reached early at 3 hours). This kinetics is atypical for *Aliivibrio* and diverges from classic QS control, suggesting that light expression is rapidly repressed by metabolic factors intrinsic to the strain at high density. The direct implication is that the ideal harvesting window in the MB medium is immediately after inoculation (0-5 hours) to capture maximum performance.

However, the commercial medium is inadequate for the development of sustainable signaling systems due to long-term bioluminescence instability. REGENERA’s next strategic step is the transition to medium BO1485 (under industrial secrecy), specifically developed to retard cell growth and ensure luminescent viability for up to 100 days. Additionally, a temperature, aeration cascade and stirrer optimization studies is recommended to maximize the strain’s longevity, thus solidifying the foundation for the formulation of long-lasting bioluminescent signaling devices.

Integrated with the eve® bioprocess platform, the Minifors 2 bioreactor enabled precise real-time control of temperature, pH, and dissolved oxygen, allowing REGENERA MOLÉCULAS DO MAR to identify the strain’s early luminescence peak and validate a reproducible scalable protocol for sustainable bioluminescent technologies.



Conflicts of interest

V.O.A. and J.S. are REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. employees; M.L.C.F.J., and A.J.M. are REGENERA BIOTECNOLOGIA S.A. shareholders; A.M.S is ECOVIAS CERRADO S.A. employee. The remaining authors declare no competing interests.

Funding

This work was carried out with the support of Technological Development Resources (RDT) [50500.252331/2022-84], provided by the Brazilian Concessionaire ECOVIAS CERRADO, under the regulation of the National Land Transportation Agency (ANTT).

Acknowledgments

We thank the National Land Transportation Agency (ANTT), Technological Development Resources (RDT), and ECOVIAS CERRADO road concessionaire for their assistance during the project's development.

References

1. Calogero, R.; Rizzo, C.; Arcadi, E.; Stipa, M.G.; Consoli, P.; Romeo, T.; Battaglia, P. (2022). Isolation and Identification of Luminescent Bacteria in Deep Sea Marine Organisms from Sicilian Waters (Mediterranean Sea). *J. Mar. Sci. Eng.* 10, 1113.
2. Hastings, J. W. (1996). Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 173(1), 5-11.
3. Close, D. M., Xu, T., Saylor, G. S., & Ripp, S. (2010). Bioluminescent sensors for the detection of contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(6), 724-734.
4. Glowee by bio. Integrate bioluminescence into your city projects. Glowurban. 20 de outubro de 2025. Disponível em: <https://glowee.com/glowurban/>.
5. Steele, H. (2014). The future of bioluminescence for sustainable public lighting. *Nature Light Technology*, 1(3), 112-118.
6. Rotter A, Barbier M, Bertoni F, et al. 2021. The Essentials of marine biotechnology, *Frontiers in Marine Science*. 8: 629629.
7. Rai, A. K., & Gupta, V. K. (2017). Mass cultivation and commercial application of marine microbes. In *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotransformation* (pp. 57-78). Springer.
8. Thompson, F. L., Iida, T., and Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 403–431. doi: 10.1128/mmr.68.3.403-431.2004
9. Silva, A.R., Souza, C., Exner, D., Schwaiger, R., Alves, M.M., Petrivykh, D. Y., Pereira, L. (2021). H-Induced Modulation of *Vibrio fischeri* Population Life Cycle. *Chemosensors* 9, 283.
10. Fuqua, C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI-type regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 176(2):269-75
11. Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). The cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luciferase system. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 313:322.
12. Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2005). Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Casa do Pão, São Paulo. 326 p.