

MARIA PAULA PARADA PINILLA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ISOLADAS DO BIOMA
CAATINGA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

MARIA PAULA PARADA PINILLA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ISOLADAS DO BIOMA
CAATINGA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

PARADA PINILLA , MARIA PAULA
CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES
ISOLADAS DO BIOMA CAATINGA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO
DE BIOPOLÍMEROS. / MARIA PAULA PARADA PINILLA ;
orientador Gabriel Padilla Maldonado . -- São
Paulo, 2016.
115 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microrganismos halotolerantes. 2.
Biopolímeros. 3. Exopolissacarídeos. 4. Ácido
hialurônico. 5. Polihidroxialcanoatos . I. Padilla
Maldonado , Gabriel, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Paula Parada Pinilla

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização de bactérias halotolerantes isolados do bioma caatinga e avaliação da produção de biopolímeros.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedicado a mis abuelos, padres y hermanos.
Mis primeros maestros en la fe, la esperanza y
el amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, verdadeira fonte de felicidade, paz e amor. Obrigada por minha família e amigos. Obrigada por acompanhar meus passos, por ensinar-me a amar e perdoar, por permitir e fazer-me capaz de servir aos outros.

Agradeço a minha amada família pelo apoio incondicional, por ser sempre minha força. Obrigada pelo esforço material e emocional que fizeram para que eu estivesse o melhor possível em outro país. Por crer e confiar em mim. Por ensinar-me os valores que realmente são essenciais na vida. Amo vocês!

Agradeço ao Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado por ter-me orientado e acolhido no seu laboratório, não só como meu chefe, mas também como um pai. Pela confiança depositada, pelos ensinamentos e discussões, pela sua qualidade humana e por respeitar minhas decisões profissionais.

Agradeço ao Dr. Leandro Maza Garrido pela ajuda, orientação, exigência e conselhos, que fizeram possível o projeto. Obrigada especialmente pela sua amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo por permitir e disponibilizar o material biológico que fez possível o presente trabalho.

Agradeço à Dra. Suikinai Nobre Santos pela gentil colaboração no presente trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pela sua gentileza e colaboração. Pela acolhida alegre aos estudantes estrangeiros, e por fazer-nos sentir em casa.

Agradeço à Dra. Renata Furlan, minha primeira chefe no Brasil, pelos ensinamentos e pela confiança. Obrigada por abrir as portas de sua casa para mim.

Agradeço ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gómez pela ajuda e orientação nos experimentos de acúmulo de PHB. Obrigada por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos.

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela amável colaboração e por ter-me permitido trabalhar no seu laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Diego Veras Wilke pela ajuda nos ensaios de ativação de macrófagos, realizados no seu laboratório, os quais contribuíram enormemente no presente estudo.

Agradeço ao Prof. Dr. Enrique Mario Boccoardo Pierulivo pela colaboração oferecida em alguns dos experimentos planejados.

Agradeço a Zita Maria de Oliveira Gregório por toda a ajuda e amizade oferecida.

Agradeço as secretárias do departamento de Microbiologia, especialmente a Gisele da Graça Santana pela ajuda constante e paciente durante os dois anos de mestrado.

Agradeço a minha primeira amiga brasileira Simone Ichiwaki. Sua amizade é um tesouro para mim. Você é o anjo que Deus colocou no caminho dos estudantes colombianos do ICB. Não alcançam as palavras para expressar minha gratidão, carinho e admiração.

Agradeço aos meus colegas e amigos do laboratório 164: Alejandra F, Ruth, Roger, Fernanda, Aline, Mariana, Luana, Alejandra M, Mauricio, Vinicius, Vinicius Novi e Víctor. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, alguns de alegria, trabalho, decepções, de sucessos e de celebração.

Agradeço aos meus amigos do ICB, especialmente a Mireia, Henrique, Juliana, Alexandre e Nadia pela amizade sincera, o apoio e ajuda incondicional.

Agradeço a cada um dos meus amigos brasileiros, pela acolhida, simplicidade e amor que me ofereceram, e pelos quais vou sentir “saudades” sempre.

Agradeço especialmente a minha família colombiana em Brasil: Aleja, León, Ruthi, Inésita e Roger. Sem vocês não teria sido possível esta aventura. Guardo especialmente cada momento compartilhado com vocês.

Agradeço com todo o meu coração a Liz, Mairita e Juan. Nunca imaginamos a agradável surpresa que nos tinha preparado Deus em Brasil. Muito obrigada pela paciência, a amizade incondicional, os fins de semana cozinhando, o bate papo no sofá, as inúmeras tentativas de fazer esporte, as danças improvisadas, as aventuras na Polícia Federal, o consolo nas dificuldades, os sorrisos e piadas o tempo todo, e os momentos de oração juntos. Vocês me fizeram uma melhor pessoa e uma mulher mais feliz.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

*“Creo para comprender, y comprendo para
creer mejor”*

San Agustín.

RESUMO

PARADA M. P. P. **Caracterização de bactérias halotolerantes isoladas do bioma caatinga e avaliação da produção de biopolímeros.** 2016. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os organismos extremófilos são considerados atualmente reservatórios de novas biomoléculas de interesse biotecnológico. Dentro deste grupo encontram-se os microrganismos que requerem altas concentrações de sal para crescer, denominados halófilos. Também existem os halotolerantes que são aqueles microrganismos que não precisam de sal para proliferar, mas toleram altas concentrações de NaCl. Os ambientes salinos provaram ser uma fonte rica de microrganismos halotolerantes produtores de novos compostos naturais e, portanto, a pesquisa nestes ambientes torna-se de grande importância. No Brasil, na região salina de Areia Branca no bioma caatinga, foram isoladas bactérias halotolerantes que foram estudadas com o objetivo de avaliar a produção de novos biopolímeros de interesse biotecnológico. Acredita-se que os polímeros naturais desses microrganismos extremos podem ter aplicações inovadoras ou características diferentes às tradicionais. Neste estudo, os isolados foram identificados em nível de gênero com base na análise da sequência do gene 16s rRNA. Os isolados foram principalmente bactérias Gram-positivas atribuídas às famílias *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Microbacteriaceae* e uma bactéria *Incertae Sedis* do filo firmicutes, afiliadas aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Curtobacterium* e *Exiguobacterium*, respectivamente. Apenas um isolado Gram-negativo foi identificado e atribuído como membro da família *Pseudomonadaceae*, incluso no gênero *Pseudomonas*. Avaliou-se a tolerância ao sal dos isolados em meio TSB suplementado com 5, 35, 60 e 120 g/L de NaCl. Todos os isolados apresentaram a capacidade de crescer nas quatro concentrações de NaCl avaliadas, com exceção do isolado *Exiguobacterium* sp. sac36 que não cresceu na concentração de 120 g/L de NaCl no meio. Realizaram-se ensaios de acúmulo de polihidroxialcanoatos (PHA) e evidenciou-se que quatro isolados do gênero *Bacillus* são capazes de acumular 3-hidroxibutirato (3HB) a partir de glicose, xilose, e alguns destes em glicerol. Adicionalmente, confirmou-se que quando há altas concentrações de NaCl no meio, o acúmulo de 3HB dos isolados produtores diminui. Observou-se também que doze isolados halotolerantes são produtores de exopolissacarídeos (EPS). Testes realizados indicaram que os mesmos podem ter efeitos imunoestimulantes em macrófagos. Finalmente, avaliou-se a produção de ácido hialurônico (AH) pelos isolados halotolerantes. Segundo sugere o método de *Alcian blue*, todos os isolados foram capazes de produzir AH, mostrando que a maior parte deles acumulou o biopolímero em concentrações maiores ou semelhantes ao controle. Os resultados obtidos evidenciam que os isolados halotolerantes avaliados são uma fonte rica em compostos com atividades promissoras para as diferentes indústrias. O presente trabalho contribui no estudo do potencial biotecnológico de microrganismos isolados no bioma caatinga, destacando sua biodiversidade, versatilidade e a necessidade de continuar explorando esses ambientes extremos pouco estudados.

Palavras-chave: Microrganismos halotolerantes. Biopolímeros. Polihidroxialcanoatos. Exopolissacarídeos. Atividade imunoestimulatória. Ácido hialurônico. Ambientes extremos.

ABSTRACT

PARADA M. P. P. **Characterization of halotolerant bacteria isolated from Caatinga and evaluation of biopolymers production.** 2016. 115 p. Dissertation (Master thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Extremophile organisms are considered reservoirs of new biomolecules of biotechnological interest. In this group there are microorganisms that require high salt concentration to grow, called halophiles, and halotolerant microorganisms, that do not need salt to proliferate but can tolerate high concentrations of NaCl. Saline environments proved to be a rich source of new natural compounds by halotolerant producers and therefore, research in these environments becomes of great importance. In Brazil, in the saline region of Areia Branca in the caatinga biome, halotolerant bacteria were isolated and studied in order to evaluate the production of new biopolymers of biotechnological interest. It is believed that the natural polymers of those extreme microorganisms could have innovative applications or different characteristics from the traditional biopolymers. In this study, the isolates were identified at the genus level based on 16S rRNA gene sequence analysis. Isolates were mainly Gram-positive bacteria from Bacillaceae, Staphylococcaceae and Microbacteriaceae families, and *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Staphylococcus* and *Curtobacterium* genera. One of the Gram-negative isolate was identified as member of the Pseudomonadaceae family, genus *Pseudomonas*. The evaluation of salt tolerance of the bacterial isolates on TSB medium supplemented with 5, 35, 60 and 120 g / L NaCl was performed. All the isolates showed the ability to grow in the four concentrations evaluated, except for *Exiguobacterium* sp. sac36, that did not grow at 120 g / L NaCl. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation assays were performed using glucose, xylose and glycerol as carbon source. The results showed that four strains of the genus *Bacillus* were able to accumulate 3-hydroxybutyrate (3HB) in all conditions. Additionally, it was confirmed that the presence of high concentrations of NaCl in the medium causes a decrease in 3HB accumulation in the cells. It was observed that twelve halotolerant bacteria produced exopolysaccharides (EPS). Tests performed indicated that those EPS could have immunostimulatory effects on macrophages. Finally, hyaluronic acid (HA) production was evaluated. According to Alcian blue method, all strains were able to produce HA, showing that most of the isolates accumulated the biopolymer in higher or similar concentrations to the control. The results showed that the halotolerant isolates are a rich source of compounds with promising activities for different industries. This study contributes to the knowledge of microorganisms from the caatinga biome and their biotechnological potential, highlighting their biodiversity, versatility and the need to continue exploring these poorly studied extreme environments.

Keywords: Halotolerant microorganisms. Biopolymers. Polyhydroxyalkanoate. Exopolysaccharides. Immunostimulating activity. Hyaluronic acid. Extreme environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral dos extremófilos de diferentes condições extremas.....	24
Figura 2 - Aplicação de microrganismos extremófilos em biotecnologia, medicina e indústria.....	25
Figura 3 - Estruturas químicas de alguns polímeros bacterianos.....	30
Figura 4 - Estrutura química do poliéster polihidroxicanoato.....	31
Figura 5 - Estrutura química dos poliésteres polihidroxibutirato (PHB) e poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (3HB-co-3HV).....	32
Figura 6 - Estrutura da unidade do dissacarídeo de ácido hialurônico.....	36
Figura 7 - Local coleta.....	41
Figura 8 - Plantas coletadas.....	41
Figura 9 - Esquema dos procedimentos realizados para seleção, produção e determinação de PHA a partir dos isolados halotolerantes.....	45
Figura 10 - Esquema dos procedimentos realizados para seleção de isolados produtores de EPS.....	48
Figura 11 - Fluxograma esquemático dos procedimentos realizados para produção e extração de EPS.....	49
Figura 12 - Abundância de gêneros bacterianos a partir de amostras de solo rizosférico da caatinga.....	55
Figura 13 - Árvore filogenética do gênero <i>Bacillus</i>	56
Figura 14 - Árvore filogenética do gênero <i>Curtobacterium</i>	57
Figura 15 - Árvore filogenética do gênero <i>Exiguobacterium</i>	58
Figura 16 - Árvore filogenética do gênero <i>Staphylococcus</i>	59
Figura 17 - Árvore filogenética do gênero <i>Pseudomonas</i>	61
Figura 18 - Crescimento dos isolados em diferentes concentrações de NaCl.....	62
Figura 19 - Curvas de crescimento de isolados halotolerantes da caatinga.....	64
Figura 20 - Triagem qualitativa de produção de PHA com Sudan Black B.....	68
Figura 21 - Espectro de cromatografia gasosa.....	69
Figura 22 - Árvore filogenética dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> produtores de PHA.....	70
Figura 23 - Gráficos do perfil de acúmulo do monômero 3HB.....	77

Figura 24 - Teste qualitativo de produção de EPS por isolados halotolerantes	81
Figura 25 - Árvore filogenética do isolado do gênero <i>Pseudomonas</i> produtor de EPS .	81
Figura 26 - Árvore filogenética do isolado do gênero <i>Curtobacterium</i> produtor de EPS	82
Figura 27 - Árvore filogenética dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> produtores de EPS	84
Figura 28 - Detecção de nitrito no sobrenadante de macrófagos murinos	86
Figura 29 - Morte celular quantificada pela redução do MTT	88
Figura 30 - Gráfico da concentração relativa de AH.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extremófilos e algumas aplicações em biotecnologia e indústrias	25
Tabela 2 - Aplicações industriais atuais e potenciais dos microrganismos halófilos.....	27
Tabela 3 - Biopolímeros microbianos de importância comercial	29
Tabela 4 - EPS produzidos por microrganismos isolados de ambientes hipersalinos ...	35
Tabela 5 - Condições da reação de PCR para a amplificação do gene RNAr 16S.....	43
Tabela 6 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes RNAr 16S.....	43
Tabela 7 - Isolados bacterianos obtidos na região de Areia Branca, distrito de de Mossoró, Rio Grande do Norte	54
Tabela 8 - Triagem e produção de PHA	67
Tabela 9 - Produção de PHB por isolados halotolerantes do gênero <i>Bacillus</i>	72
Tabela 10 - Produção de PHB por dois isolados halotolerantes do gênero <i>Bacillus</i>	76
Tabela 11 - Produção de PHA por bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	78
Tabela 12 - Isolados halotolerantes produtores de EPS.....	80
Tabela 13 -Screening de produção e quantificação de AH.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB	3-hidroxibutirato
3HB-co-3HV	3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato
3HD	3-Hidroxidecanoato
3HDD	3-Hidroxidodecanoato
3HHp	3-Hidroxiheptanoato
3HHx	3-Hidroxihexanoato
3HO	3-Hidroxi octanoato
3HN	3-Hidroxinonanoato
3HV	3-Hidroxivalerato
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
AH	Ácido hialurônico
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EPS	Exopolissacarídeos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	<i>Flame ionization detector</i>
Fru	D-Frutose
Gal	D-Glactose
GalN	D-Galactosamina
Glc	D-Glicose
GlcN	D- Glicosamina
HSV-2	Herpes simples tipo 2
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IL	Interleucina

Kb	Quilobases
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolissacáridos
M	Molar
MLSA	<i>Multi-Locus Sequence Analysis</i>
MM	Meio mineral
mM	Milimolar
MMG	Meio Mineral Glicose
MMX	Meio Mineral Xilose
MPa	Megapascal
MSC	Massa Seca Celular
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetros
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	Reação em Cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoato
<i>phaA</i>	Gene codificador da enzima β -cetotilase
<i>phaB</i>	Gene codificador da enzima acetoacetyl-CoA reductase
<i>phaC</i>	Gene codificador da enzima PHA sintase
PHAMCL	Polihidroxialcanoato com monômeros de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês <i>medium chain length</i>)
PHASCL	Polihidroxialcanoato com monômeros de cadeia média (3-5 carbonos) (do inglês <i>short chain length</i>)
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato
pb	Pares de base
rpm	Revoluções por minuto
sac	Salinas caatinga

TAE	Tris-acetato-EDTA
TBT	Tributilestanho
TNF	Fator de necrose tumoral
TSA	Ágar Triptona Soja
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
ÚNICA	União da Industria de Cana-De-Açúcar

LISTA DE SÍMBOLOS

>: maior que

<: menor que

≥: maior ou igual a

°C: graus Célsius

°C/min: graus Célsius por minuto

C-: Controle negativo

C+: Controle positivo

g/L: gramas por litro

ml/L: mililitros por litro

ml/min: mililitros por minuto

m/v: massa por volume

ng/μl: nanograma por microlitro

S: Sul/*South*

v/v: volume por volume

W: Oeste/*West*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Ambientes extremos e microrganismos extremófilos	23
2.2 Microrganismos halófilos e halotolerantes	26
2.3 Biopolímeros	28
2.3.1 Polihidroxicarboxilatos (PHA)	30
2.3.2 Exopolissacarídeos (EPS)	33
2.3.2.1 Ácido Hialurônico (AH)	35
3 OBJETIVO	38
3.1 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Meios de cultura, tampões e soluções	39
4.2 Material biológico	40
4.3 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos	42
4.4 Identificação dos isolados	42
4.4.1 Análise filogenética dos isolados	44
4.5 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl	44
4.6 Produção de biopolímeros	45
4.6.1 Determinação quantitativa de PHA	46
4.6.2 Ensaios de acúmulo em glicose e xilose	47
4.6.3 Acúmulo de PHA em três fontes de carbono e em diferentes concentrações de NaCl	47
4.6.4 Seleção de isolados produtores de EPS	47
4.6.5 Produção e extração de EPS	48
4.6.6 Estudo da atividade imunoestimulatória dos EPS	50
4.6.6.1 Avaliação da ativação de macrófagos e Teste do Griess	50
4.6.6.2 Teste de viabilidade celular	51
4.6.7 Curva padrão de ácido hialurônico	51

4.6.7.1 Tabela Ensaio de produção e quantificação de AH.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl	62
5.2 Ensaio de produção de PHA	65
5.2.1 Seleção, produção e determinação de PHA	66
5.3 Ensaio de produção de EPS	79
5.3.1 Seleção de isolados produtores de EPS	79
5.3.2 Produção, extração de EPS e ensaios de ativação de macrófagos	84
5.3.3 Ensaio de morte celular.....	87
5.4 Ensaio de produção de Ácido Hialurônico	89
6 CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICES.....	95
APÊNDICE A - Curvas de crescimento dos isolados da caatinga em meio TSB suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl.....	110
APÊNDICE B - Curva padrão de ácido hialurônico.....	115

1 INTRODUÇÃO

Os organismos que vivem nos extremos de pH ($>pH8.5$, $<pH 5.0$), temperatura ($>45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $<15\text{ }^{\circ}\text{C}$), pressão (>500 atmosferas), salinidade ($>58,4$ g/L de NaCl) e em concentrações elevadas de compostos recalcitrantes ou metais pesados são conhecidos como extremófilos (PODAR; REYSENBACH, 2006). Graças às diferentes estratégias de adaptação que estes organismos desenvolveram para proliferar em ambientes extremos e também a capacidade de biossíntese de diferentes metabólitos, atualmente são considerados reservatórios de novas biomoléculas com potencial biotecnológico (DE CARVALHO; FERNANDES, 2010).

Dentro deste grupo, estão os microrganismos halófilos, que são aqueles que requerem altas concentrações de sal para crescer e podem ser classificados como: halófilos moderados, halófilos extremos limítrofes e halófilos extremos. No entanto, existe outra classificação para aqueles microrganismos que, embora não precisem de sal, toleram altas concentrações ($\geq 58,4$ g/L) de NaCl, sendo então chamados de halotolerantes (HAMEDI; MOHAMMADIPANAH; VENTOSA, 2013; JAIN; NAGAL; JAIN, 2012; OREN, 2010; VENTOSA; ARAHAL, 2011).

Estes microrganismos podem ser encontrados nos três domínios da vida; Archaea, Bacteria e Eukarya, e têm sido isolados de ambientes hipersalinos das diversas áreas geográficas da Terra, tais como lagos salinos, pântanos de água salgada, desertos e mares (DALY, 2010; JAIN; NAGAL; JAIN, 2012; VENTOSA et al., 2008, 2015). Por outro lado, destacam-se também por serem possíveis produtores de diversos compostos de importância médica, alimentar, ambiental e cosmética (YIN et al., 2014).

Em particular, os biopolímeros destes organismos são macromoléculas interessantes que têm sido utilizadas recentemente em aplicações biomédicas e agroindustriais devido às suas propriedades terapêuticas e biodegradáveis, como, por exemplo, a capacidade imunoestimuladora em células humanas de sangue e atividade antioxidante para terapia contra o câncer (GUGLIANDOLO et al., 2014; RAVEENDRAN et al., 2015; YE et al., 2016).

Do mesmo modo, muitos desses microrganismos são capazes de acumular biopolímeros, como os polihidroxialcanoatos (PHA), uma família de plásticos

biodegradáveis que representam uma alternativa promissora para substituir os plásticos derivados do petróleo, usando diferentes substratos de baixo custo (HUANG et al., 2016; MOORKOTH; NAMPOOTHIRI, 2016).

Igualmente, existe um grande interesse nos exopolissacarídeos (EPS), polímeros de elevado peso molecular sintetizados e acumulados na superfície das células de bactérias halotolerantes, devido às suas atividades biológicas inovadoras tais como: antioxidantes, imunoestimulantes, antitumorais e antivirais (GUGLIANDOLO et al., 2014; SPANÒ; ARENA, 2016; YE et al., 2012). Além disso, produzem solutos compatíveis, como a ectoína e a hidroxietoína, comercialmente utilizados como agentes de proteção para células de mamíferos e peles (YIN et al., 2014).

Como se pode constatar, os ambientes salinos são uma fonte rica de microrganismos produtores de novos compostos naturais de interesse biotecnológico e a pesquisa nestes ambientes tornou-se de grande importância nos últimos anos (ZHANG et al., 2005). No caso particular do Brasil, encontram-se regiões salinas no bioma caatinga que representam uma fonte única de recursos naturais pouco estudados.

A caatinga é um bioma único que cobre uma vasta área no nordeste do Brasil, que corresponde a quase 10 % do território brasileiro (DE ALBUQUERQUE et al., 2007). Este bioma, segundo a United Nations Environmental Programme (2007), tem um clima semiárido, ou seja, possui um índice de aridez de 0,2-0,5 (valores descritos para regiões desérticas), o qual considera tanto as precipitações em mm e temperaturas médias anuais, e apresenta duas estações bem definidas: chuvosa e seca, com predominância de um clima seco e quente.

Por outro lado, existem poucos estudos sobre o potencial biotecnológico de microrganismos nesta região (FERREIRA, 2014). Por esta razão, foram isoladas bactérias halotolerantes na região salina de Areia Branca no bioma caatinga, com o intuito de avaliar a produção de PHA e EPS de interesse biotecnológico. Acredita-se que os polímeros naturais desses microrganismos extremos podem ter aplicações inovadoras ou características diferentes às tradicionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A importância ecológica e biotecnológica dos microrganismos extremófilos explica-se pela capacidade para sintetizar diferentes metabólitos com atividade biológica, enzimas, biopolímeros, entre outros compostos. À continuação, descreve-se algumas generalidades dos ambientes extremos, em particular dos habitats salinos, assim como algumas características dos microrganismos halófilos e alguns dos produtos que podem sintetizar.

2.1 Ambientes extremos e microrganismos extremófilos

Um ambiente extremo é aquele em que algum fator físico, químico ou biológico cai fora do limite de um intervalo normal, tornando-se inabitável para os seres humanos e outros organismos (ALBARRACÍN; GÄRTNER; FARIAS, 2016; LINDGREN et al., 2016). Alguns exemplos dos ambientes mais "extremos" na Terra incluem fontes termais, o fundo do mar, regiões glaciais, lagoas do deserto e águas com pouco ou nenhum oxigênio (LINDGREN et al., 2016). Esses ambientes de condições adversas são definidos não só pelos extremos nas características abióticas, incluindo temperatura, pressão, pH, saturação de oxigênio e salinidade, mas também podem ser influenciados por características biológicas tais como pouco ou baixa disponibilidade de nutrientes, alta densidade populacional ou baixa disponibilidade de presas.

Nas duas últimas décadas têm aumentado o interesse pelo mundo dos microrganismos que vivem em condições extremas (JOGHEE; JAYARAMAN, 2014). Sabe-se que alguns microrganismos adaptaram-se às condições extremas, ocupando nichos considerados incomuns para a vida normal de animais, plantas e outros organismos (DHAKAR; PANDEY, 2016). Assim, extremos de temperatura, pH, potencial de oxido-redução, salinidade, umidade e diferentes combinações destes, que caracterizam a maioria dos diversos habitats terrestres e aquáticos, são colonizados por estes microrganismos (DHAKAR; PANDEY, 2016; LINDGREN et al., 2016; STOTT; TAYLOR, 2016; VARSHNEY et al., 2015). O termo "extremófilos" foi cunhado por Macelroy em 1974 e os primeiros extremófilos reconhecidos foram os microrganismos

que vivem em altas temperaturas (termófilos) e em concentrações elevadas de sal (halófilos) (DHAKAR; PANDEY, 2016; LINDGREN et al., 2016).

Os extremófilos se encontram nos três domínios da vida, porém, principalmente pertencem aos domínios Archaea e Bacteria (NEIFAR et al., 2015; SARMIENTO; PERALTA; BLAMEY, 2015). É um grupo de microrganismos funcionalmente diverso e inclui termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos, barófilos / piezófilos, metalófilos e radiófilos (Figura 1) (RADDADI et al., 2015). No seu habitat natural, os extremófilos desenvolveram estratégias e mecanismos exclusivos para manter seus componentes celulares estáveis e ativos, o que permite-lhes tolerar e sobreviver aos fatores extremos de tais ambientes (ALBARRACÍN; GÄRTNER; FARIAS, 2016; ELLEUCHE et al., 2015; SARMIENTO; PERALTA; BLAMEY, 2015).

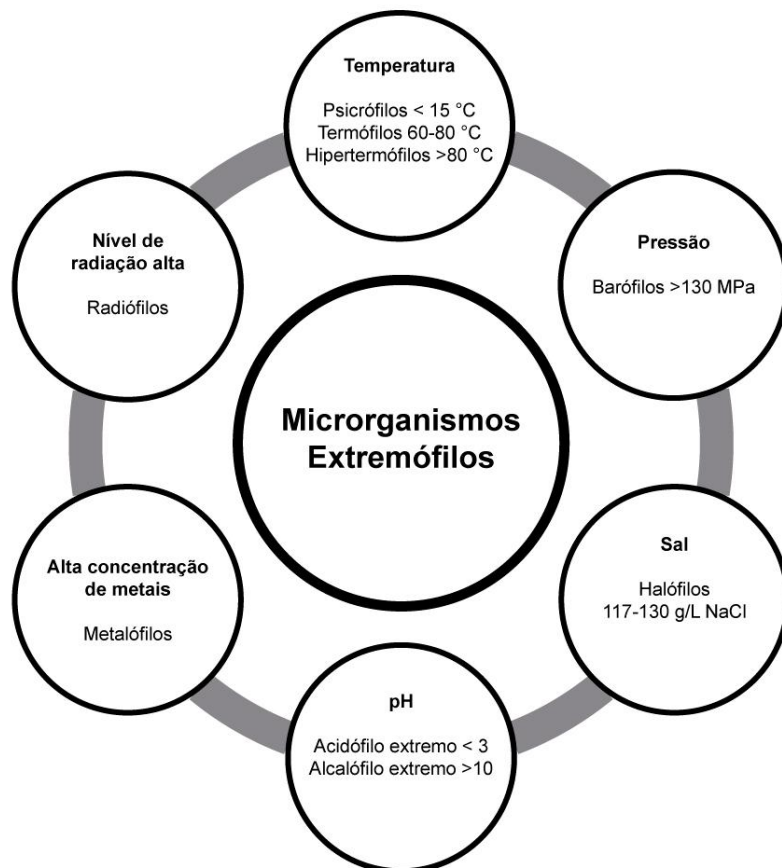


Figura 1 - Visão geral dos extremófilos de diferentes condições extremas. Fonte: Adaptada (DHAKAR e PANDEY, 2016)

Como resultado à adaptação ao seu ambiente, muitos microrganismos extremófilos têm desenvolvido propriedades únicas e de considerável importância biotecnológica e comercial, sendo fonte de enzimas, metabólitos, biopolímeros e outros materiais biológicos (Figura 2) (Tabela 1) (ALBARRACÍN; GÄRTNER; FARIAS, 2016; NEIFAR et al., 2015).

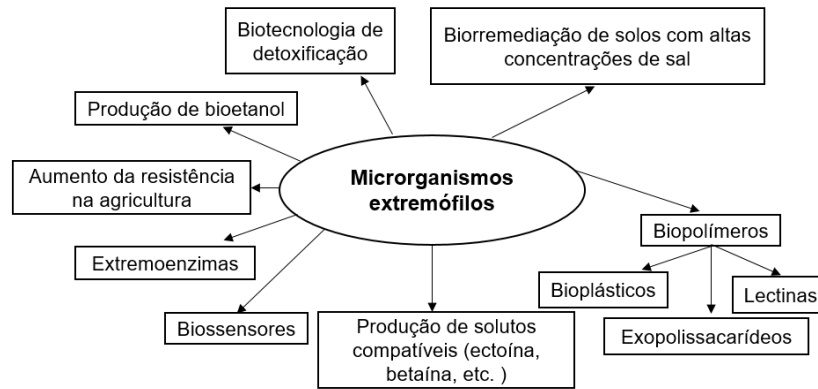


Figura 2 - Aplicação de microrganismos extremófilos em biotecnologia, medicina e indústria. Fonte: Adaptada (MOROZKINA et al., 2010)

Tabela 1 - Extremófilos e algumas aplicações em biotecnologia e indústrias

Extremófilos	Gênero	Uso-produto	Aplicações	Referência
Termófilos	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Biossíntese extracelular de nanopartículas de ouro	Biocatálise	(JUIBARI et al., 2015)
Psicrófilos	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Atividade tripanocida, antifúngica e antibacteriana.	Desenvolvimento de novas drogas	(GONÇALVES et al., 2015)
Halófilos	<i>Halomonas maura</i>	Mauran (polissacarídeo)	Mecanismo antioxidante- Terapia do câncer	(RAVEENDRAN et al., 2015)
Barófilos	<i>Photobacterium profundum</i> SS9	Acumulação de solutos	Processamento de alimentos e produção de antibióticos	(MOTA et al., 2013; NEIFAR et al., 2015)
Metalófilos	<i>Moraxella osloensis</i>	Biodegradação de tributilestanho (TBT)	Biorremediação	(YÁÑEZ et al., 2015)
Acidófilos	<i>Trametes hirsuta</i>	Amilases e glucoamilases (enzimas)	Biodegradação, promoção de crescimento vegetal e controle biológico.	(DHAKAR; PANDEY, 2016)
Alcalófilo	<i>Anditalea andensis</i> ANESC-S ^T	Geração de energia elétrica em condições alcalinas	Tratamento de água poluída- Biorremediação	(SHI et al., 2015)
Radiófilos	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Bacterioruberin (carotenoide)	Reparo de DNA danificado- prevenção câncer de pele	(VATSA et al., 2014)

2.2 Microrganismos halófilos e halotolerantes

Os ambientes salinos são habitats extremos com diversidade microbiana limitada devido aos efeitos combinados de diversos fatores ambientais, incluindo altas concentrações de sal, temperatura, pH e baixa disponibilidade de nutrientes e de oxigênio (VENTOSA et al., 2015). Os microrganismos halófilos podem crescer nesses ambientes já que requerem altas concentrações de sal para proliferar e são classificados segundo seu crescimento ótimo em diferentes concentrações do mesmo (HAMED; MOHAMMADIPANAH; VENTOSA, 2013; JAIN; NAGAL; JAIN, 2012).

Os dois grupos principais são os halófilos extremos (crescimento ótimo acima de 150 g/L NaCl) e halófilos moderados (crescimento ótimo entre 30-150 g/L NaCl). Em contraste, os halófilos leves apresentam um crescimento ótimo num meio com 10-30 g/L NaCl (VENTOSA et al., 2015). No entanto, existe outra classificação para aqueles microrganismos que não precisam de sal para se desenvolver, mas toleram altas concentrações de NaCl ($\geq 58,4$ g/L) chamados de halotolerantes (HAMED; MOHAMMADIPANAH; VENTOSA, 2013; JAIN; NAGAL; JAIN, 2012).

Estes microrganismos têm sido isolado de lugares como lagos hipersalinos, solos salinos, fontes hidrotermais, produtos alimentares salgados, e também em alguns lugares inesperados, bem como salmouras no fundo do mar, sobre as plantas que excretam sais de suas folhas e até nas pinturas antigas das paredes (DALY, 2010).

Para que os microrganismos halófilos e halotolerantes possam viver e tolerar essas condições extremas desenvolveram diferentes mecanismos especiais de adaptação e resistência, tais como *High-salt-in-strategy* e *Low-salt-in-strategy* que evitam o NaCl difundir-se para dentro das células (OREN, 2008). Os microrganismos que seguem a estratégia *High-salt-in*, principalmente arqueias aeróbias e bactérias anaeróbias (halófilos extremos), acumulam concentrações molares de potássio (K^+) e cloreto (Cl^-) no citoplasma, além de adaptar a maquinaria enzimática intracelular na presença de concentrações elevadas de sais. Por outro lado, a estratégia *Low-salt-in* é usada principalmente no domínio Bacteria (halófilos moderados e halotolerantes) e consiste na biossíntese e/ou acumulação de solutos orgânicos, também chamados solutos compatíveis, de baixo peso molecular e solúveis em água (JAIN; NAGAL; JAIN,

2012; JOGHEE; JAYARAMAN, 2014; OREN, 2008). Esses solutos podem agir como estabilizadores de estruturas biológicas e também permitem que as células se adaptem ao calor, dessecação, frio e até condições de congelamento (JAIN; NAGAL; JAIN, 2012; OREN, 2008; YIN et al., 2014).

Quando comparados com outros grupos de microrganismos extremófilos como os termófilos, os halófilos têm sido relativamente pouco explorados em processos biotecnológicos, com algumas exceções. No entanto, devido às suas habilidades de osmoadação e capacidades metabólicas para a produção de solutos compatíveis, produtos nutricionais, biopolímeros e enzimas halofílicas, representam um potencial promissor em diversas indústrias, incluindo produtos químicos, ambientais, biocombustíveis, médicos, farmacêuticos e de cuidado da saúde (Tabela 2) (DIKEN et al., 2015).

Tabela 2 - Aplicações industriais atuais e potenciais dos microrganismos halófilos (YIN et al., 2014)

Produto	Aplicação	Produtor representativo
Polihidroxibutirato (PHB)	Biomateriais, plástico	<i>Halomonas boliviensis</i> <i>Halomonas</i> sp. TD01
Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)	Plástico, materiais médicos	<i>Haloferax mediterranei</i>
Ectoína	Protetor de proteínas e células, proteção da membrana celular	<i>Halomonas elongata</i>
	Proteção antienvhecimento da pele	<i>Halomonas salina</i>
Hidroxiectoína	Proteção das proteínas contra mal dobramento, degradação e congelamento	<i>Marinococcus</i> M52
Amilases	Indústria alimentícia	<i>Halomonas</i> sp. <i>Halobacillus</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp.
Proteases	Aditivos em produtos farmacêuticos, detergentes para a roupa	<i>Bacillus</i> sp. <i>Halobacillus</i> sp. <i>Chromohalobacter</i> sp.
Xilanases e celulases	Biolixiviação, hidrólise da celulose, biocombustíveis	<i>Streptomonospora</i> sp. <i>Halomonas</i> sp.
Biossurfactantes e bioemulsionantes	Solubilização de substratos hidrofóbicos	<i>Halomonas</i> spp. <i>Natrialba</i> sp. linhagem E21
β- caroteno	Aditivo alimentar	<i>Dunaliella</i> spp.
Glicerol	Indústrias de cosméticos	<i>Dunaliella</i> spp.

2.3 Biopolímeros

Os biopolímeros de origem microbiana são moléculas solúveis em água produzidos diretamente através de fermentação ou por polimerização química de monômeros (processo que acontece também na fermentação) (MOKHTARZADEH et al., 2016; SUKAN; ROY; KESHAVARZ, 2015). A maior parte desses polímeros industrial e clinicamente relevantes foi encontrada no início e meados do século XX, tais como o alginato, goma xantana, poli- γ -glutamato e polifosfatos (REHM, 2010). Nos últimos anos, os biopolímeros mostraram-se promissores como nanomateriais não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (MOKHTARZADEH et al., 2016).

De acordo com a estrutura e composição química, esses compostos podem ser categorizados em quatro classes principais: polissacarídeos, poliésteres, poliamidas e polianidridos (Tabela 3) (Figura 3) (KREYENSCHULTE; KRULL; MARGARITIS, 2014). Estes polímeros cumprem várias funções biológicas, por exemplo, como material de reserva ou como parte de uma estrutura de proteção, e podem proporcionar uma vantagem substancial para os microrganismos, sob certas condições ambientais (NICOLAUS et al., 2004; SUKAN; ROY; KESHAVARZ, 2015).

Tabela 3 - Biopolímeros microbianos de importância comercial (KREYENSCHULTE; KRULL; MARGARITIS, 2014; REHM, 2010)

Classe de polímero	Fonte	Localização do polímero	Componentes principais	Aplicações industriais
Polissacarídeos				
Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Azotobacter</i> spp.	Extracelular	Ácido manurônico e ácido gulurônico	Biomaterial, produtos agrícolas, cosméticos, recuperação de óleo, indústria do papel.
Dextrano	<i>Leuconostoc</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Gluconobacter</i> sp. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Extracelular	Glicose	Expansor do plasma sanguíneo, remoção de metais pesados, cosméticos.
Ácido Hialurônico	<i>Streptococcus</i> spp. <i>S. equi</i> <i>Pasteurella multocida</i>	Extracelular	Glucuronato e N-acetilglucosamina	Cosméticos, reparação de tecidos e entrega de drogas
Poliamidas				
Poli- γ -glutamato	<i>Bacillus</i> spp. <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Fusobacterium Nucleatum</i> , <i>Natronococcus occultus</i> <i>Natrialba aegyptiaca</i>	Extracelular ou cápsula	D-glutamato e/ou L-glutamato	Substituição de poliacrilato, fertilizante, espessante, agente humectante, entrega de drogas e cosméticos
Poliéster				
Polihidroxi lcanoatos	Bacteria e Archaea	Intracelular	(R) -3-Hidroxi ácidos graxos	Bioplásticos e biomateriais
Polianidridos				
Polifosfatos	Bacteria e Archaea	Intracelular	Fosfato	Agente antibacteriano, substituto de ATP na síntese enzimática e intensificador de sabor

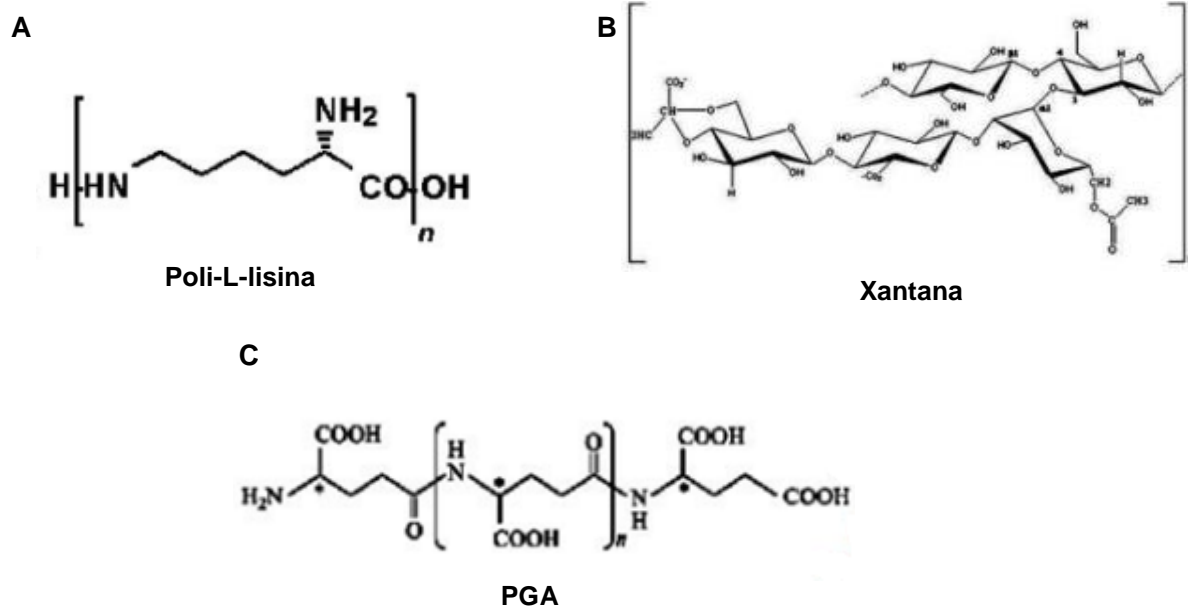


Figura 3 - Estruturas químicas de alguns polímeros bacterianos. A, Poli-L-lisina, B, Xantana, e C, PGA. Fonte: Adaptada (MOKHTARZADEH et al., 2016)

2.3.1 Polihidroxicanoatos (PHA)

Os plásticos tornaram-se uma parte importante da vida moderna e são utilizados em diferentes setores, como embalagens, materiais de construção, produtos de consumo, entre outros. Estima-se que cada ano cerca de 100 milhões de toneladas de plástico são produzidos em todo o mundo, usando principalmente material petroquímico que não pode ser degradado facilmente. A utilização desses materiais plásticos não biodegradáveis tem causado a poluição ambiental e, portanto, os bioplásticos têm emergido como uma alternativa útil para evitar a poluição do meio ambiente. (KUMAR et al., 2013; SINGH et al., 2011).

Os polihidroxicanoatos (PHA), conhecidos como bioplásticos bacterianos, representam uma grande família de poliésteres biodegradáveis (Figura 4), biocompatíveis e renováveis, acumulados na forma de grânulos intracelulares por uma ampla variedade de bactérias como compostos de armazenamento de carbono e energia (SILVA et al., 2014; YUE et al., 2014). As características mecânicas e físicas desses biopolímeros se assemelham às dos plásticos derivados do petróleo (LOPES et al., 2009; RIVERA-TERCEROS et al., 2015).

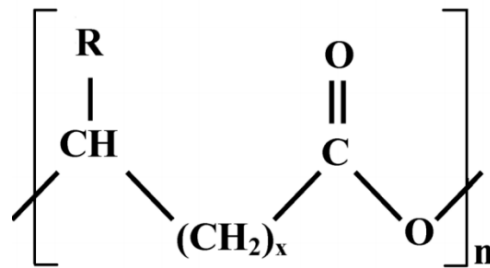


Figura 4 - Estrutura química do poliéster polihidroxicanoato. *R* = cadeia alquílica de 1-13 átomos de carbono. Fonte: Adaptada (PRADOS e MAICAS, 2016)

Os plásticos microbianos podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, como resíduos agroindustriais, e através de um processo de fermentação sob condições de restrição de crescimento de nitrogênio, fósforo, enxofre e/ou oxigênio na presença de um excesso de fonte de carbono (NARANJO et al., 2013b).

Os PHA podem variar consideravelmente na composição do polímero. Existem mais de 150 componentes conhecidos, o que resulta numa enorme diversidade de propriedades do biopolímero. As propriedades termoplásticas que apresentam os PHA, como a cristalinidade compreendida entre 30-70% e temperaturas de fusão de 50-180 °C, fazem que sejam comercialmente relevantes como alternativas de plásticos derivados de petróleo (REHM, 2010).

Estes poliésteres podem ser classificados em dois grandes grupos pelo comprimento da cadeia: PHA de cadeia média (PHA_{MCL} do inglês *medium chain length*) que contêm monômeros com 6 a 14 átomos de carbono na cadeia principal, sendo produzidos principalmente por *Pseudomonas*, e PHA de cadeia curta (PHA_{SCL}, *short chain length*) constituídos por monômeros contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, produzidos por uma ampla gama de bactérias e arqueias (SURIYAMONGKOL et al., 2007).

O polihidroxibutirato (PHB), primeiro tipo de PHA descoberto, e o copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (3HB-co-3HV) são os PHAs mais estudados (Figura 5) (LOPES et al., 2009). O PHB tem propriedades mecânicas semelhantes aos plásticos convencionais como o polietileno e o polipropileno, mas os seus custos de produção são mais elevados do que os plásticos petroquímicos (SUKAN; ROY;

KESHAVARZ, 2015). O custo total de produção de PHB depende do microrganismo (rendimento e produtividade), as fontes de carbono e de nitrogênio (substratos), as condições de fermentação (temperatura, aeração, pH) e os processos de recuperação e purificação (NARANJO et al., 2013b; PRADOS; MAICAS, 2016).

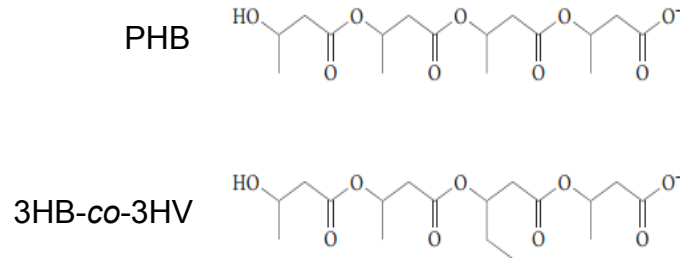


Figura 5 - Estrutura química dos poliésteres polihidroxibutirato (PHB) e poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (3HB-co-3HV). Fonte: Adaptada e modificada (REHM, 2010)

A via metabólica para a produção de PHB envolve três enzimas distintas. O primeiro passo é catalisado pela enzima β -cetotiolase (codificada por *phaA*), pela qual duas moléculas de acetil-CoA reagem para formar acetoacetil-CoA. O acetoacetil-CoA é então reduzido pela enzima acetoacil-CoA redutase NADPH dependente (codificada por *phaB*). Finalmente, os monómeros [(R) -3-hidroxibutiril-CoA] são polimerizados em PHB pela PHB sintase (codificada por *phaC*) (KUMAR et al., 2013).

Na produção industrial de PHB, o custo da fonte de carbono tem-se considerado como um dos principais fatores limitantes para a produção de polímeros, pois representa mais de 50% dos custos totais de produção (NARANJO et al., 2013a; SILVA et al., 2014). Portanto, a produção de PHB utilizando outras fontes baratas, tais como agroresíduos e o resíduos de várias indústrias podem contribuir significativamente para reduzir os custos de fabricação (SINDHU et al., 2013).

Na literatura tem-se descrito alguns microrganismos capazes de produzir PHB a partir de diversos resíduos agroindustriais, os quais pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Halomonas*, *Ralstonia*, *Azotobacter*, *Cupriavidus*, *Methylobacterium* (SANGKHARAK; PRASERTSAN, 2012; SILVA et al., 2014; SINGH et al., 2011).

Finalmente, os polímeros de PHA podem ser sintetizados por algumas espécies halófilas dos gêneros *Haloferax*, *Halococcus*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *Paracoccus* e *Rhodococcus*. Dependendo do gênero, alguns destes microrganismos são capazes de sintetizar, além de PHA, exopolissacarídeos (EPS) (DE JESUS ASSIS et al., 2016a).

2.3.2 Exopolissacarídeos (EPS)

O termo exopolissacarídeos foi usado pela primeira vez por Sutherland em 1972, para descrever polímeros de elevado peso molecular produzidos por bactérias marinhas (POLI; ANZELMO; NICOLAUS, 2010). Os exopolissacarídeos (EPS) podem ser polímeros naturais de elevado o baixo peso molecular, de resíduos de açúcar, biodegradáveis e não tóxicos, envolvidos em diversas funções, incluindo adesão, interações célula-célula, formação de biofilme, e proteção da célula em os ambientes extremos. Devido as suas propriedades físico-químicas, biológicas e reológicas, EPS como xantana, dextrano, pululano e gelano têm encontrado inúmeras aplicações em alimentação como agentes espessantes; na medicina como curativos de feridas, na indústria cosmética como protetor da pele e em setores ambientais como removedores de óleo e tratamento de águas poluídas (YILDIZ et al., 2015).

Os EPS podem ser obtidos a partir de fontes naturais como plantas, algas e microrganismos (WANG et al., 2016). EPS bacterianos são os componentes mais abundantes no ambiente, representando geralmente 40-95% dos polímeros extracelulares (SPANÒ et al., 2016). Porém, a produção de polímeros por microrganismos ainda é muito insignificante em comparação com a quantidade de polímeros derivados de plantas e animais (PAULO et al., 2012).

Contudo, nos últimos anos tem aumentado o interesse no isolamento e identificação de novos exopolissacarídeos microbianos, graças às evidências descritas por diferentes autores que sugerem que esses biopolímeros possuem efeitos imunomoduladores, antioxidantes, antitumorais, antivirais, antibacterianos e antidiabéticos (GUGLIANDOLO et al., 2014; HEYMANN et al., 2016; SHIN et al., 2016; SPANÒ et al., 2016; SPANÒ; ARENA, 2016; WANG et al., 2016; ZHENG et al., 2013).

Estes compostos são produzidos por uma grande variedade de bactérias e algumas espécies de Archaea. Para alguns microrganismos os EPS são altamente importantes como um mecanismo de defesa e adaptação a condições ambientais extremas (KAVAMURA et al., 2013a; SIRAJUNNISA et al., 2016). A maioria dos EPS bacterianos têm estruturas complexas e diversas que conferem diversas propriedades funcionais, comercialmente relevantes e atraentes para diferentes sectores industriais, entre esses, o setor da saúde (SHIN et al., 2016).

São conhecidos, até o momento, quatro mecanismos gerais para a produção destes polímeros de hidratos de carbono em bactérias: (i) a chamada via Wzx/Wzy-dependente; (ii) transportadores dependentes de energia do tipo ABC; (iii) a via dependente de sintase e (iv) a síntese extracelular através da utilização de uma única proteína de sacarose (SCHMID; SIEBER; REHM, 2015).

A produção de EPS por muitas bactérias, apenas algumas gramas por litro, é bastante baixa para sua utilização prática. Em contraste, algumas espécies são conhecidas por seus altos níveis de produção. Entre elas, cepas de *Xanthomonas campestris*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Sphingomonas elodea* são as mais estudadas e apenas alguns são utilizados em nível industrial (SILVI et al., 2013).

Por outro lado, os EPS microbianos são abundantes em ambientes marinhos, onde eles podem ajudar as comunidades microbianas a suportar grandes variações de temperatura, salinidade e limitação de nutrientes (POLI; ANZELMO; NICOLAUS, 2010). Assim, os microrganismos halófilos e halotolerantes têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos como estratégia para o crescimento, a adesão a substratos sólidos e a sobrevivência em condições adversas (Tabela 4) (SPANÒ; ARENA, 2016; UPADHYAY et al., 2016).

Tabela 4 - EPS produzidos por microrganismos isolados de ambientes hipersalinos (POLI; ANZELMO; NICOLAUS, 2010)

Microrganismo	Ambiente de origem	Descrição do EPS e composição química	Papel ecológico sugerido e potencial de aplicação biotecnológica
<i>Haloferax mediterranei</i>	Mar Mediterrâneo	→4)-β-D-GlcpNAcA-(1→6)-α-D-Manp-(1→4)-β-D-GlcpNAcA-3-O-SO ₃ --(1→	Candidato na recuperação de óleo, especialmente em depósitos de petróleo com alta concentração de salinidade
<i>Hahella chejuensis</i>	Amostra de sedimento marinho recolhido de Marado, Ilha de Cheju, República da Coreia	EPS nomeado EPS-R Glc:Gal (0.68:1.0)	Biosurfactante e desintoxicação de áreas poluídas a partir de óleos petroquímicos
<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS	Lago de sal em Cabo Russell na Antártida	Glc:Fru:GlcN:GalN (1.0:0.7:0.3:trace)	Alta viscosidade

2.3.2.1 Ácido Hialurônico (AH)

Meyer e Palmer (1934) descreveram um novo polissacarídeo isolado do corpo vítreo bovino. Eles descobriram que a substância continha um ácido urônico e um açúcar aminado, e chamaram o polímero de "ácido hialurônico". O termo "hialuronan" foi introduzido em 1986 para estar em conformidade com a nomenclatura dos polissacáridos. Durante as décadas de 1930 e 1940, o AH foi isolado a partir de muitas fontes, tais como o corpo vítreo, cordão umbilical, crista galo, e de estreptococos (LIU et al., 2011).

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero natural (Figura 6) com peso molecular variando dentro do intervalo de 50 a 8000 kDa (KIM et al., 2008b), que desempenha

funções estruturais, de reconhecimento e de sinalização nos tecidos do corpo de humanos e animais (SHENG; LING; WANG, 2014; WIDNER et al., 2005; YU et al., 2008).

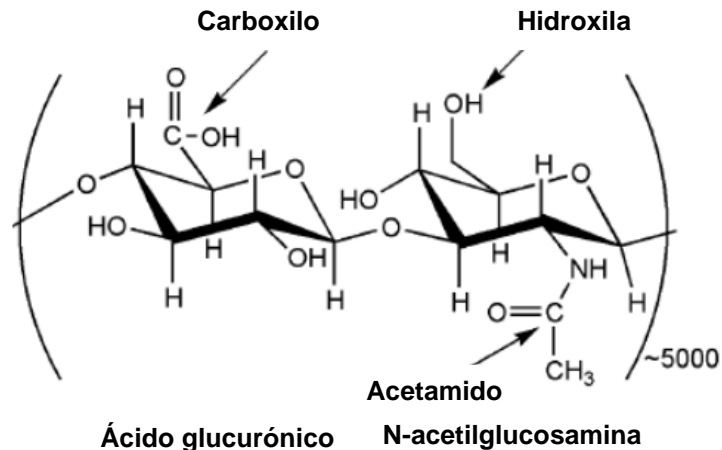


Figura 6 - Estrutura da unidade do dissacarídeo de ácido hialurônico. Fonte: Adaptada (LIU et al., 2011)

O AH é um glicosaminoglicano, com um hialuronato não ramificado ou polissacarídeo hialuronan como suporte principal composto por sequências alternadas do β - (1-4) de ácido glucurônico e porções de β - (1-3) N-acetilglucosamina, geralmente presente na sua forma de sal de sódio (KIM et al., 2008b).

Algumas bactérias marinhas tem sido descritas como produtoras de AH e algumas delas são modificadas geneticamente para produzir maiores quantidades do biopolímero em processos fermentativos (KIM et al., 2008b). Na indústria, o AH é produzido utilizando a bactéria Gram-positiva *Streptococcus zooepidemicus*. No entanto, o gênero *Streptococcus* não é uma fonte ideal para obtenção desse EPS, devido ao seu potencial para produzir exotoxinas, a dificuldade no controle da fermentação e do elevado custo do meio de cultivo necessário para o crescimento. Portanto, outros microrganismos produtores, fontes alternativas de AH, são desejáveis para a indústria (SHENG; LING; WANG, 2014).

Considerando a variedade de funções naturais, o AH tem aplicações na medicina sendo usado no tratamento da artrose do joelho por meio da viscosuplementação (infiltração de AH) e em cosméticos como preenchedores dérmicos (LIU et al., 2011). Também tem sido usado topicamente para a cura de queimaduras e úlceras, e em

procedimentos para extração de catarata, transplante de córnea, filtração de glaucoma, e em cirurgias de descolamento de retina (CHONG et al., 2005).

3 OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo geral caracterizar bactérias halotolerantes isoladas de um local salino do bioma caatinga e avaliar a produção de biopolímeros de interesse biotecnológico.

3.1 Objetivos específicos

- Identificar os isolados halotolerantes utilizando o gene RNAr 16S.
- Avaliar o crescimento das bactérias em diferentes concentrações de NaCl.
- Avaliar a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) em diferentes condições de cultura.
- Avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS) e detectar possível atividade imunoestimulatória.
- Avaliar a produção de ácido hialurônico (AH).

4 MATERIAL E MÉTODOS

No estudo foram utilizados meios de cultura e métodos descritos a seguir.

4.1 Meios de cultura, tampões e soluções

Todos os meios de cultura, tampões e soluções foram feitos com água destilada, e autoclavados a 121 °C durante 15 minutos.

Ágar Nutriente Modificado. Meio usado para o isolamento de microrganismos halotolerantes. Composição: Peptona (5 g/L), extrato de levedura (3 g/L), ágar (15 g/L), e NaCl (116,8 g/L).

Ágar TSA. Meio utilizado para cultivo e crescimento das bactérias e isolamento de colônias. Composição: caseína pancreática (15 g/L), farinha de soja (5 g/L), NaCl (5 g/L), ágar (15 g/L), pH: $7,3 \pm 0,2$.

Meio de produção de EPS Modificado. Meio líquido ou sólido usado para produção de exopolissacarídeos (EPS). Composição: sacarose (100 g/L), extrato de levedura (20 g/L), K_2HPO_4 (15 g/L), $MgSO_4$ (0,2 g/L), $MnSO_4$ (0,015 g/L), $FeSO_4$ (0,015 g/L), $CaCl_2$ (0,03 g/L), NaCl (0,015 g/L), e ágar (15 g/L) quando necessário, pH: 7,5 (KAVAMURA et al., 2013b).

Meio Mineral. Meio líquido ou sólido usado para avaliar a produção de PHA. Composição: Na_2HPO_4 (3,5 g/L), KH_2PO_4 (1,5 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (1,0 g/L), citrato de amônio férrico ($C_6H_5+4yFe_xN_yO_7$) 6% (1 ml/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20% (1 ml/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1% (1 ml/L), 1 ml/L de solução de elementos traços. Após autoclavar, adicionou-se ao meio sintético diferentes fontes de carbono; glicose, xilose ou glicerol (10 g/L) segundo o ensaio, para oferecer condições adequadas de acúmulo de PHA. Ágar (20 g/L) quando for meio sólido (RAMSAY et al., 1990).

Meio de produção de Ácido Hialurônico. Meio líquido para avaliar a produção de ácido Hialurônico. Composição: Extrato de levedura (20 g/L), K_2HPO_4 (15 g/L), $MgSO_4$ (0,2 g/L), $MnSO_4$ (0,015 g/L), $FeSO_4$ (0,015 g/L), $CaCl_2$ (0,03 g/L), NaCl (0,015 g/L), e sacarose (100 g/L) (YU et al., 2008).

Meio TSB Modificado. Meio líquido para obter massa celular dos isolados. Composição: caseína pancreática (17 g/L), farinha de soja (3 g/L), K_2HPO_4 (2,5 g/L), dextrose (2,5 g/L), NaCl (5 g/L, 35 g/L, 60 g/L, 120 g/L), pH: $7,3 \pm 0,2$.

Tampão TAE. Tris (0,04 M), ácido acético glacial (0,12 %), Na_2 -EDTA (1 mM), pH: 8,0.

Tampão salino. NaCl (0,8%), KCl (0,02%), Na_2HPO_4 (0,14%), KH_2PO_4 (0,024%).

Solução de elementos traços. H_3BO_3 (0,3 g/L), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,2 g/L), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g/L), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (30,0 mg/L), $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (30,0 mg/L), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (20,0 mg/L), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (10,0 mg/L).

Solução de Ácido Hialurônico. Solução usada para a curva padrão de ácido hialurônico. Dissolver 1 grama em 1 litro de água destilada.

Solução de Alcian Blue 8GX. Solução usada para quantificação do ácido hialurônico. Dissolveu-se 1 grama de Alcian Blue 8GX em 100 mL de ácido acético glacial 3 %. O pH foi ajustado com ácido acético para 2,5. Foram filtrados com membrana de 0,45 μ m e armazenados à temperatura ambiente (Estável até seis meses).

4.2 Material biológico

Os isolados bacterianos foram recuperados da Coleção de Microrganismos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2014), Laboratório de Microbiologia Ambiental, localizado em Jaguariúna. Esses microrganismos foram previamente isolados de solo rizosférico de um local salino do bioma caatinga, distrito de Mossoró, Rio Grande do Norte, próximo da salina de Areia Branca. Coordenadas geográficas: S 4°57'22" W 37°08'13" (Figura 7).

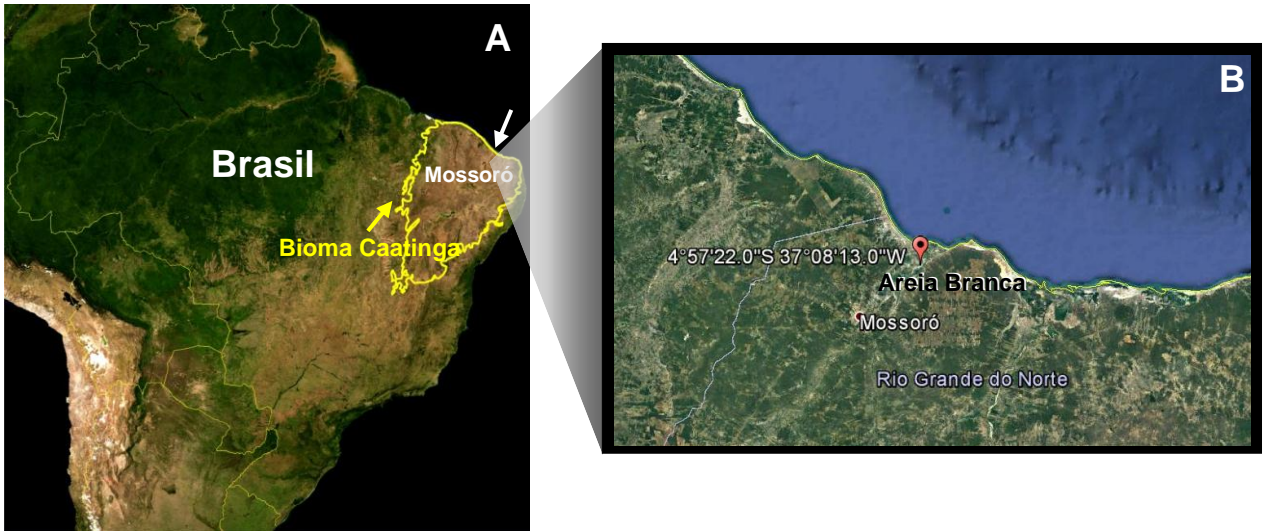


Figura 7 - Local coleta. **A**, mapa indicando a localização do bioma caatinga como definido pelo IBAMA Fonte: Modificado (Google, 2014) e **B**, posição do ponto de coleta, próximo da salina de Areia Branca, no distrito de Mossoró, Rio Grande do Norte Fonte: Modificado (Google Earth, 2016)

A coleta ocorreu em região de salina, onde foram coletadas partes de rizosfera de duas espécies de plantas: *Blutaparon portulacoides* e *Spergularia* sp. (Figura 8), que se encontravam nas margens das salinas. As amostras da coleta foram armazenadas em sacos estéreis e levadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa.

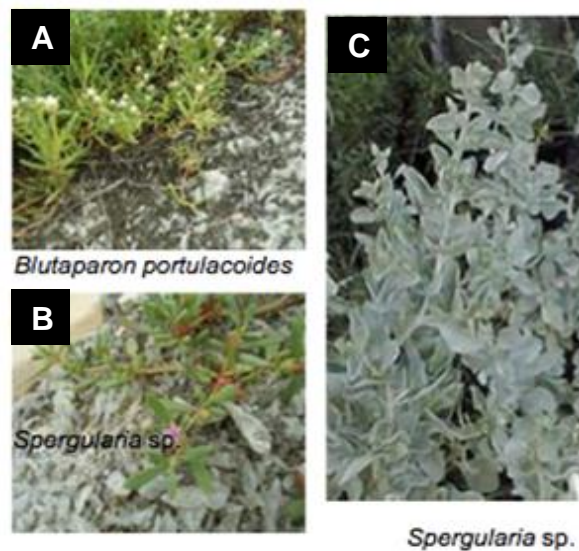


Figura 8 - Plantas coletadas. **A**, planta da espécie *Blutaparon portulacoides*, conhecida popularmente como Suculenta, e **B - C**, planta da espécie *Spergularia* sp., conhecida como Pirristio. Fonte: (Embrapa, 2014)

As raízes e solos foram colocados em frascos de vidro embebidos com 90 ml tampão salino por três horas, para dissolução dos solos. Seguidamente, 1 ml de cada solução foi diluído em série até 10^{-6} , e as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas no meio de cultura Ágar Nutriente, adicionado de NaCl a 2.0 M, para o isolamento de linhagens halofílicas e/ou halotolerantes. Finalmente, as placas foram incubadas a 28-30 °C por sete dias.

As bactérias isoladas foram crescidas e mantidas em placas contendo meio Ágar Triptona Soja (TSA) a 28 °C por 24 – 48 horas. Ao término deste, a biomassa foi recolhida com ajuda de uma alça estéril e transferida para meio líquido TSB com glicerol a uma concentração de 20%. Foram feitos estoques em micro tubos de 1,5 contendo 1 mL da suspensão e armazenados a -80 °C e -20 °C.

4.3 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos

A extração de DNA genômico dos isolados foi realizada a partir de culturas líquidas em meio TSB, centrifugadas após 12 horas de crescimento sob agitação a 28 °C. O DNA foi extraído utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Fitchburg, USA) seguindo as recomendações do fabricante para bactérias Gram positivas ou Gram negativas segundo o caso.

A concentração do DNA foi avaliada por espectrofotometria (260nm/280nm) (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989) no espectrofotômetro Nanodrop ND 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

A qualidade da extração foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 1 % contendo SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific) em tampão TAE.

4.4 Identificação dos isolados

Para a amplificação dos genes RNAr 16S foi utilizado o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na tabela 5 encontram-se as condições para as reações

de PCR que foram padronizadas em um volume final de 50 μ L e o programa de amplificação que foi realizado no termociclador Veriti® (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 5 - Condições da reação de PCR para a amplificação do gene RNAr 16S

Condições da reação de PCR para a amplificação do gene RNAr 16S.		
Reativos	Concentração	Volume
DNA bacteriano	25 ng/ μ L	1 μ L
Iniciadores (cada um)	10 mM	2,0 μ L
Master Mix® (Promega)	5x	25 μ L
Água deionizada	-	20 μ L
Volume final		50 μ L
Programa Termociclador		
Desnaturação inicial	95 °C por 2 min	
Desnaturação	95 °C por 1 min	
Anelamento	60 °C por 30 segs.	
Extensão	72 °C por 1 min	
Extensão final	72 °C por 10 min	
Ciclos		40

Os iniciadores *forward* e *reverse* utilizados nas reações de PCR encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes RNAr 16S

Iniciador	Sequência (5'-3')	Referência
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(WEISBURG et al., 1991)
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT	
536f	CAGCMGCCGCGGTAATWC	(HOLBEN et al., 2004)
782r	ACCAGGGTATCTAATCCTGT	(CHIMETTO et al., 2008)

O tamanho dos amplicons foi determinado em gel de agarose 1 % contendo SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific) em tampão TAE e comparado com um marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher Scientific). Os produtos amplificados foram purificados com o KIT comercial GFX MicroSpin Column (General Electric, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado com a metodologia de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Thermo Fisher Scientific) no Instituto de Genoma Humano da Universidade de São Paulo e outra

parte enviada a Genomic Engenharia Molecular®, onde usaram o sequenciador modelo 3130xl ou 3500 (Thermo Fisher Scientific).

4.4.1 Análise filogenética dos isolados

As sequências do gene 16S rDNA dos isolados foram editadas no programa ChromasPro (CHROMASPRO, 1998) e comparadas com a base de dados do *GeneBank* mediante o *software* Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (GENBANK, 2015). Em seguida, foram analisadas no Ribosomal Database Project II (RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II, 2015) selecionando aquelas sequências que apresentaram maiores identidades.

O alinhamento das sequências e a análise de filogenia foram realizados com o programa MEGA 6.0 utilizando o algoritmo do software MUSCLE (TAMURA et al., 2013). A árvore filogenética foi construída usando o método de *Neighbor-joining* com um *bootstrap* de 1000 réplicas e as distâncias evolutivas foram estimadas pelo modelo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980).

4.5 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

Para avaliar o limite de tolerância no ambiente halofílico, todos os isolados foram semeados em meio líquido TSB suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl: 5 g/L, 35 g/L, 60 g/L e 120 g/L, em placas de 96 poços. As culturas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi acompanhado por meio da densidade ótica (DO) a 600 nm, no leitor de placas *Synergy H1 microplate reader* (Biotek Instruments, Inc., Winooski, USA). Foram realizadas leituras pontuais e os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Produção de biopolímeros

Os procedimentos de seleção, produção e determinação de PHA a partir dos isolados halotolerantes da caatinga estão sintetizados na figura 9.

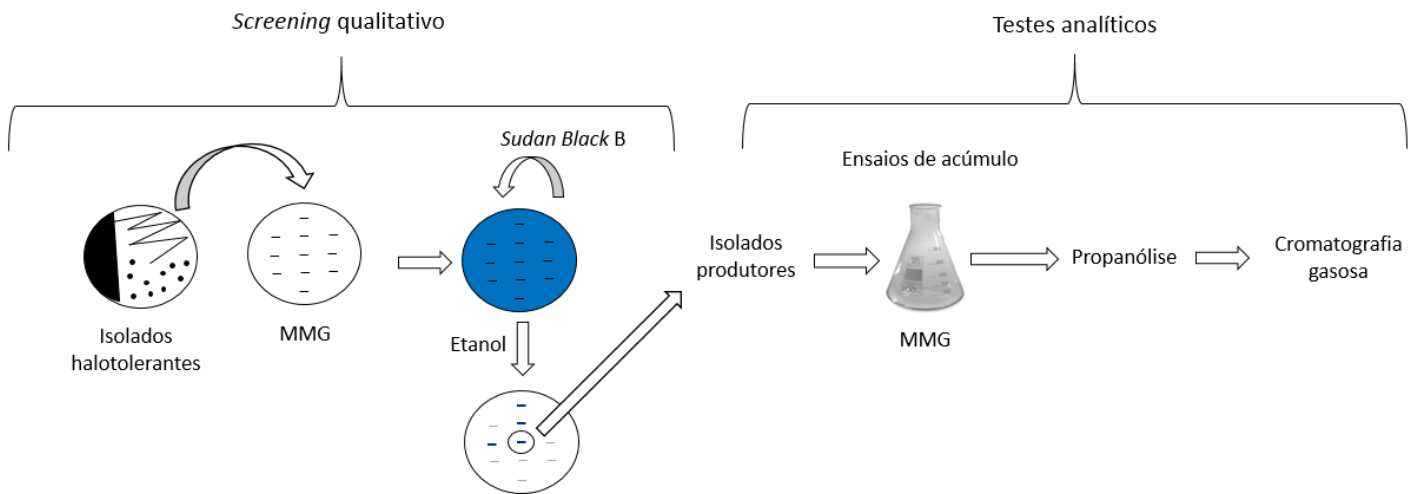


Figura 9 - Esquema dos procedimentos realizados para seleção, produção e determinação de PHA a partir dos isolados halotolerantes (RISS et al, 1988; SCHLEGEL; LAFFERTY; KRAUSS, 1970)

Para avaliar a produção de PHA, cada isolado foi semeado em meio mineral sólido contendo excesso de fonte de carbono, glicose (10 g/L), por 72 horas. Foram usados como controle positivo e negativo as linhagens *Pseudomonas* sp. LFM 046 e *Pseudomonas* sp. LFM 461 (mutante obtido por UV), respectivamente. Após este período, os microrganismos foram corados com *Sudan Black B* (0,02 % m/v em etanol 96 %) por 20 minutos e descorados com etanol 96 % por um minuto. Os isolados foram considerados produtores de PHA quando as colônias bacterianas adquiriram coloração azul, enquanto os isolados que não contêm este biopolímero ficaram levemente azulados ou não se coraram (SCHLEGEL; LAFFERTY; KRAUSS, 1970).

A partir dos isolados selecionados como produtores, foram realizados ensaios de acúmulo de PHA em pequeno volume (50 mL) em meio mineral líquido contendo glicose (10 g/L), a 30 °C por 72 horas. Ao término deste, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, para recuperar as células do meio de cultura. Em seguida, estas células foram liofilizadas para realização do protocolo de propanólise.

4.6.1 Determinação quantitativa de PHA

Para a caracterização dos PHA, foram submetidas à propanólise aproximadamente 10 mg das células liofilizadas, segundo a metodologia descrita por Riis et al. (1988). Nos tubos foram adicionados 100 µL de uma solução de ácido benzóico (3,9864 g/100 µL), 2 mL de solução HCl-propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano. Após agitação, incubou-se a mistura em banho a 100 °C por três horas, agitando-se mais duas vezes após os primeiros 15 e 30 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados e adicionou-se 4 mL de água destilada, foram submetidos à agitação e ficaram em repouso até haver uma separação das fases aquosa e orgânica, que contém os propil-ésteres. A fase aquosa foi retirada com ajuda de uma pipeta e vácuo e, na mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase contendo os propil-ésteres. O restante foi transferido para frascos apropriados e analisado no cromatógrafo. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (split 1:20) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5 % fenil-metil-siloxane, comprimento 30m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste: Hélio (0,8 mL/ min); temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 300 °C; sistema de detecção: ionização de chama (FID).

Programa de temperaturas do forno: 100 °C por um minuto, elevação da temperatura até 185 °C a 8 °C/min e 185 °C por 15 minutos.

Ácido benzoico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida*, a partir de diferentes fontes de carbono, ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich Chem. CO) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxihexanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDD (3-Hidroxidodecanoato).

4.6.2 Ensaio de acúmulo em glicose e xilose

Com o intuito de comparar o acúmulo dos isolados produtores em duas diferentes fontes de carbono, realizaram-se ensaios de acúmulo de PHA em pequeno volume (10 ml), em meio mineral líquido contendo glicose (10 g/L) e xilose (10 g/L) a 30 °C durante 72 horas. Após este período, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, para recuperar as células do meio de cultura. Em seguida, estas células foram liofilizadas para realização do protocolo de propanólise e análise em cromatógrafo gasoso descritos anteriormente (4.6.1).

4.6.3 Acúmulo de PHA em três fontes de carbono e em diferentes concentrações de NaCl

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de acúmulo em glicose e xilose (4.6.2), foram selecionados os isolados que apresentaram maiores porcentagens de acúmulo, para realizar ensaios de acúmulo de PHA em pequeno volume (10 ml), em meio mineral líquido contendo três diferentes fontes de carbono: glicose, xilose e glicerol (10 g/L) e testando quatro diferentes concentrações de NaCl: 0 g/L, 35 g/L, 60 g/L e 120 g/L. As culturas foram incubadas a 30 °C por 72 horas. Após este período, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, para recuperar as células do meio de cultura. Em seguida, estas células foram liofilizadas para realização do protocolo de propanólise e análise em cromatógrafo gasoso descritos anteriormente (4.6.1).

4.6.4 Seleção de isolados produtores de EPS

Os procedimentos de seleção de isolados produtores de EPS a partir de bactérias halotolerantes da caatinga estão sintetizados na figura 10.

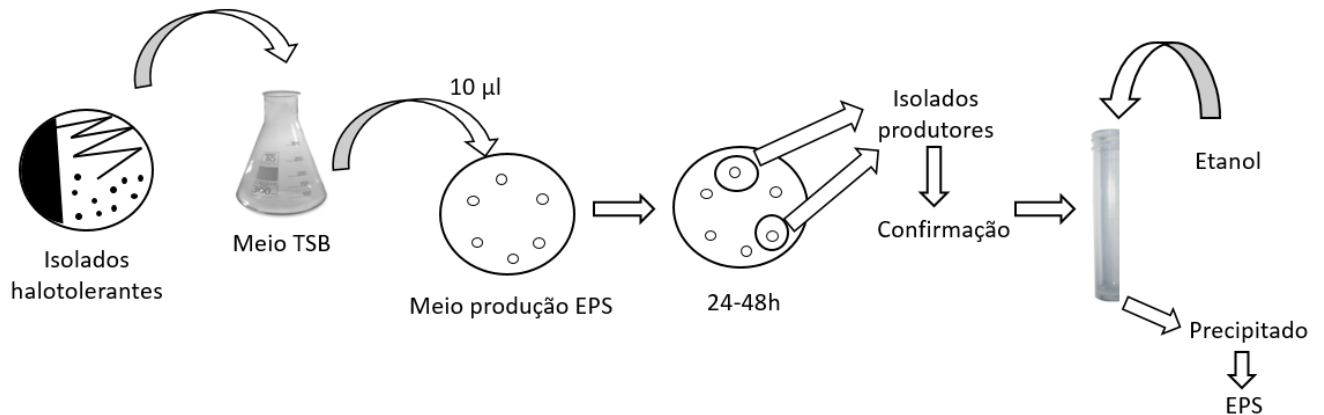


Figura 10 - Esquema dos procedimentos realizados para seleção de isolados produtores de EPS segundo o método de (PAULO et al., 2012) a partir de bactérias halotolerantes da caatinga

A determinação qualitativa da produção de exopolissacarídeos foi realizada segundo a metodologia descrita por (PAULO et al., 2012). Cada isolado bacteriano foi inoculado em discos de papel de 6 mm de diâmetro dispostos no meio sólido de produção de EPS (KAVAMURA et al., 2013b). A produção foi caracterizada pelo tamanho do halo produzido, pela aparente viscosidade e confirmada através da mistura de uma porção da substância mucóide em 2 mL de etanol absoluto. A formação de um precipitado indicou a presença de EPS (PAULO et al., 2012).

4.6.5 Produção e extração de EPS

Os procedimentos de produção e extração realizados para obtenção de exopolissacarídeos (EPS) estão sintetizados na figura 11.

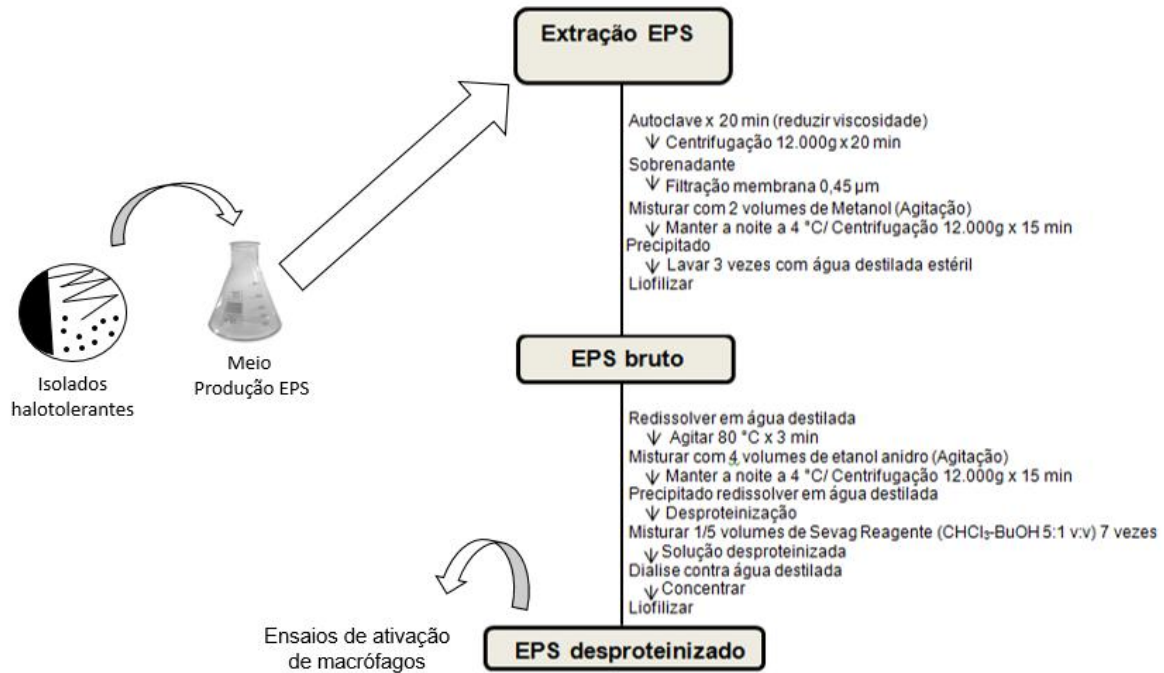


Figura 11 - Fluxograma esquemático dos procedimentos realizados para produção e extração de EPS segundo o método de LIANG et al. (2015) a partir dos isolados halotolerantes previamente selecionados

A partir dos isolados selecionados, realizaram-se culturas para produção de EPS em pequeno volume (10 mL) em meio líquido de produção de EPS (KAVAMURA et al., 2013b), por quatro dias, com agitação a 180 rpm e a 30 °C.

Após este período, a extração dos EPS foi realizada segundo a metodologia descrita por (LIANG et al., 2015). Cada cultura foi autoclavada a 121 °C durante 20 minutos para reduzir a viscosidade, e centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C para remoção da biomassa. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados com ajuda de uma membrana de 1,2 µm e vácuo. Os filtrados foram misturados com dois volumes de metanol (MeOH) e agitados vigorosamente para serem mantidos durante a noite a 4 °C. Após extração, os extratos em MeOH foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos para recuperação dos precipitados. Posteriormente, os precipitados foram lavados três vezes com água destilada estéril e liofilizados para obtenção do extrato denominado EPS bruto.

Após obtenção do EPS bruto, o material foi dissolvido em água destilada e agitado por três minutos a 80 °C. Em seguida, o EPS bruto foi misturado em quatro volumes de etanol (EtOH) e agitado vigorosamente para ser mantido durante a noite a 4 °C. Após extração, os extratos em EtOH foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos para recuperação dos precipitados. Posteriormente, os precipitados foram dissolvidos em água destilada e desproteinizados em 1/5 volumes de Sevag Reagent (CHCl₃-BuOH, v/v = 5/1) sete vezes. Cada solução desproteinizada foi dialisada contra água destilada, concentrada em evaporador rotativo *Concentrator plus* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a pressão reduzida (45 °C) para aproximadamente 5 ml de uma suspensão aquosa e liofilizadas para obtenção do denominado EPS desproteinado.

Finalmente, os EPS desproteinizados foram armazenados a 4 °C para serem avaliados em ensaios de atividade imunoestimulatória.

4.6.6 Estudo da atividade imunoestimulatória dos EPS

As análises da atividade imunoestimulatória foram realizadas pelo Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha, situado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, utilizando a seguinte metodologia:

4.6.6.1 Avaliação da ativação de macrófagos e Teste do Griess

Para avaliar a ativação de macrófagos tratados com EPS de bactérias da caatinga, foram usados macrófagos murinos (RAW 264.7) e o teste da reação de Griess.

O reagente de Griess foi preparado imediatamente antes do uso pela mistura 1:1 das soluções preparadas em ácido acético 60% (v/v) contendo N-(1-Naftil)-etilenodiamina 0,1% (p/v) e sulfonamida 1% (p/v) em ácido acético 30%, protocolo adaptado do estudo de Green et al. (1981). Em uma placa de 96 poços foram colocados 50 µL do sobrenadante dos macrófagos incubados com EPS bacterianos (1, 10 e 100 µg/ml), LPS (C+) ou sem tratamento (meio de cultura, C-) e em seguida adicionou-se em cada poço mais 50 µL de reagente de Griess. Após 48 horas de incubação a temperatura ambiente

no escuro, a absorvância foi medida em 560 nm e comparada com uma curva padrão de NaNO₂.

4.6.6.2 *Teste de viabilidade celular*

Para avaliar a viabilidade celular de três linhagens celulares, HCT-116 (câncer de cólon), B16-F10 (melanoma murino) e RAW 264.7 (macrófagos murinos) tratadas com EPS bacterianos, foi utilizado o teste do MTT. As células foram tratadas após 24 horas de plaqueamento e a viabilidade mensurada após 48 horas de tratamento.

4.6.7 *Curva padrão de ácido hialurônico*

A curva padrão foi realizada segundo a metodologia descrita por Yu et al. (2008), com as seguintes modificações: a partir da solução padrão de ácido hialurônico (1 g/L), realizaram-se diluições para obter concentrações de 50, 100, 200, 300 e 500 mg/L de AH. Seguidamente, em micro tubos de 1,5 mL, contendo 550 µL de solução de ácido acético 3 %, foram adicionados 400 µL de solução de AH nas concentrações preparadas anteriormente. Foram adicionados 50 µL da solução *Alcian Blue* 8GX, os tubos foram agitados em vortex e aquecidos por 30 segundos em micro-ondas. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por 2,5 horas e então centrifugadas a 10.000 rpm por dois minutos. Finalmente, mediou-se a absorvância das amostras à 540 nm no espectrofotômetro *modelo Scanning Double Beam 1.8nm 115VAC* (Cole-Parmer, Illinois, USA). O experimento foi realizado em triplicata.

4.6.7.1 *Ensaio de produção e quantificação de AH*

Para avaliar a produção de AH, realizaram-se culturas dos 26 isolados em pequeno volume (10 mL) em meio líquido de produção descrito por YU et al (2008), por sete dias, a 180 rpm e a 30 °C. Do mesmo modo, realizou-se a cultura da linhagem produtora de ácido hialurônico *Streptococcus equi* Farrow and Callins subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920.

Após este período, realizou-se a quantificação de ácido hialurônico segundo a metodologia descrita por Yu et al. (2008) com as seguintes modificações: em micro tubos de 1,5 mL, contendo 550 µL de solução de ácido acético 3 %, foram adicionados 400 µL de cada cultura bacteriana. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução Alcian Blue 8GX, os tubos foram agitados em vortex e aquecidos por 30 segundos em micro-ondas. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por 2,5 horas e então centrifugadas a 10.000 rpm por dois minutos. Posteriormente, mediu-se a absorbância dos sobrenadantes a 540 nm no leitor de placas Synergy H1 microplate reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, USA). Finalmente, a partir da equação obtida na curva padrão (numeral 4.6.3.2) (apêndice B), encontraram-se as concentrações de ácido hialurônico produzidas pelos isolados. A quantificação foi realizada em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos isolados recuperados do biobanco do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa, 26 bactérias halotolerantes foram identificadas em nível de gênero com base na análise da sequência do gene RNAr 16S (Tabela 7), revelando que os isolados pertencem aos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*.

A maior parte dos isolados foi bactérias Gram-positivas atribuídas às famílias *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae* e *Microbacteriaceae*, e uma bactéria *Incertae Sedis* do filo firmicutes, afiliadas aos gêneros *Bacillus* (18 cepas), *Staphylococcus* (duas cepas), *Curtobacterium* (quatro cepas) e *Exiguobacterium* (uma cepa). Apenas um isolado Gram-negativo foi atribuído como membro da família *Pseudomonadaceae*, incluso no gênero *Pseudomonas*.

Tabela 7 - Isolados bacterianos obtidos na região de Areia Branca, distrito de Mossoró, Rio Grande do Norte

Código	Planta	Morfologia celular	Gram	Crescimento NaCl (g/L)	Identificação gene 16S rDNA	Ident. [%]	No. Acesso
sac1	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT986159.1
sac7	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo curto	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT986159.1
sac9	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo curto	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT719998.1
sac10	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KR347216.1
sac16	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo curto	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	LN849708.1
sac18	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	LN849708.1
sac22	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo curto	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	LN849708.1
sac23	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo grande	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KU850960.1
sac24	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KM248381.1
sac33	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KU850960.1
sac34	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT153605.1
sac36	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo pequeno	Positivo	0-60	<i>Exiguobacterium</i> sp.	99	KX185943.1
sac37	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Curtobacterium</i> sp.	99	JQ660183.1
sac38	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Estafilococos	Positivo	0-120	<i>Staphylococcus</i> sp.	98	KX898578.1
sac41	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KU850960.1
sac44	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KU531598.1
sac45	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	95	LN849708.1
sac51	<i>Spergularia</i> sp.	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	LC076387.1
sac53	<i>Spergularia</i> sp.	Cocobacilos	Positivo	0-120	<i>Curtobacterium</i> sp.	98	KU985310.1
sac54	<i>Spergularia</i> sp.	Cocobacilos	Positivo	0-120	<i>Curtobacterium</i> sp.	98	KU360138.1
sac58	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Cocobacilos	Positivo	0-120	<i>Curtobacterium</i> sp.	99	JQ660183.1
sac59	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Estafilococos	Positivo	0-120	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	KX898578.1
sac64	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	CP010524.1
sac65	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Negativo	0-120	<i>Pseudomonas</i> sp.	98	KU131278.1
sac66	<i>Blutaparon portulacoides</i> .	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT153605.1
sac76	<i>Blutaparon portulacoides</i>	Bacilo	Positivo	0-120	<i>Bacillus</i> sp.	99	KU850960.1

O gênero *Bacillus* foi o mais frequente no estudo, constituindo 69 % dos isolados identificados (Figura 12), porém várias cepas são similares à mesma espécie (Figura 13). Segundo a análise filogenética os isolados sac1, sac7, sac9, sac16, sac18, sac22, sac44, sac45, sac51 e sac64 são próximos à espécie *B. paralicheniformis*, enquanto que os isolados sac23, sac33, sac34, sac41, sac66 e sac76 são próximos à espécie *B. endophyticus*. No caso dos isolados sac10 e sac24, eles são próximos às espécies *B. seohaeanensis* e *B. thuringiensis*, respectivamente. Observa-se também na árvore que alguns valores de *Bootstrap* foram baixos.

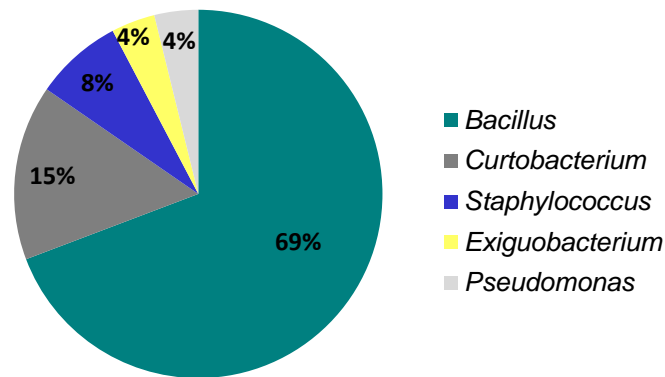


Figura 12 - O gráfico representa a abundância de gêneros bacterianos a partir de amostras de solo rizosférico da caatinga

Vale a pena mencionar que este gênero, que consiste em pelo menos 300 espécies (MANDIC-MULEC; STEFANIC; ELSAS, 2015; ZHU et al., 2016), é atualmente o maior dentro da família *Bacillaceae* que compreende pelo menos 62 gêneros bacterianos (GENBANK, 2015).

Na literatura, tem sido amplamente relatado que o gênero *Bacillus* é bastante frequente em ambientes hostis, como são os solos semiáridos da caatinga (DIAS et al., 2009; NESSNER KAVAMURA et al., 2013; POWELL et al., 2015; SOARES et al., 2012), pela capacidade que tem estes microrganismos de formar endósporos, característica que torna este tipo de bactérias resistentes a condições desfavoráveis como o calor, alta radiação, estresse hídrico, baixa disponibilidade de nutrientes, compostos químicos,

entre outros, durante períodos prolongados de tempo. (KAVAMURA et al., 2013b; MARRONI, 2014; ZHAO et al., 2014).

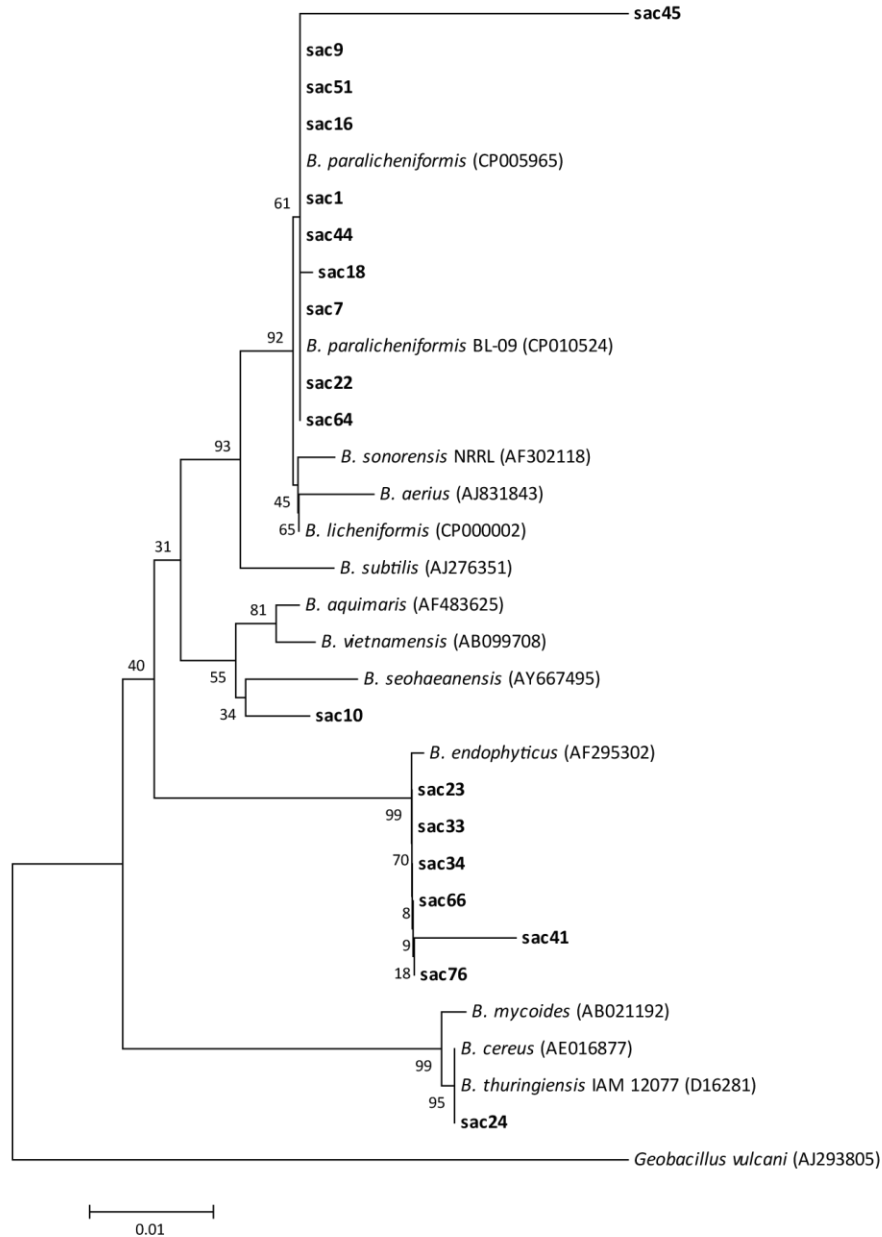


Figura 13 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, construída usando o método *Neighbour-joining*, indicando a posição dos isolados sac1, sac7, sac9, sac10, sac16, sac18, sac22, sac23, sac24, sac33, sac34, sac41, sac44, sac45, sac51, sac64, sac66 e sac76 entre os membros relatados do gênero *Bacillus*. Organismos de referência estão incluídos e os números de acesso das sequências *Genbank* são apresentados entre parênteses. *Geobacillus vulcani* foi usado como grupo externo na árvore. Valores de *Bootstrap*, expresso como percentagem de 100 repetições, são dados nos nodos. Barra de escala, uma substituição por 100 nucleotídeos

Por outro lado, os isolados sac37, sac53, sac54 e sac58 foram identificados como actinobactérias do gênero *Curtobacterium*. A análise filogenética mostrou que os quatro isolados da caatinga são próximos entre eles, porém são distantes das espécies usadas como referência apresentadas na figura 14.

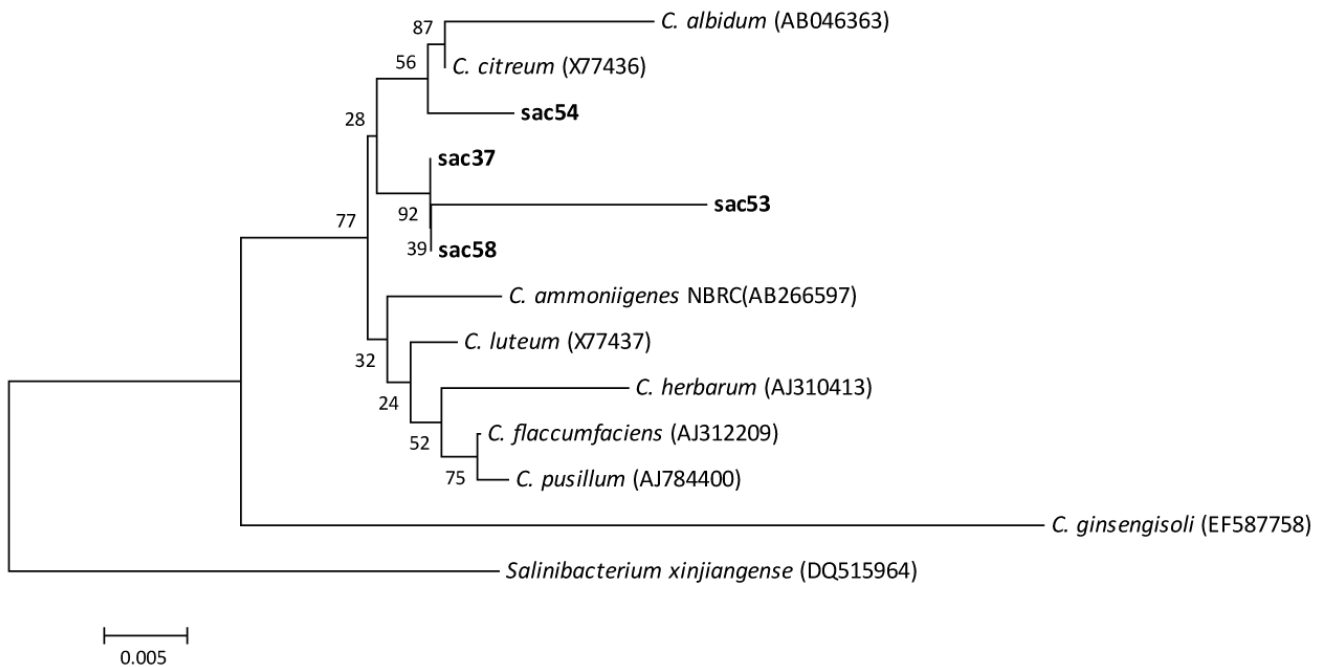


Figura 14 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, construída usando o método *Neighbour-joining*, indicando a posição dos isolados sac37, sac53, sac54 e sac58 entre os membros relacionados do gênero *Curtobacterium*. Organismos de referência estão incluídos e os números de acesso das sequências *Genbank* são apresentados entre parênteses. *Salinibacterium xinjiangense* foi usado como grupo externo na árvore. Valores de *Bootstrap*, expresso como porcentagem de 1000 repetições, são dados nos nodos. Barra de escala, uma substituição por 50 nucleotídeos

O gênero *Curtobacterium* foi definido por Yamada & Komagata (1972) para classificar seis espécies; *C. albidum*, *C. citreum*, *C. luteum*, *C. pusillum*, *C. saperdae* e *C. testaceum*, e posteriormente outras quatro espécies foram adicionadas ao gênero: *C. flaccumfaciens*, *C. plantarum*, *C. herbarum* e *C. ammoniigenes* (KIM et al., 2008a). Algumas dessas actinobactérias têm sido isoladas de ecossistemas de deserto (BHATNAGAR; BHATNAGAR, 2005), de rochas de regiões áridas extremas (KUHLMAN et al., 2005) e de planícies de sal (CARDINALE et al., 2015), o que coincide com as condições adversas dos locais escolhidos na caatinga para a coleta das amostras. Além

disso, na literatura encontra-se este gênero associado a diversos cultivos agrônômicos, sendo descritas como bactérias endófitas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), batata, morango (*Fragaria* spp.) e *Eucalyptus* spp. (DE LOS SANTOS et al., 2015), entretanto, são microrganismos pouco estudados.

Do mesmo modo, outra bactéria identificada em nível de gênero sendo representada por apenas um isolado pertence ao filo *Firmicutes*, gênero *Exiguobacterium*. Na árvore filogenética observa-se que o isolado sac36 é próximo da espécie *E. aestuarii*, dado que foram agrupadas no mesmo cluster (Figura 15).

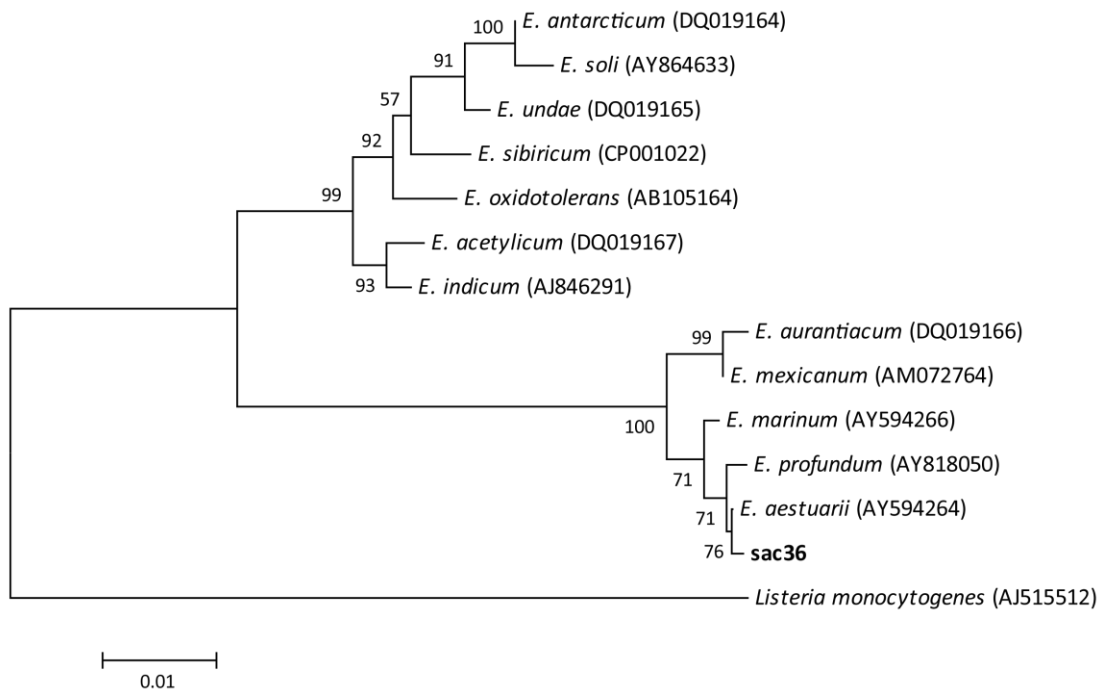


Figura 15 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, construída usando o método *Neighbour-joining*, indicando a posição do isolado sac36 entre os membros relatados do gênero *Exiguobacterium*. Organismos de referência estão incluídos e os números de acesso das sequências *Genbank* são apresentados entre parênteses. *Listeria monocytogenes* foi usado como grupo externo na árvore. Valores de *Bootstrap*, expresso como porcentagem de 1000 repetições, são dados nos nodos. Barra de escala, uma substituição por 100 nucleotídeos

As bactérias do gênero *Exiguobacterium* têm baixo conteúdo de G+C %, são gram-positivas, anaeróbias facultativas e caracterizam-se pela alta diversidade morfológica e geográfica (CHAUHAN et al., 2015). Em consequência, esses microrganismos têm sido isolados a partir de diversas fontes na natureza, mas nota-se

que os relatos são principalmente de ambientes extremos que incluem o pergelissolo (em inglês, *permafrost*) siberiano, gelo da Groenlândia, ambientes frios dos Himalaias ocidentais, nascentes de água quente do *Yellowstone National Park*, fontes hidrotermais profundas, lagos andinos com condições físicas semelhantes às marcianas, ambientes hipersalinos em Kuwait (AL-MAILEM et al., 2014; CABRIA et al., 2014; CHAUHAN et al., 2015; ORDOÑEZ et al., 2009; VISHNIVETSKAYA; KATHARIOU; TIEDJE, 2009) e no caso do presente estudo, de locais semiáridos da caatinga.

Adicionalmente, foram identificadas duas bactérias do gênero *Staphylococcus*, isolados sac38 e sac59, e a partir da análise filogenética, observou-se que os isolados são próximos à espécie *S. warneri* (Figura 16).

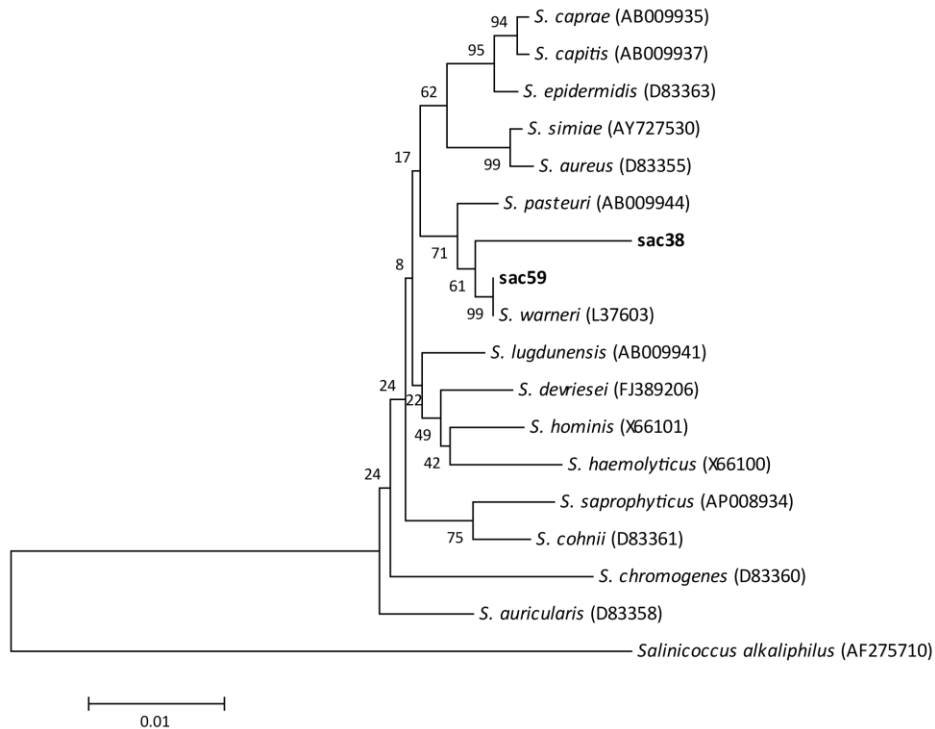


Figura 16 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, construída usando o método *Neighbour-joining*, indicando a posição dos isolados sac38 e sac59 entre os membros relatados do gênero *Staphylococcus*. Organismos de referência estão incluídos e os números de acesso das sequências *Genbank* são apresentados entre parênteses. *Salinicoccus alkaliphilus* foi usado como grupo externo na árvore. Valores de *Bootstrap*, expresso como porcentagem de 1000 repetições, são dados nos nós. Barra de escala, uma substituição por 100 nucleotídeos

O gênero *Staphylococcus* também pertence ao filo *Firmicutes* e compreende 58 espécies descritas, incluindo 28 subespécies de acordo com a *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*. São bactérias gram-positivas, catalase positivo e apenas algumas espécies de importância clínica são coagulase positiva, como é o caso das espécies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, e algumas cepas de *S. hyicus*.

Além disso, os estafilococos são amplamente difundidos em vários nichos, tais como ambientes hospitalares, plantas alimentícias (DRANCOURT; RAOULT, 2002; GIAMMARINARO et al., 2005), e também têm sido isolados de ambientes hipersalinos como lagos de sal na Tunísia e Roménia (DAOUD et al., 2013; MÁTHÉ et al., 2014), de minas de sal como mostraram estudos feitos na região de Karak no Paquistão (ROOHI et al., 2014), e do mesmo modo, no nosso trabalho, de locais salinos da caatinga.

Por outro lado, embora o gênero seja conhecido pela associação a doenças em seres humanos ou animais, diferentes cepas isoladas de ambientes naturais podem ser usadas para estudos biotecnológicos e produção de substâncias de interesse industrial, por exemplo, como foi descrito no estudo realizado por Eddouaouda et al. (2012), a cepa *Staphylococcus* sp. 1E é capaz de excretar um biossurfactante com propriedades tensoativas interessantes. Finalmente, o último isolado identificado pertence ao gênero *Pseudomonas*. A análise filogenética mostrou que o isolado sac65 é próximo à espécie *P. alcaliphila* como observa-se na figura 17.

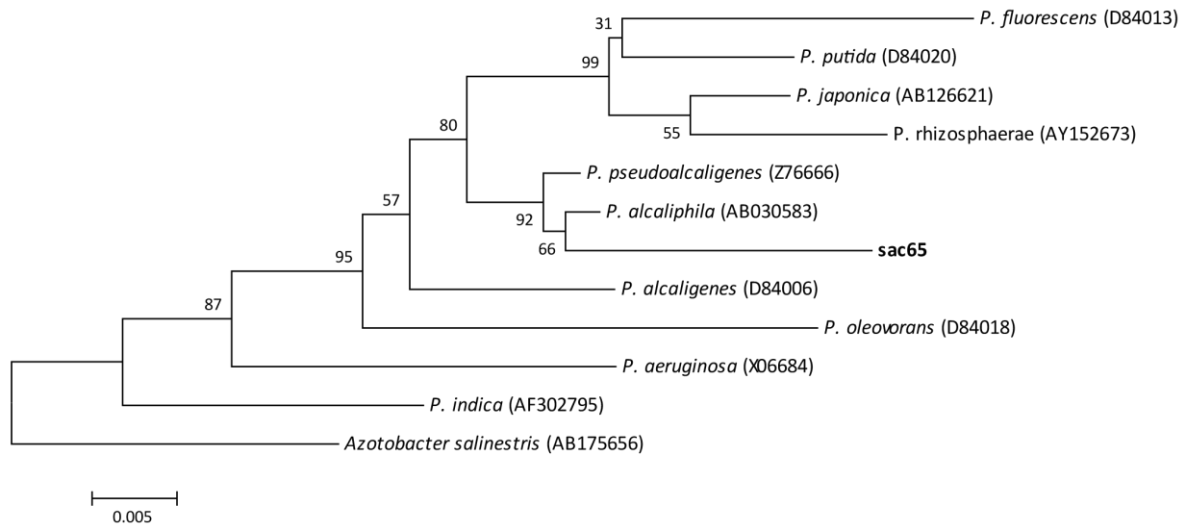


Figura 17 - Árvore filogenética baseada na sequência parcial do gene 16S rDNA, construída usando o método *Neighbour-joining*, indicando a posição do isolado *sac65* entre os membros relacionados do gênero *Pseudomonas*. Organismos de referência estão incluídos e os números de acesso das sequências *Genbank* são apresentados entre parênteses. *Azotobacter salinestris* foi usado como grupo externo na árvore. Valores de *Bootstrap*, expresso como porcentagem de 1000 repetições, são dados nos nós. Barra de escala, uma substituição por 50 nucleotídeos

Pseudomonas pertence ao filo *Proteobacteria* e é um gênero de bactérias gram-negativas, não fermentativas que foi descrito em 1894. Constate-se que é um dos microrganismos mais diversos e ubíquos em todo o mundo, cujas espécies foram isoladas de diferentes tipos de ambientes; na Antártida, nos trópicos, presente em sedimentos, amostras clínicas, plantas e rizosfera, água, solo, mar e desertos (ISNANSETYO; KAMEI, 2009; PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2009). Em particular, para o interesse deste estudo, encontra-se descrito em vários estudos realizados em ambientes semiáridos ou desérticos, que bactérias do gênero *Pseudomonas* são uma das mais frequentes ou dominantes nessas condições extremas (EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2012; GOUDARZI et al., 2014; KAPLAN et al., 2013; LIU et al., 2008; PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2009).

Como foi apresentado anteriormente, todos os isolados foram identificados em nível de gênero baseado apenas na sequência parcial do gene 16S rDNA. Uma análise mais detalhada, como por exemplo, a *Multi-Locus Sequence Analysis* (MLSA), é necessária para a atribuição da espécie de cada bactéria isolada no estudo.

5.1 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

Os 26 isolados foram cultivados em meio TSB suplementado com quatro concentrações diferentes de NaCl para avaliar a tolerância ao sal das bactérias. Assim, observou-se que todos os isolados são halotolerantes, já que apresentaram a capacidade de crescer em faixas de salinidade que vão desde 5 a 120 g/L de NaCl (APÊNDICE A), contudo os isolados não precisam do sal para se desenvolver. Certamente, os microrganismos halotolerantes podem crescer em ausência como em presença do sal, enquanto os microrganismos halófilos requerem sal para serem viáveis (OREN, 2008). Especificamente, todos os isolados cresceram em 5, 35, e 60 g/L de NaCl e apenas um isolado, pertencente ao gênero *Exiguobacterium*, não cresceu em 120 g/L (Figura 18).

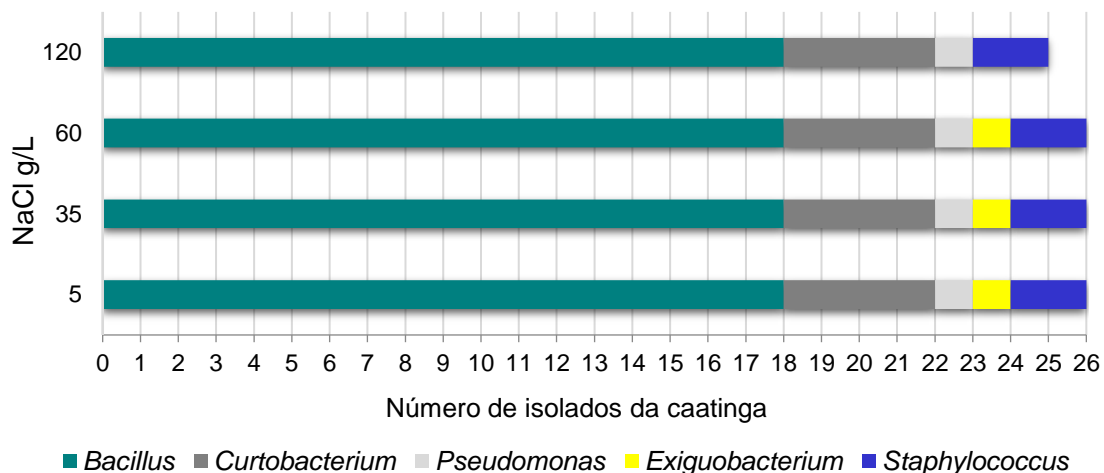


Figura 18 - Crescimento dos isolados em diferentes concentrações de NaCl

Várias espécies do gênero *Bacillus* têm sido isoladas a partir de diversos tipos de ambientes salinos (ZHU et al., 2016). Em 2008 Ventosa e colaboradores compararam 18 espécies reconhecidas do gênero *Bacillus* que cabem nas categorias de halófilos moderados ou halotolerantes. Entre essas espécies encontram-se *B. patagoniensis*, *B. oshimensis*, *B. taeanaensis*, *B. isabeliae*, *B. aurantiacus*, *B. ailingensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. licheniformis* (VENTOSA et al., 2008).

Geralmente, essas espécies são aeróbias ou anaeróbias facultativas, formadoras de endósporos e alcalófilas (ZHU et al., 2016). Do mesmo modo, vários autores

mostraram que as diferentes cepas do gênero *Bacillus* crescem em faixas de 20-200 g/L de NaCl (VENTOSA et al., 2008), faixa de salinidade semelhante à que foi avaliada no presente estudo e que também permitiu evidenciar o crescimento de todos os isolados do gênero *Bacillus* nas concentrações de 5, 35, 60 e 120 g/L de NaCl (Figura 18).

Os isolados do gênero *Curtobacterium* também cresceram nas quatro concentrações de sal. Ainda assim, não se encontram dados na literatura desse gênero classificando-o como microrganismo halotolerante ou halófilo. Entretanto Cardinale et al. (2015) descreve-ram uma cepa promotora do crescimento vegetal identificada como *Curtobacterium* que aumentou significativamente a resistência de plantas de cevada ao estresse salino. Contudo, neste trabalho descrevem-se quatro bactérias halotolerantes do gênero *Curtobacterium* que podem crescer em 120 g/L de NaCl.

Igualmente, os isolados do gênero *Pseudomonas* e *Staphylococcus* cresceram nas quatro concentrações de NaCl avaliadas, resultado esperado já que esse grupo de bactérias encontra-se amplamente relatado como microrganismos halotolerantes presentes em plantas, solos, lagos, desertos salinos, entre outros. Assim, na literatura descreve-se que essas bactérias crescem em concentrações de 20-300 g/L de NaCl (AL-MAILEM et al., 2014; DAOUD et al., 2013; ISNANSETYO; KAMEI, 2009; MÁTHÉ et al., 2014; ORDOÑEZ et al., 2009; ROOHI et al., 2014), o que evidencia a grande capacidade de tolerância ao sal por parte desses microrganismos.

Contrariamente aos outros isolados, a bactéria pertencente ao gênero *Exiguobacterium* não cresceu em 120 g/L de NaCl, porém, cresceu em 35 e 60 g/L de NaCl, concentrações também consideradas altas. *Exiguobacterium* encontra-se extensamente descrita na literatura como bactéria halotolerante presente em solos, plantas, desertos salinos, fontes hidrotermais e lagos de sal (AL-MAILEM et al., 2014; CABRIA et al., 2014; ORDOÑEZ et al., 2009; VISHNIVETSKAYA; KATHARIOU; TIEDJE, 2009; YUMOTO et al., 2004), e note-se que vários estudos relatam que algumas espécies desse gênero são bactérias promotoras do crescimento vegetal em condições de estresse salino para as plantas (BHARTI et al., 2013; CHAUHAN et al., 2015).

Além disso, cabe ressaltar que evidenciou-se um comportamento interessante nas curvas de crescimento de alguns isolados dos gêneros *Bacillus* e *Curtobacterium* nas diferentes concentrações avaliadas (Figura 19).

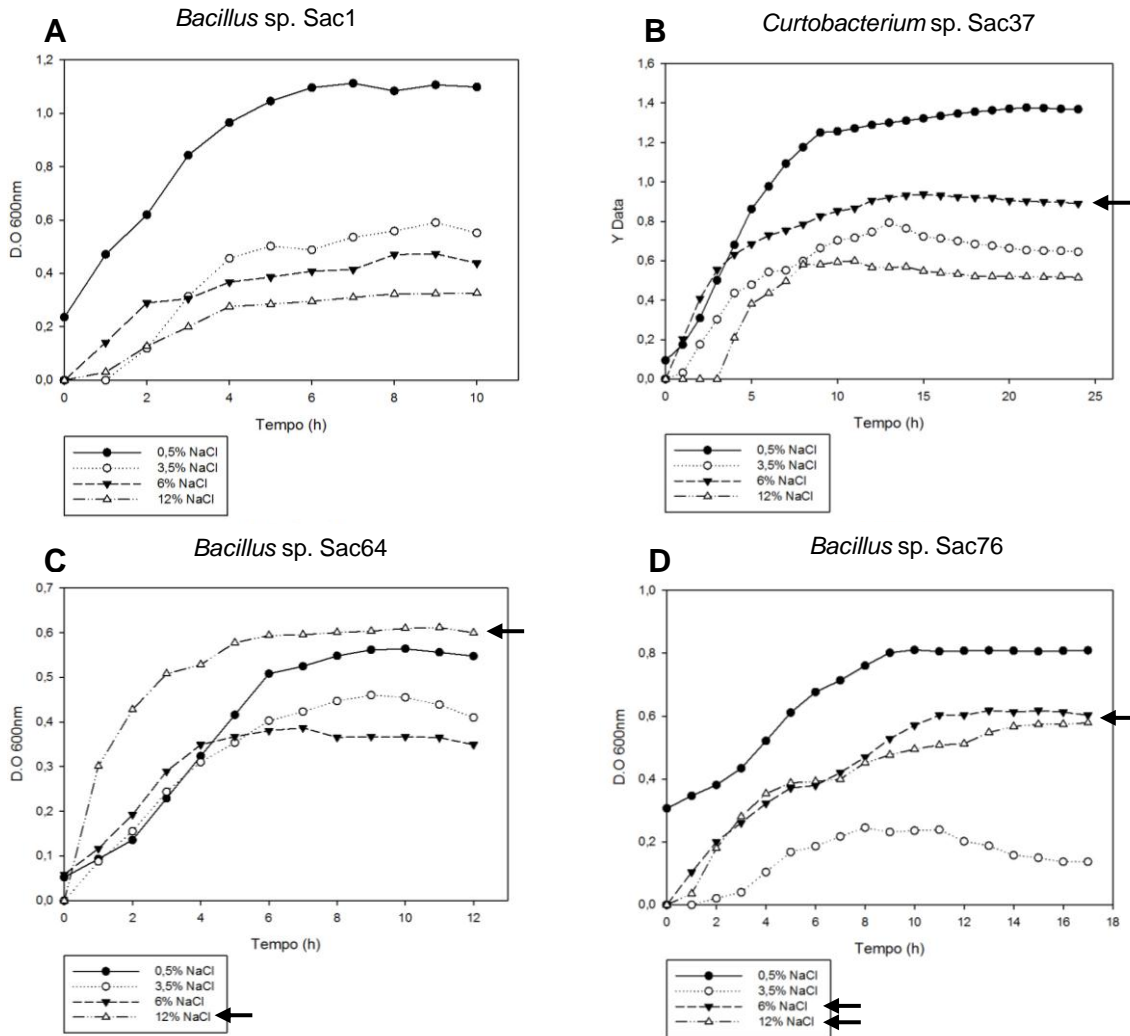


Figura 19 - Curvas de crescimento de quatro isolados halotolerantes da caatinga em meio TSB suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl (5, 35, 60 e 120 g/L). **A**, isolado sac1 (gênero *Bacillus*), **B**, isolado sac37 (gênero *Curtobacterium*), **C**, isolado sac64 (gênero *Bacillus*) e **D**, isolado sac76 (gênero *Bacillus*). As setas indicam um comportamento não esperado no crescimento das bactérias

Para começar, na figura 18A observa-se o crescimento esperado nas condições avaliadas pelo isolado *Bacillus* sp. sac1, ou seja, a maior concentração de NaCl menor D.O. obtida. No entanto, o oposto foi observado na figura 18C, onde o isolado *Bacillus*

sp. sac64 mostrou maior D.O. na concentração 120 g/L de NaCl, o que poderia indicar que o crescimento óptimo da bactéria encontra-se em concentrações altas de sal. Porém, esse resultado não concorda com a definição de microrganismo halotolerante que relatam Ventosa e Arahall (2011), onde os autores descrevem que o crescimento óptimo desses microrganismos ocorre abaixo de 10 g/L de sal (VENTOSA; ARAHAL, 2011).

Por outro lado, no caso dos isolados *Curtobacterium* sp. sac37 e *Bacillus* sp. sac76, figura 18B e D, nota-se que embora apresentaram maior crescimento na menor concentração de NaCl avaliada, nas concentrações 60 e 120 g/L de NaCl observou-se maior D.O. em comparação com o crescimento das mesmas em 35 g/L de NaCl.

Graças à grande capacidade que possuem os microrganismos halotolerantes de tolerar diferentes concentrações de sal, assim como a produção de diversos compostos de interesse industrial como são, por exemplo, os polihidroxialcanoatos (PHA) e os exopolissacarídeos (EPS), biopolímeros de importância que serão descritos posteriormente neste trabalho, convertem-se em candidatos interessantes para continuar sendo estudados e utilizados em diferentes bioprocessos pois apresentam vantagens como economia de energia (fermentação não precisa de esterilização); baseados em água do mar (preservação da água doce); processamento contínuo aberto (contra processos descontínuos); e uso de substratos de baixo custo, características desejáveis para qualquer processo biotecnológico (AL-MAILEM et al., 2014; DE CARVALHO; FERNANDES, 2010; HAMEDI; MOHAMMADIPANAH; VENTOSA, 2013; OREN, 2008, 2010; VENTOSA et al., 2008; VENTOSA; ARAHAL, 2011; YUE et al., 2014).

5.2 Ensaios de produção de PHA

Desde a primeira descoberta de produção de PHA na bactéria *Bacillus megaterium*, sabe-se que existem mais de 300 microrganismos produtores de PHA e mais de 150 monómeros diferentes relatados (HUANG et al., 2016). A continuação, apresentam-se os resultados obtidos na seleção, produção e determinação de PHA por bactérias halotolerantes da caatinga.

5.2.1 Seleção, produção e determinação de PHA

Os resultados relacionados à seleção e produção de PHA pelos diferentes isolados halotolerantes estão apresentados na tabela 8. Primeiramente, 18 isolados dos 26 cresceram no meio mineral contendo glicose. Porém, apenas cinco isolados, sendo todos pertencentes ao gênero *Bacillus*, foram positivos na triagem realizada com *Sudan Black B* (Figura 20).

Tabela 8 – Triagem e produção de PHA por isolados halotolerantes da caatinga a partir de glicose (10 g/L), após 72 horas

Isolado	Gênero	Crescimento em MMG	Screening Sudan Black B	Confirmação Cromatógrafo gasoso
sac1	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac7	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac9	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac10	<i>Bacillus</i> sp.	Não	Não	-
sac16	<i>Bacillus</i> sp.	Não	Não	-
sac18	<i>Bacillus</i> sp.	Não	Não	-
sac22	<i>Bacillus</i> sp.	Não	Não	-
sac23	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Sim	+
sac24	<i>Bacillus</i> sp.	Não	Não	-
sac33	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Sim	+
sac34	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Sim	+
sac36	<i>Exiguobacterium</i> sp.	Não	Não	-
sac37	<i>Curtobacterium</i> sp.	Não	Não	-
sac38	<i>Staphylococcus</i> sp.	Não	Não	-
sac41	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac44	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac45	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac51	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-
sac53	<i>Curtobacterium</i> sp.	Não	Não	-
sac54	<i>Curtobacterium</i> sp.	Sim	Não	-
sac58	<i>Curtobacterium</i> sp.	Não	Não	-
sac59	<i>Staphylococcus</i> sp.	Não	Não	-
sac64	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Sim	-
sac65	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sim	Não	-
sac66	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Sim	+
sac76	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Não	-

MMG: Meio mineral glicose; (+) isolado produtor de PHA; (-) isolado não produtor de PHA.

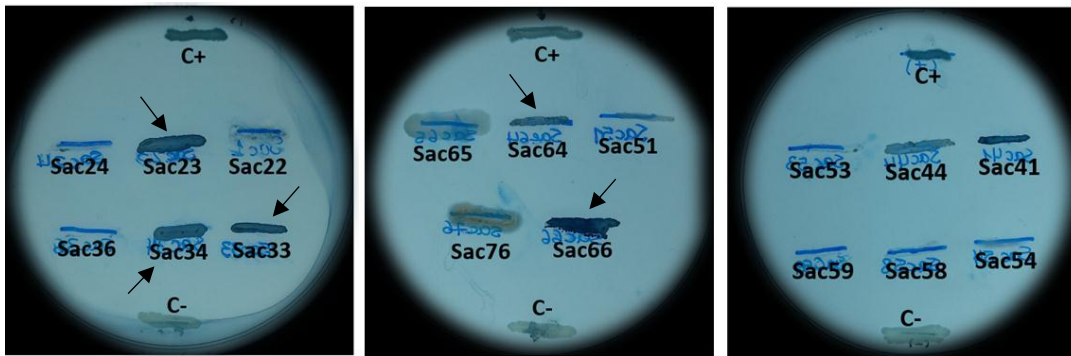


Figura 20 - Triagem qualitativa de produção de PHA com *Sudan Black B* em placa com meio mineral contendo 10 g/L de glicose. Tempo de incubação 72 horas. Controle positivo (C+) *Pseudomonas* sp. LFM 046, controle negativo (C-) *Pseudomonas* sp. LFM 461. As setas indicam os isolados selecionados como possíveis produtores de PHA

A partir dos isolados selecionados, realizaram-se ensaios de acúmulo de PHA em MMG e caracterização do polímero por cromatografia gasosa. Segundo os cromatogramas obtidos na análise (Figura 21), em quatro dos cinco isolados de *Bacillus* (Figura 22), foi detectado o monômero 3-hidroxibutirato (3HB), sendo este o único componente do polímero (polihidroxibutirato-PHB). Note-se também que na triagem realizada com *Sudan Black B* obteve-se um falso positivo (Figura 21E). O resultado anterior pode-se dever ao corante, o qual não cora apenas as colônias acumuladoras de PHA, mas também outros lipídios celulares presentes, como por exemplo os ramnolipídeos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

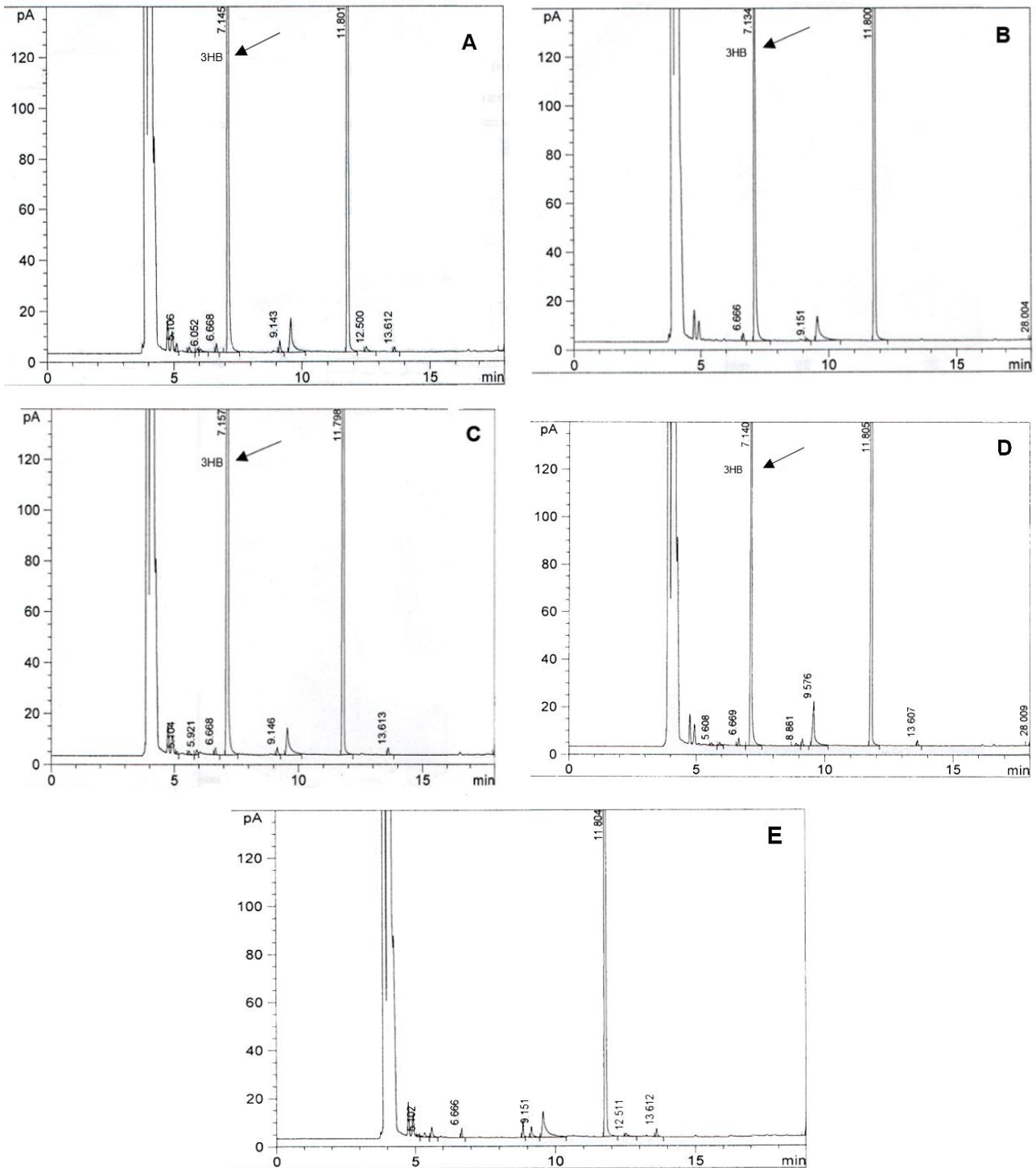


Figura 21 - Espectro de cromatografia gasosa indicando (setas) a presença dos picos (tempo de retenção em minutos) de 3HB. **A-D**, isolados produtores de 3HB: *Bacillus* sp. sac23, *Bacillus* sp. sac33, *Bacillus* sp. sac34 e *Bacillus* sp. sac66, respectivamente. **E**, isolado não produtor de PHA, *Bacillus* sp. sac64

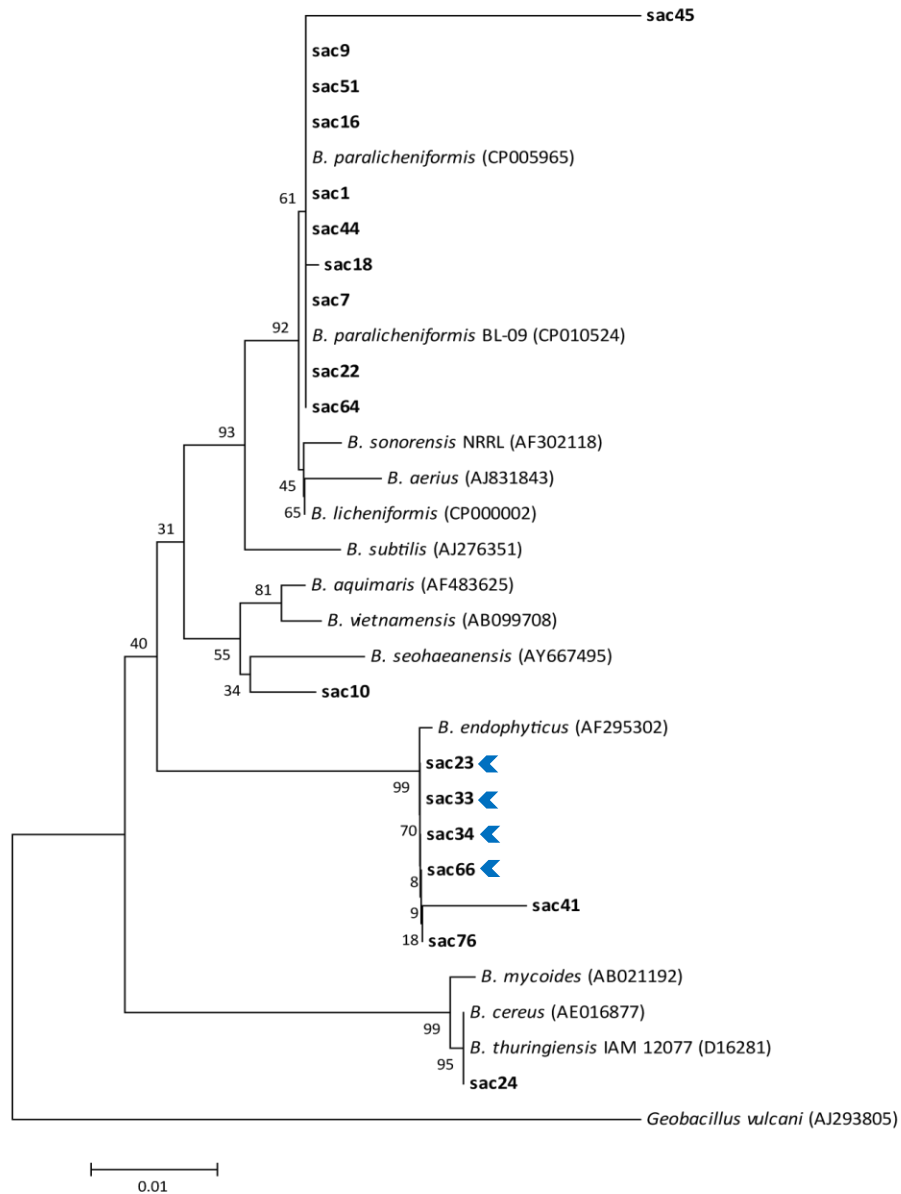


Figura 22 - Árvore filogenética dos isolados do gênero *Bacillus* produtores de PHA indicados em azul (◀)

Apesar de que um grande número de microrganismos têm sido descritos como produtores de PHA em condições fisiológicas de estresse e na presença de excesso de carbono (KUMAR et al., 2014), em particular o gênero *Bacillus* destaca-se na pesquisa e produção de PHA. De fato, repare-se que o 3HB, monômero de cadeia curta, foi identificado e isolado a partir de um *Bacillus* sp., e tem-se indicado que o principal papel do polímero nesse gênero é de servir como uma reserva intracelular de carbono, assim como de fonte de energia para o processo de esporulação (VALAPPIL et al., 2006).

Também é importante mencionar que o polihidroxibutirato (PHB) foi o primeiro tipo de PHA descoberto e o mais amplamente estudado. Este polímero tem propriedades mecânicas semelhantes aos plásticos convencionais como o polipropileno ou polietileno, contudo os custos de produção deste são mais elevados do que os plásticos petroquímicos (NARANJO et al., 2013b).

Além disso, encontra-se amplamente relatado a utilização de espécies de *Bacillus* para a produção de PHA pelas muitas vantagens que tem essas bactérias sobre outros gêneros bacterianos, como por exemplo, a ausência da camada de lipopolissacáridos (LPS) o que faz a extração do polímero mais fácil, a capacidade que tem para crescer em matérias-primas baratas, pela elevada taxa de crescimento em comparação com outras bactérias e também porque é geralmente considerado um microrganismo seguro pela Food and Drug Administration (KUMAR et al., 2014; MOHAPATRA et al., 2015; NARANJO et al., 2013a; SINGH et al., 2013b).

Adicionalmente, na literatura descreve-se que algumas cepas de *Bacillus* spp. são capazes de utilizar uma ampla gama de substratos, tais como, açúcares, ácidos graxos voláteis, álcoois, e matérias primas renováveis para produzir homopolímeros como o PHB. Do mesmo modo, é descrito que os rendimentos de produção de PHB variam entre as diferentes espécies de *Bacillus*, o que deve-se em grande parte a linhagem usada e à alimentação utilizada no processo (KUMAR et al., 2013).

Contudo, também é importante mencionar que os polímeros de origem microbiana são ainda mais caros que os polímeros petroquímicos convencionais. O alto impacto da fonte de carbono no custo final deste polímero tem sido um dos principais fatores limitantes para a produção de PHA, sendo responsável por até 50% dos custos totais de produção, diminuindo para cerca de 30% quando a produção de PHA é integrada a uma usina de cana de açúcar (SILVA et al., 2014). Portanto, é evidente que a utilização de fontes de carbono mais baratas, localmente disponíveis e renováveis é de interesse económico. Assim, matérias primas como a xilose, glicerol, melão de cana, soro de queijo, resíduos de biomassa agrícola e florestal são considerados fontes de carbono alternativas para produzir PHA (NARANJO et al., 2013a; SILVA et al., 2014).

Baseado nesse contexto, comparou-se o acúmulo de PHB em meio mineral contendo glicose e xilose nos quatro isolados *Bacillus* preliminarmente escolhidos. Na tabela 9 estão apresentados os resultados dos experimentos.

Tabela 9 - Produção de PHB por isolados halotolerantes do gênero *Bacillus* a partir de meio mineral glicose (10 g/L) e meio mineral xilose (10 g/L), após 72 horas

Isolados	Gênero	MMG	MMX
		3HB (% MSC)	3HB (% MSC)
sac23	<i>Bacillus</i> sp.	30,1	22,9
sac33	<i>Bacillus</i> sp.	40,5	31,3
sac34	<i>Bacillus</i> sp.	51,1	23,0
sac66	<i>Bacillus</i> sp.	26,9	21,4

MMG: Meio mineral glicose (10 g/L); MMX: Meio mineral xilose (10 g/L); MSC: Masa seca celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C).

Sabe-se que a glicose e xilose são os açúcares mais abundantes na natureza, e a utilização eficiente destes é essencial para a produção de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica (HUANG et al., 2016; ZHANG et al., 2014). Por outro lado, encontra-se relatos que mostram que entre os açúcares utilizados para a produção de PHB, a glicose é um dos substratos mais eficientes (KUMAR et al., 2013), porém a xilose custa a metade do preço da glicose, e estudos recentes provaram que a xilose pode ser um substrato potencial e promissor para produção de PHA, gerando uma acumulação máxima até 89% da biomassa total usando *Bacillus* sp (HUANG et al., 2016).

No entanto, embora alguns microrganismos nativos sejam capazes de utilizar xilose, a maioria dos organismos não pode consumir xilose como única fonte de carbono (ZHANG et al., 2014). Contudo, quatro isolados da caatinga produtores de PHA, foram capazes de utilizar xilose como única fonte de carbono para produzir o 3-hidroxibutirato (3HB). Embora a porcentagem de acúmulo tenha sido maior em todos os isolados usando o meio mineral glicose, observou-se que o acúmulo em meio mineral xilose foi semelhante, por exemplo, o isolado sac66 acumulou 26,9 % em MMG e 21,4 % em MMX (Tabela 9). Porém, deve-se ressaltar que as porcentagens de acúmulo dos isolados produtores da caatinga podem ser melhoradas através de ferramentas de biologia molecular ou mudando os processos fermentativos (condições de fermentação)

(DHANGDHARIYA et al., 2015; HUANG et al., 2016; KUMAR et al., 2013, 2014; LOPES et al., 2011; SINGH et al., 2011; YUE et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Por outro lado, têm sido descritas três principais vias metabólicas na natureza para utilização microbiana de xilose. A primeira via oxiredutora existe principalmente em fungos. Na segunda via, que é principalmente em procariotos tais como *Escherichia coli*, a xilose pode ser degradada pela via das Pentoses Fosfato (PPP) por uma isomerase, e por último a xilose pode abastecer o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) através do α -cetoglutarato pela via Weimberg, que tem sido descrita para bactéria e arqueia (KÖHLER et al., 2015).

Em particular, *Bacillus subtilis*, a bactéria gram-positiva mais caracterizada, também possui a segunda via de assimilação de xilose. Tem sido relatado que os genes *xylA* e *xylB* de *B. subtilis* codificam xilose isomerase e xilulose quinase, respectivamente. No entanto, a linhagem selvagem de *B. subtilis* não é capaz de utilizar a xilose como única fonte de carbono, devido à ausência do sistema específico de absorção de xilose (ZHANG et al., 2014). Porém, neste trabalho apresentam-se quatro isolados halotolerantes do gênero *Bacillus* que são capazes de utilizar a xilose como única fonte de carbono para produção de PHA. As vias metabólicas pelas quais essas linhagens halotolerantes da caatinga podem utilizar a xilose ainda têm que ser elucidadas.

De outro lado, cabe ressaltar a importância dos resultados obtidos no presente estudo no contexto econômico brasileiro. A produção de etanol de segunda geração no Brasil, segundo os relatórios da União da Indústria de Cana-De-Açúcar (UNICA) é de cerca de 30,232 milhões de metros cúbicos de etanol produzidos na temporada 2015/16, a partir da fração de glicose derivada do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (33,837 milhões de toneladas, dados UNICA). Sabe-se também que esse processo fornece como resíduo agroindustrial grandes quantidades de xilose, valores que estão aproximadamente na ordem de 10,000,000 toneladas disponíveis (SILVA et al., 2014), que podem ser usadas como matéria-prima em processos biotecnológicos de produtos como os PHA (HUANG et al., 2016; LOPES et al., 2009; ZHANG et al., 2014). Em consequência, os quatro *Bacillus* halotolerantes da caatinga poderiam ser usados em processos para metabolizar essas grandes quantidades de resíduo agroindustrial e assim

obter o PHB, produto que não somente tem um impacto ecológico, mas também econômico no Brasil.

Adicionalmente, o objetivo dos processos biotecnológicos é a produção de químicos, materiais e biocombustíveis em grande escala usando recursos sustentáveis da agricultura. No entanto, a maioria desses processos baseados em microrganismos não é suficientemente competitiva e tem muitas desvantagens, incluindo a alta demanda de energia devido aos processos de esterilização, o alto consumo de água doce, por serem processos não contínuos e pelo uso de substratos de alimentação humana. Por tudo isto, tornou-se importante desenvolver processos biotecnológicos competitivos que possam economizar energia, que sejam contínuos, que não precisem de água doce e que usem substratos de baixo custo (YUE et al., 2014).

Neste contexto, cabe destacar o papel que podem desenvolver as bactérias halotolerantes da caatinga nos processos biotecnológicos. Conforme descrito anteriormente, estas bactérias são capazes de crescer em NaCl, e a água do mar é rica nesse sal (concentração aproximada de 35 g/L). Mais importante ainda, 97% da água da Terra é água do mar. Assim, torna-se necessário o uso de bactérias halófilas ou halotolerantes que sejam capazes de crescer rapidamente em água do mar e utilizando substratos de baixo custo, para gerar processos de fermentação contínuos que diminuam o custo de produção (OREN, 2010; YIN et al., 2014; YUE et al., 2014).

Portanto, a partir dos resultados de acúmulo anteriores, e com o intuito de observar o efeito da salinidade e o uso de glicerol, outra fonte de carbono de baixo custo, no acúmulo de PHB, selecionaram-se dois isolados produtores, *Bacillus* sp. sac33 e *Bacillus* sp. sac34, por serem os microrganismos que apresentaram maior porcentagem de acúmulo de PHB, tanto em MMG como em MMX (Tabela 9).

Para começar, o glicerol bruto é gerado como um co-produto na produção de biodiesel, e por cada 10 galões de biodiesel produzido, 1 galão de glicerol bruto é gerado (NARANJO et al., 2013a). Estima-se que até 2016, a produção mundial de biodiesel deve chegar aos 37 bilhões de galões, o que implica uma produção aproximada de 4 bilhões de galões de glicerol bruto (DE JESUS ASSIS et al., 2016b). No Brasil, a mistura de 7% de biodiesel com diesel tornou-se obrigatória em 2014, portanto, a quantidade de biodiesel produzido no Brasil aumentou 241% nos últimos cinco anos, atingindo 9 milhões

de galões em 2014 (FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016), sendo este produzido principalmente a partir de soja (ANDRÉ CREMONEZ et al., 2015). Deste modo, a conversão biológica oferece a oportunidade de sintetizar uma grande variedade de produtos a partir desse glicerol residual, como por exemplo a síntese de polihidroxicanoatos (NARANJO et al., 2013b; RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2015).

Na Tabela 100 e na Figura 233 estão apresentados os resultados dos ensaios de acúmulo realizados. Em geral, observou-se nos dois isolados avaliados que quando concentrações altas de NaCl foram utilizadas (35, 60 e 120 g/L), foi menor o teor de PHB acumulado independentemente da fonte de carbono usada. Por outro lado, na ausência de NaCl (0 g/L), maior teor de polímero foi acumulado nas três fontes usadas.

No caso particular do isolado *Bacillus* sp. sac33, deve-se destacar que quando foram usados 10 g/L de xilose em meio sem NaCl observou-se o maior acúmulo de PHB correspondente a 36,6 % da massa seca celular (MSC) (Figura 23A), em comparação com 30,5 % e 21,7 % da MSC quando a fonte de carbono foram glicose e glicerol, respectivamente. Contrariamente, quando foram adicionados 120 g/L de NaCl e 10 g/L de glicose observou-se que o acúmulo de PHB diminuiu a 1,5 % da MSC, com respeito ao atingido em meio sem NaCl. Porém é importante reparar que o isolado consegue acumular o polímero numa condição de estresse osmótico alta, e como foi supracitado com ajuda de estratégias de biologia molecular e condições diferentes de fermentação poderia otimizar-se o acúmulo.

Tabela 10 - Produção de PHB por dois isolados halotolerantes do gênero *Bacillus*

Isolado	Fonte de Carbono	Concentração de NaCl (g/L)	MSC (g/L)	3HB (%MSC)	PHB (g/L)
<i>Bacillus sp. sac33</i>	Glicose	0	2,7 ± 4,4	30,5 ± 2,2	0,9 ± 1,4
		35	2,4 ± 3,6	17,6 ± 0,9	0,4 ± 0,4
		60	3,0 ± 2,5	15,6 ± 1,7	0,5 ± 0,9
		120	1,1 ± 0,0	1,5 ± 2,6	0,0 ± 0,0
	Xilose	0	1,6 ± 5,2	36,6 ± 2,5	0,6 ± 1,4
		35	1,6 ± 1,3	16,9 ± 0,6	0,3 ± 0,2
		60	1,4 ± 1,6	14,1 ± 3,6	0,2 ± 0,7
		120	1,2 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	Glicerol	0	1,8 ± 1,8	21,7 ± 4,6	0,4 ± 0,4
		35	2,3 ± 2,9	18,5 ± 2,8	0,4 ± 0,2
		60	2,1 ± 4,4	17,0 ± 0,4	0,4 ± 0,6
		120	1,6 ± 2,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>Bacillus sp. sac34</i>	Glicose	0	3,1 ± 0,4	27,7 ± 2,7	0,8 ± 0,9
		35	3,6 ± 2,1	21,7 ± 1,2	0,8 ± 0,3
		60	4,2 ± 1,2	8,7 ± 1,2	0,4 ± 0,6
		120	2,1 ± 1,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Xilose	0	2,0 ± 1,8	27,0 ± 2,0	0,5 ± 0,4
		35	2,4 ± 2,0	21,1 ± 1,9	0,5 ± 0,2
		60	2,1 ± 0,1	14,2 ± 1,4	0,3 ± 0,3
		120	0,7 ± 2,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Glicerol	0	1,9 ± 0,8	20,3 ± 2,1	0,4 ± 0,4
		35	2,1 ± 2,9	14,8 ± 1,4	0,3 ± 0,8
		60	1,6 ± 4,2	10,9 ± 2,7	0,2 ± 0,0
		120	1,6 ± 2,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Produção a partir de meio mineral glicose (10 g/L), meio mineral xilose (10 g/L) e meio mineral glicerol (10 g/L), contendo quatro concentrações de NaCl, após 72 horas. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão. MSC: Masa seca celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C).

Do mesmo modo, os ensaios de acúmulo realizados com o isolado *Bacillus sp. sac34* evidenciaram que o aumento da salinidade no meio diminui o teor de PHB produzido pela bactéria (Figura 23B), ou levando a porcentagem de acúmulo até 0,0 % quando 120 g/L de NaCl é adicionado no meio. O maior teor de PHB acumulado pelo isolado foi observado quando se utilizou glicose em meio sem sal (27,7 % da MSC), porém, o acúmulo da bactéria foi semelhante em meio com xilose, sendo este de 27,0 %. Note-se também que o acúmulo deste isolado quando 35 g/L de NaCl (salinidade aproximada à água do mar) são adicionados em meios com glicose e xilose, sendo estes

de 21,7 % e 21,1 % respectivamente, foram maiores que os apresentados pelo isolado *Bacillus* sp. sac33 nas mesmas fontes (17,6 % em glicose e 14,1 % em xilose).

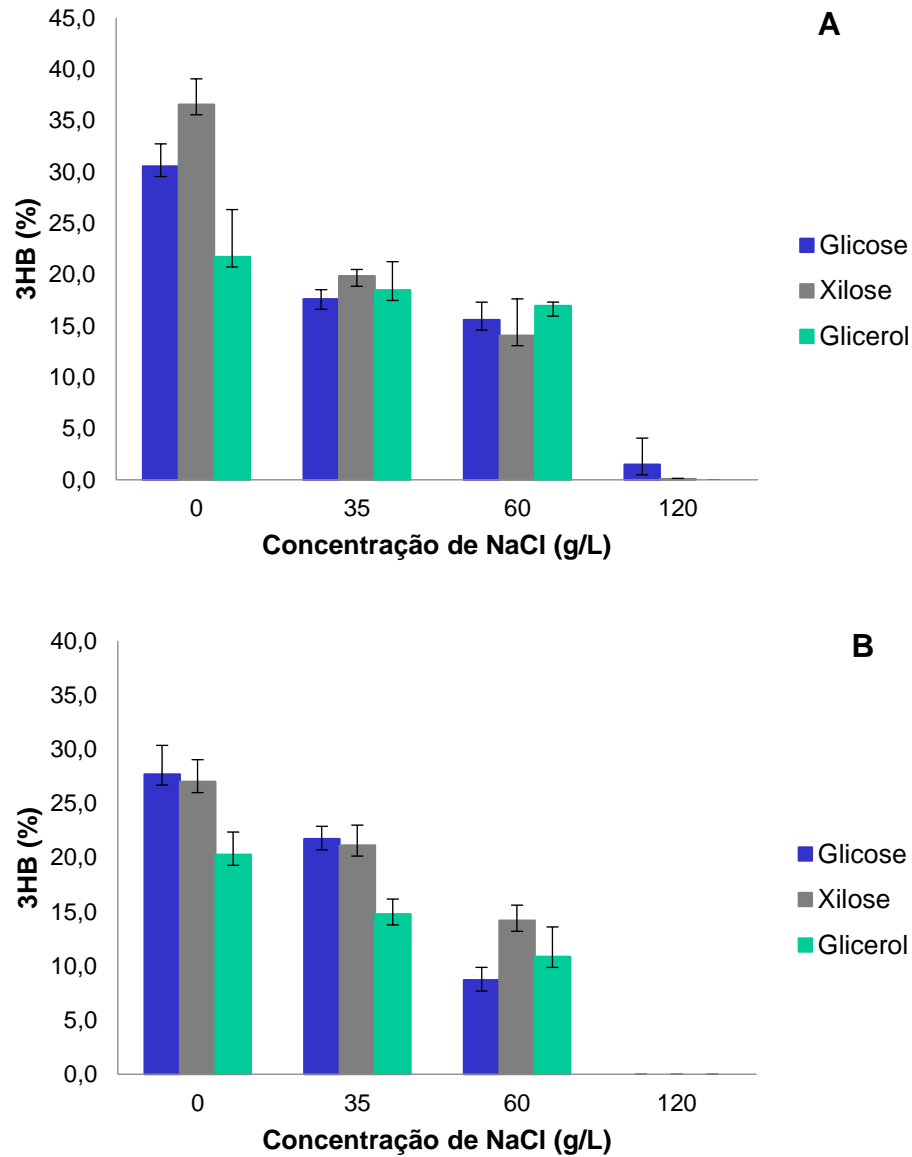


Figura 23 - Gráficos do perfil de acúmulo do monômero 3HB por dois isolados do gênero *Bacillus* a partir de glicose, xilose e glicerol em meio mineral contendo quatro diferentes concentrações de NaCl. **A**, isolado *Bacillus* sp. sac33. **B**, isolado *Bacillus* sp. sac34

Além disso, observou-se também que em geral a fonte de carbono que menor teor de PHB permitiu acumular nos dois isolados avaliados foi o glicerol, apresentando as culturas um acúmulo total de polímero entre 10,9 e 21,7 % da massa celular. No entanto, deve-se destacar de novo a importância que tem em nível industrial e ambiental o isolamento de bactérias que possam usar naturalmente esse tipo de fontes de carbono de baixo custo, neste caso o glicerol, para produção de PHB, e como foram apresentados os dois isolados da caatinga avaliados no estudo conseguem fazê-lo.

Estes resultados sugerem o potencial uso destas bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* na produção de PHB em processos ambientalmente amigáveis, onde fontes de carbono de baixo custo e a água do mar podem ser usadas (OREN, 2010; YIN et al., 2014), e tendo em consideração que apesar de ter obtido teores de PHB menores aos relatados por alguns pesquisadores para bactérias do gênero *Bacillus* (Tabela 11), este ensaio foi a primeira triagem realizada com os isolados halotolerantes da caatinga e a porcentagem de acúmulo de PHB ainda pode ser melhorada usando diferentes abordagens biotecnológicas.

Tabela 11 - Dados de produção de PHA por bactérias do gênero *Bacillus* relatados na literatura

Linagem	Fonte de carbono	PHA	PHA (% MSC)	Referência
<i>Bacillus sp. MA3.3</i>	Glicose	P3HB	62,2	(LOPES et al., 2009)
<i>Bacillus sp. MA3.3</i>	Xilose	P3HB	64,4	
<i>Bacillus sp.</i>	Glicose	P3HB	40,0	(SINGH et al., 2011)
<i>Bacillus sp.</i>	Xilose	P3HB	37,4	
<i>Bacillus megaterium</i>	Glicerol	P3HB	60,0	(NARANJO et al., 2013b)
<i>Bacillus subtilis NG05</i>	Água residual, indústria de açúcar	P3HB	50,1	(SINGH et al., 2013a)
<i>Bacillus spp.</i>	Glicose	P(HB-co-3HV)	60,5	(KUMAR et al., 2014)
<i>Bacillus megaterium JK4h</i>	Glicose	P3HB	56,7	(DHANGDHARIYA et al., 2015)
<i>Bacillus axaraqunsis BIPC01</i>	Água residual, indústria petroquímica	P3HB	66,0	(MAYELI; MOTAMEDI; HEIDARIZADEH, 2015)

PHA: polihidroxialcanoato; MSC: Masa seca celular; P3HB: poli-3-hidroxitirato; P(HB-co-3HV): poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxisvalerato).

5.3 Ensaio de produção de EPS

Nos últimos anos, o aumento da demanda por polímeros naturais para alimentos, indústria farmacêutica, indústria de cosméticos e outras aplicações industriais incentivou o interesse de isolar e identificar novos polissacarídeos produzidos por microrganismos, que sendo isolados de ambientes extremos podem ter aplicações inovadoras ou características diferentes às tradicionais (POLI; ANZELMO; NICOLAUS, 2010). Em especial, destaca-se o recente uso dos EPS nas aplicações médicas devido às suas atividades biológicas específicas, tais como atividade antioxidante, efeitos imunostimulantes, efeitos antitumorais e atividade antiviral (YE et al., 2012).

Por outro lado, os microrganismos halófilos e halotolerantes além de serem de especial interesse para os cientistas graças a que desempenham um papel importante nos ambientes salinos e hipersalinos, têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos como estratégia para o crescimento, a adesão a substratos sólidos e a sobrevivência em condições adversas (SPANÒ; ARENA, 2016; UPADHYAY et al., 2016). A continuação apresenta-se os resultados obtidos na seleção, produção e extração de EPS por bactérias halotolerantes da caatinga, como também se expõem resultados interessantes referentes aos ensaios de ativação de macrófagos realizados com extratos brutos de EPS bacterianos.

5.3.1 Seleção de isolados produtores de EPS

Os resultados relacionados à seleção dos isolados halotolerantes produtores de EPS estão apresentados na tabela 12. Para começar, 46 % dos isolados halotolerantes (doze bactérias) foram capazes de produzir EPS, resultado observado como a formação de um halo mucoide e viscoso no meio sólido (Figura 24).

Tabela 12 - Isolados halotolerantes produtores de EPS, após 48 horas

Isolado	Gênero	Produção EPS	Halo (mm)
sac1	<i>Bacillus</i> sp.	+	35
sac7	<i>Bacillus</i> sp.	+	33
sac9	<i>Bacillus</i> sp.	+	30
sac10	<i>Bacillus</i> sp.	+	22
sac16	<i>Bacillus</i> sp.	+	28
sac18	<i>Bacillus</i> sp.	+	24
sac22	<i>Bacillus</i> sp.	+	36
sac23	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac24	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac33	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac34	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac36	<i>Exiguobacterium</i> sp.	-	-
sac37	<i>Curtobacterium</i> sp.	-	-
sac38	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-
sac41	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac44	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac45	<i>Bacillus</i> sp.	+	17
sac51	<i>Bacillus</i> sp.	+	18
sac53	<i>Curtobacterium</i> sp.	-	-
sac54	<i>Curtobacterium</i> sp.	+	30
sac58	<i>Curtobacterium</i> sp.	-	-
sac59	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-
sac64	<i>Bacillus</i> sp.	+	17
sac65	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	12
sac66	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
sac76	<i>Bacillus</i> sp.	-	-

(+) isolado produtor de EPS; (-) isolado não produtor de EPS.

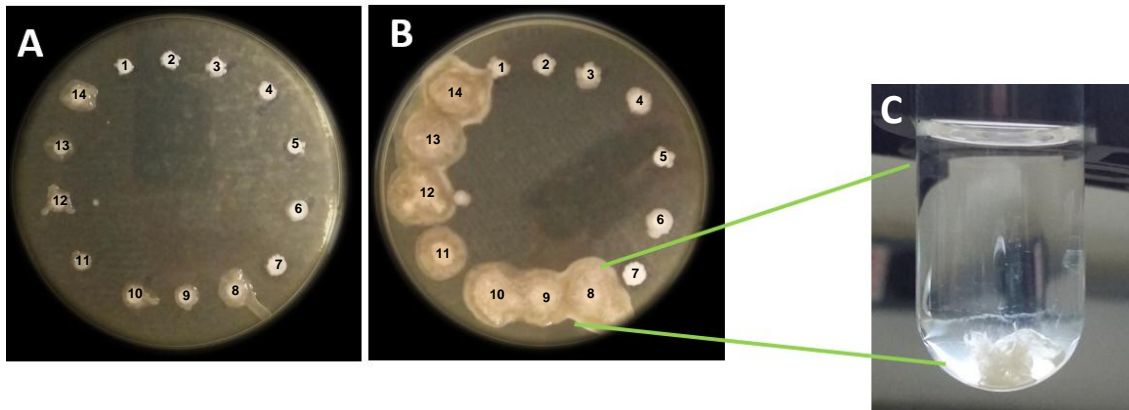


Figura 24 - Teste qualitativo de produção de EPS por isolados halotolerantes. **A**, produção após de 24 horas de incubação, **B**, produção após de 48 horas, e **C**, confirmação da produção de EPS pela formação de um precipitado. **1:** *Staphylococcus* sp. sac38, **2:** *Curtobacterium* sp. sac37, **3:** *Exiguobacterium* sp. sac36, **4:** *Bacillus* sp. sac34, **5:** *Bacillus* sp. sac33, **6:** *Bacillus* sp. sac24, **7:** *Bacillus* sp. sac23, **8:** *Bacillus* sp. sac22, **9:** *Bacillus* sp. sac18, **10:** *Bacillus* sp. sac16, **11:** *Bacillus* sp. sac10, **12:** *Bacillus* sp. sac9, **13:** *Bacillus* sp. sac7 e **14:** *Bacillus* sp. sac1

Especificamente, os isolados produtores foram um isolado do gênero *Pseudomonas* (Figura 25), um isolado do gênero *Curtobacterium* (Figura 26), e dez *Bacillus* (Figura 27) produzindo halos de 17-36 mm, sendo o isolado sac22 aquele que produziu o maior halo (36 mm).

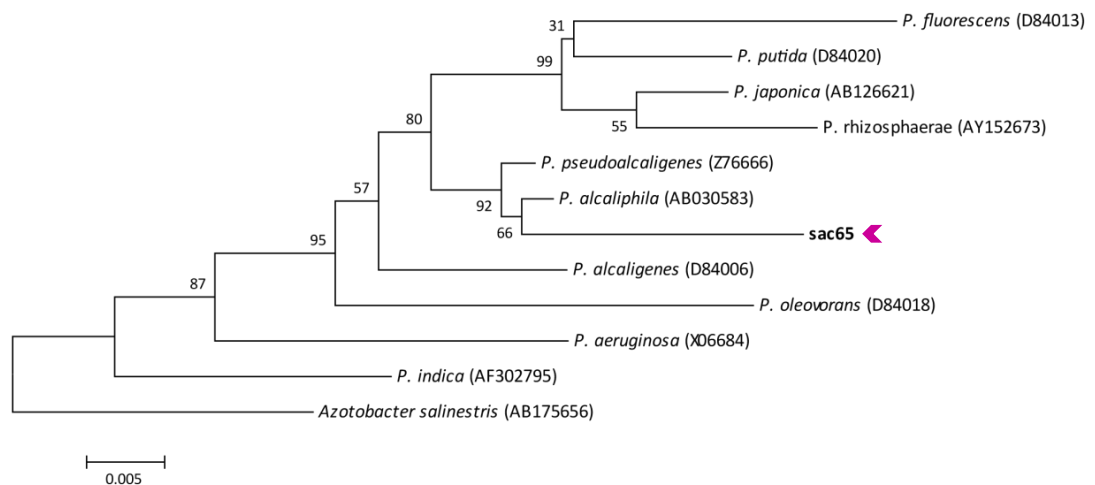


Figura 25 - Árvore filogenética do isolado do gênero *Pseudomonas* produtor de EPS indicado em roxo (◀)

O gênero *Pseudomonas* é uma fonte rica de exopolissacarídeos. Na literatura encontra-se amplamente relatado a produção de EPS por uma grande variedade de espécies do gênero *Pseudomonas* (CELIK; ASLIM; BEYATLI, 2008; KAVAMURA et al., 2013b; SHARMA et al., 2013), sendo os mais estudados os produzidos pela espécie *P. aeruginosa* que incluem o alginato, Psl e Pel (XIE et al., 2014). Mas também, encontram-se outros EPS com aplicações diferentes as tradicionais como descreveram YE et al. (2012), que isolaram e purificaram um polímero com atividade antioxidante a partir da cepa marinha de *Pseudomonas* PF-6, e depois em 2016, relataram a biossíntese de um EPS rico em selênio (Se-EPS), também com atividade antioxidante, produzido a partir da cepa de *Pseudomonas* PT-8 (YE et al., 2016). Do mesmo modo, Sirajunnisa et al. (2016) relataram a produção de um EPS com atividade antioxidante, obtido a partir da cepa *P. fluorescens* CrN6.

Por outro lado, não se encontram relatos que descrevam o gênero *Curtobacterium* como microrganismo produtor de exopolissacarídeos, provavelmente pelos poucos estudos que são realizados com esse gênero bacteriano. Contudo, no presente estudo descreva-se pela primeira vez o isolado sac54 como microrganismo produtor de EPS, sendo uma das bactérias que apresentou maior halo de produção no teste (30 mm).

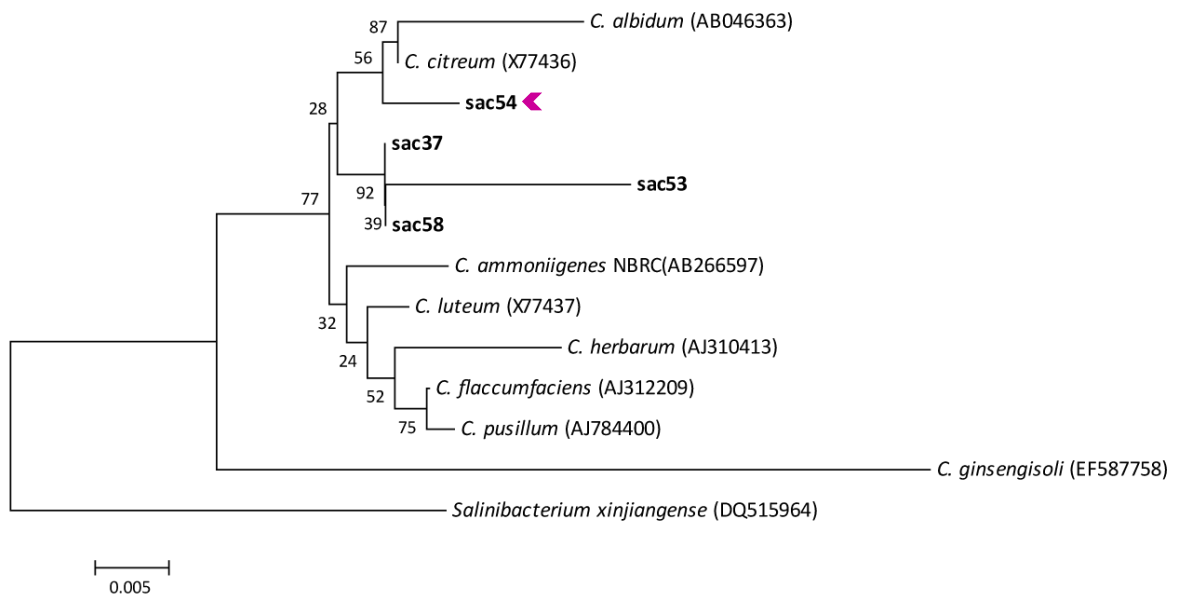


Figura 26 - Árvore filogenética do isolado do gênero *Curtobacterium* produtor de EPS indicado em roxo (◀)

Contrariamente ao gênero *Curtobacterium*, a produção de EPS pelo gênero *Bacillus* encontra-se relatada na literatura, assim como também as diferentes aplicações nas indústrias. Contudo, chama atenção o uso recente destes polímeros como agentes antivirais, antioxidantes, imunoestimuladores e antibiofilme. Yang et al. (2015) publicaram o isolamento de um EPS (EPS-1) produzido por um *B. amyloliquefaciens* composto por glicose, manose, galactose e arabinose, que exibiu uma forte atividade antioxidante em células HepG2.

Igualmente, Gugliandolo et al. (2014) e Spanò et al. (2016) descreveram um EPS novo produzido pela linhagem *B. licheniformis* T14, denominado EPS1-T14, solúvel em água, não citotóxico, que apresenta duas atividades importantes; 1) tem a capacidade de estimular a resposta imune mediada por células Th1, que poderia ser utilizado como defesa imunológica contra vírus como o Herpes simples tipo 2 (HSV-2), e 2) pode prevenir a formação de biofilme de bactérias de importância clínica como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Mais tarde em 2016, o mesmo grupo de pesquisa analisou o papel do EPS-B3-15, produzido por *B. licheniformis* cepa B3-15, na produção de citocinas do tipo Th2 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) infectadas e não infectadas com HSV-2, demonstrando a capacidade do EPS de induzir uma rede particular de citocinas, com consequentes efeitos sobre as células do sistema imunológico durante uma infecção de HSV-2 (SPANÒ; ARENA, 2016).

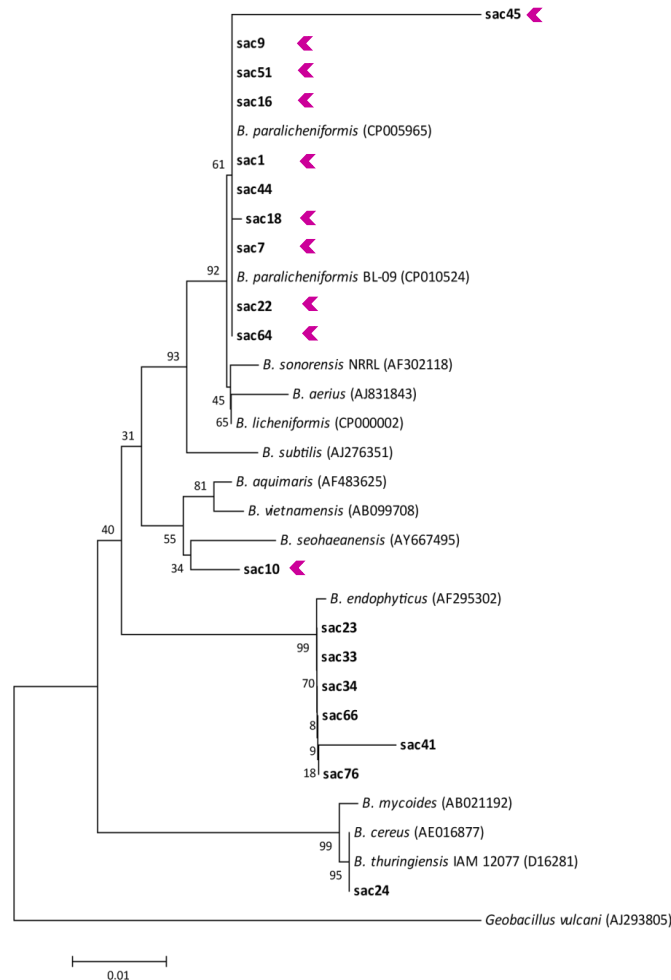


Figura 27 - Árvore filogenética dos isolados do gênero *Bacillus* produtores de EPS indicados em roxo ()

Baseados nesses estudos, e tendo em consideração a importância de desenvolver novas terapias e medicamentos que ajam contra microrganismos resistentes como os vírus e bactérias, decidiu-se avaliar a possível atividade imunoestimuladora dos EPS bacterianos produzidos no estudo. Os resultados obtidos são descritos a seguir.

5.3.2 Produção, extração de EPS e ensaios de ativação de macrófagos

Os macrófagos ocupam uma posição única no sistema imune, exercendo um papel vital como interface entre a imunidade inata e adaptativa. Eles podem neutralizar substâncias estranhas, microrganismos patogênicos e células cancerosas diretamente através de fagocitose e indiretamente através da secreção de citocinas e de moléculas

citotóxicas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) -, interleucina (IL) -1 e óxido nítrico (NO). Assim, os macrófagos são células alvo de alguns agentes imunomoduladores e antitumorais que podem ser ativados por diferentes substâncias biologicamente ativas, como os polissacarídeos. Estes produtos que podem ser de origem microbiano, têm demonstrado possuir atividade imunoestimulante potente sobre as respostas celulares e humorais contra antígenos, estimulando as células assassinas naturais, células-T, células B, macrófagos e respostas do sistema imune (WANG et al., 2016).

A ativação de macrófagos pelos EPS bacterianos obtidos no estudo, foi medida através do teste do Griess conforme descrito no item 4.6.6.1 de Material e Métodos, e realizado por colaboradores do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha da Universidade Federal do Ceará. O ensaio do Griess é um teste analítico que mensura indiretamente a produção de óxido nítrico (NO), pela detecção da presença de nitrito em solução. O NO é uma importante molécula envolvida na resposta imune além de outros sistemas (TRIPATHI, 2007).

Através da Reação de Griess, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática, produzindo um sal de diazônio. Este sal reagirá com a 3-hidroxi-1,2,3,4-tetraidrobenzilquinolina, uma molécula orgânica, e produzirá a coloração rosa. A coloração resultante tem intensidade de cor em proporção direta com a concentração de nitrito na amostra (GREEN et al., 1982; GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981).

Assim, este ensaio avaliou as respostas farmacológicas produzidas por macrófagos murinos (RAW 264.7) tratadas com EPS de bactérias. A figura 28 mostra a resposta dos EPS bacterianos utilizados no experimento.

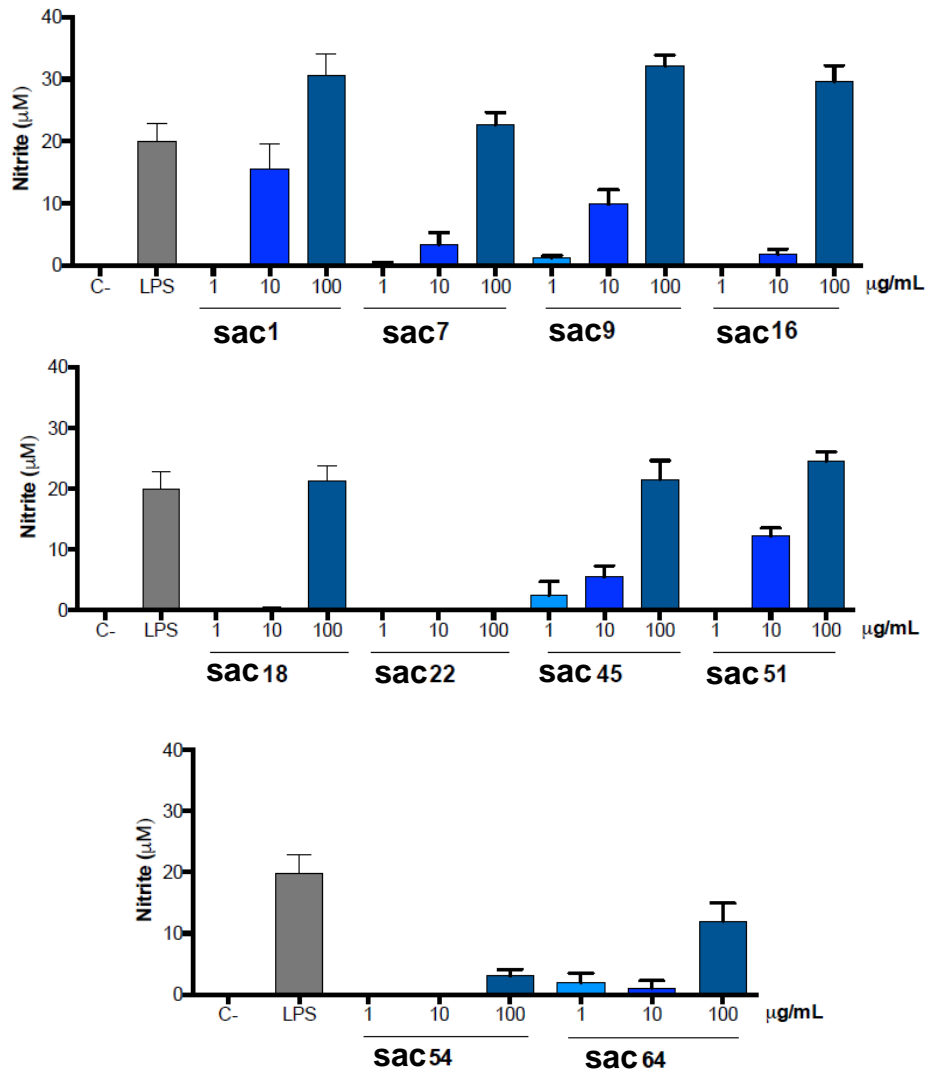


Figura 28 - Detecção de nitrito no sobrenadante de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados in vitro com meio (C-), LPS (C+) ou 1, 10 e 100 µg/ml dos exopolissacarídeos bacterianos (EPS) após 48 horas de incubação

Como se observa na figura 28, a maior parte dos EPS bacterianos na concentração de 100 µg/ml aumentaram as concentrações de nitrito (NO^{-2}) no sobrenadante dos macrófagos, sendo alguns maiores que o causado pelo controle positivo (LPS). Outros EPS que aumentaram as concentrações de NO^{-2} foram os produzidos pelos isolados *Curtobacterium* sp. sac54 e *Bacillus* sp. sac64, porém o aumento foi menor em comparação com o aumento produzido pelo LPS e pelos outros EPS avaliados. Por outro lado, o único EPS que não gerou nenhum aumento nas concentrações de NO^{-2} foi o produzido pelo isolado *Bacillus* sp. sac22.

Estes resultados são uma primeira aproximação ao potencial imunoestimulatório dos EPS avaliados, porém, ainda tem que ser realizados outros ensaios confirmatórios da atividade observada, assim como a caracterização química dos exopolissacarídeos bacterianos.

5.3.3 *Ensaio de morte celular*

Finalmente, os ensaios de morte celular também foram realizados por colaboradores do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha da Universidade Federal do Ceará. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela amostra (EPS bacteriano) em estudo no metabolismo celular de glicídios usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial é quantificada pela redução do MTT (sal de coloração amarela) a formazan (sal de coloração arroxeadada) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

As linhagens celulares utilizadas nesse ensaio foram: HCT-116 (câncer de cólon), B16-F10 (melanoma murino) e RAW 264.7 (macrófagos murinos). As células foram tratadas após 24 horas de plaqueamento e a viabilidade mensurada após 48 horas de tratamento (Figura 29).

tratamentos exibiram taxa metabólica menor que o controle negativo, porém a maioria apresentou uma taxa maior que o controle. Mais testes deverão ser feitos para avaliar esses resultados.

5.4 Ensaios de produção de Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero natural de elevado peso molecular que, graças as suas propriedades estruturais, reológicas, fisiológicas e biológicas, desempenha funções estruturais, de reconhecimento e de sinalização nos tecidos do corpo de humanos e animais (SHENG; LING; WANG, 2014; WIDNER et al., 2005; YU et al., 2008). Pela mesma razão, essa macromolécula tem sido usada em medicamentos, cosméticos, sistemas de entrega de drogas, vacinas contra Aids e alimentos. Na indústria é produzido utilizando a bactéria Gram-positiva *Streptococcus zooepidemicus*, porém, esse microrganismo não é a fonte mais ideal de AH devido ao seu potencial para produzir exotoxinas, a dificuldade no controle da fermentação e do alto custo do meio de cultivo necessário para o crescimento. Em consequência, a procura de outros microrganismos alternativos para produção de AH é de interesse e desejável para a indústria (SHENG; LING; WANG, 2014).

Deste modo, conhecendo o potencial biotecnológico de novas linhagens produtoras de AH, avaliou-se a capacidade de produção de ácido hialurônico dos isolados halotolerantes da caatinga realizando culturas em meio líquido de produção e quantificação pelo método de *Alcian Blue*. Os resultados obtidos são apresentados a continuação na tabela 14 e na figura 30. Os dados da curva padrão de AH encontra-se no apêndice B.

Para começar, o *Alcian blue* é um corante de ftalocianina de cobre ($C_{56}H_{68}C_{14}CuN_{16}S_4$) e solúvel em água, que pode ser utilizado para coloração de ácidos mucopolissacarídeos sulfatados e carboxilados. Sabe-se que o corante age formando ligações de sal com os grupos ácidos de mucopolissacarídeos devido à presença de cobre na molécula, o que causa uma diminuição da cor azul (YU et al., 2008). Dado que o AH é um mucopolissacarídeo, o método descrito por YU et al. (2008) é usado para quantificação desse biopolímero.

Assim, o método consiste na medição fotométrica de uma solução de *Alcian blue* que precipita com AH, o que cria uma relação inversa entre a concentração de AH e a absorvância do corante, que finalmente é ajustada num polinômio de segunda ordem permitindo a quantificação do AH nas amostras.

Tabela 13 -*Screening* de produção e quantificação de AH usando o *Alcian blue*. Linhagem controle *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* ATCC 39920. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão

Isolado	D.O _{540nm}	AH (mg/L)
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>Zooepidemicus</i> ATCC 39920	0,171 ± 0,0	640,6
sac1	0,214 ± 0,0	561,6
sac7	0,300 ± 0,0	420,0
sac9	0,171 ± 0,0	640,6
sac10	0,187 ± 0,0	610,6
sac16	0,783 ± 0,0	34,2
sac18	0,295 ± 0,0	426,4
sac22	0,301 ± 0,0	418,5
sac23	0,163 ± 0,0	655,6
sac24	0,266 ± 0,0	472,6
sac33	0,159 ± 0,0	663,6
sac34	0,177 ± 0,0	628,9
sac36	0,190 ± 0,0	603,5
sac37	0,155 ± 0,0	671,4
sac38	0,191 ± 0,0	601,6
sac41	0,161 ± 0,0	658,2
sac44	0,233 ± 0,0	527,0
sac45	0,799 ± 0,0	33,3
sac51	0,805 ± 0,1	33,1
sac53	0,168 ± 0,0	645,4
sac54	0,131 ± 0,0	719,0
sac58	0,163 ± 0,0	655,9
sac59	0,152 ± 0,0	676,3
sac64	0,173 ± 0,0	636,8
sac65	0,206 ± 0,0	575,9
sac66	0,173 ± 0,0	636,8

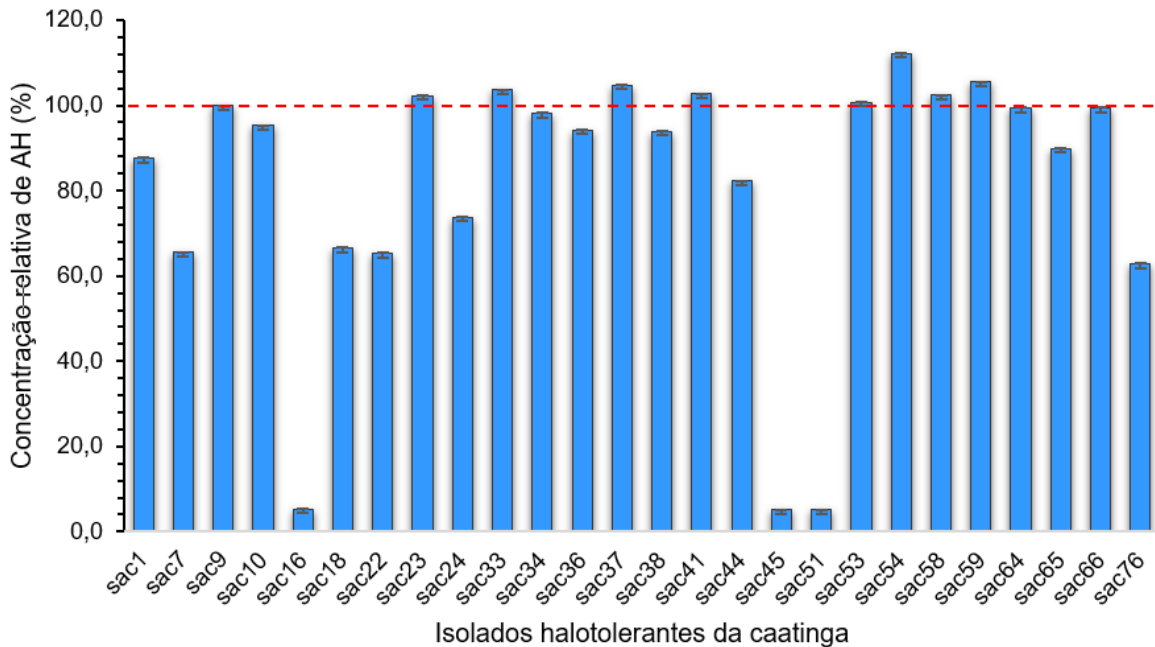


Figura 30 - Gráfico da concentração relativa de AH obtida a partir de isolados halotolerantes da caatinga. Linhagem controle (linha tracejada em vermelho-100%), *Streptococcus equi subsp. Zoepidemicus* ATCC 39920

Como se observa na figura 30, o isolado *Curtobacterium* sp. sac54 mostrou a maior concentração relativa de AH (112 %) em relação ao controle (linha 100 %). Veja-se também que os isolados *Bacillus* sp. sac23 (102 %), *Bacillus* sp. sac33 (104 %), *Curtobacterium* sp. sac37 (105 %), *Bacillus* sp. sac41 (103 %), *Curtobacterium* sp. sac58 (102 %) e *Staphylococcus* sp. sac59 (106 %) apresentaram uma produção de AH maior ao controle. Por outro lado, de 15 isolados que apresentaram concentrações entre 90% ou maiores ao controle, 53 % pertencem ao gênero *Bacillus*, 27 % a *Curtobacterium*, 13 % a *Staphylococcus* e 7% a *Exiguobacterium*.

No caso dos isolados *Bacillus* sp. sac16, *Bacillus* sp. sac45 e *Bacillus* sp. sac51, observou-se uma concentração relativa inferior ao 10%. Contudo, destaca-se que em geral mais da metade dos isolados halotolerantes, segundo sugere o método de *Alcian blue*, foram capazes de produzir AH e também de acumular o biopolímero em concentrações maiores ou semelhantes ao controle, fato que demonstra o potencial promissor destas linhagens como fonte alternativa na produção industrial de AH. Porém, os resultados ainda têm que ser avaliados por métodos analíticos devido a que o corante

pode medir também outro tipo de mucopolissacarídeos como foi mencionado anteriormente.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou contribuir no estudo do potencial biotecnológico de microrganismos isolados no bioma caatinga, destacando sua biodiversidade e a relevância de continuar explorando ambientes extremos pouco estudados. Os resultados descritos ao longo do texto evidenciam que os isolados halotolerantes são uma fonte rica em compostos com atividades interessantes para as diferentes indústrias. Conseqüentemente, os ensaios preliminares realizados indicaram que a maioria dos isolados são bactérias Gram-positivas, pertencentes a gêneros descritos frequentemente em ambientes extremos, que graças à capacidade que possuem de sintetizar diferentes compostos conseguem proliferar nessas condições adversas e até proteger outro tipo de organismos como espécies vegetais. Todos os isolados avaliados são microrganismos halotolerantes, que apresentam a capacidade de crescer em 120 g/L de NaCl, característica relevante para a aplicação destas bactérias em nível industrial em processos ambientalmente amigáveis onde a água do mar pode ser usada.

Este trabalho permitiu confirmar que quatro isolados do gênero *Bacillus* são capazes de acumular 3-hidroxi-butarato (3HB) a partir de glicose, xilose e glicerol, adicionalmente, observou-se acúmulo de 3HB em experimentos se fornecendo altas concentrações de NaCl, o que levou a uma diminuição no acúmulo. Porém, os resultados sugerem o potencial uso destas bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* na produção de PHB, em processos onde fontes de carbono de baixo custo e meios com elevada concentração de sal podem ser usadas.

Alguns isolados halotolerantes foram capazes de produzir EPS, os quais não são citotóxicos e têm efeitos imunoestimulantes em macrófagos murinos, resultados que mostram a relevância desses compostos bacterianos no desenvolvimento de novas drogas e medicamentos para o tratamento de diferentes doenças como as geradas por vírus e células cancerígenas. Os ensaios de produção de biopolímeros permitiram evidenciar dois grupos, membros do mesmo gênero *Bacillus*, diferenciados pelo composto sintetizado e posição filogenética: produção de PHB (isolados próximos à espécie *B. endophyticus*), e produção de EPS (isolados próximos à espécie *B. paralicheniformis*).

Todos os isolados halotolerantes foram capazes de produzir AH e 58% deles acumularam o biopolímero em concentrações maiores ou semelhantes ao controle. A produção deste biopolímero a partir das bactérias halotolerantes isoladas do bioma caatinga, apresentam uma vantagem sob as linhagens usadas atualmente nas indústrias pois não são microrganismos patogênicos.

REFERÊNCIAS*

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, 2010.

ALBARRACÍN, V. H.; GÄRTNER, W.; FARIAS, M. E. Forged under the Sun: Life and Art of Extremophiles from Andean Lakes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 92, n. 1, p. 14–28, 2016.

AL-MAILEM, D. et al. Culture-Dependent and Culture-Independent Analysis of Hydrocarbonoclastic Microorganisms Indigenous to Hypersaline Environments in Kuwait. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 857–865, 2014.

ANDRÉ CREMONEZ, P. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415–428, 2015.

BHARTI, N. et al. *Exiguobacterium oxidotolerans*, a halotolerant plant growth promoting rhizobacteria, improves yield and content of secondary metabolites in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell under primary and secondary salt stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 379–387, 2013.

BHATNAGAR, A; BHATNAGAR, M. Microbial diversity in desert ecosystems. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 91–100, 2005.

CABRIA, G. L. B. et al. Draft Genome Sequence of Haloalkaliphilic *Exiguobacterium* sp. Strain AB2 from Manleluag Ophiolitic Spring, Philippines. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, p. 2–3, 2014.

CARDINALE, M. et al. Paradox of plant growth promotion potential of rhizobacteria and their actual promotion effect on growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. **Microbiological Research**, v. 181, p. 22–32, 2015.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CELIK, G. Y.; ASLIM, B.; BEYATLI, Y. Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 178–182, 2008.

CHAUHAN, H. et al. Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38–53, 2015.

CHIMETTO, L. A. et al. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 312–319, 2008.

CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.

CHROMASPRO. Version 2.1.2. Technelysium®, 1998. **Software**. Disponível em: <http://technelysium.com.au/wp/chromaspro>. Acesso em: 12 nov. 2014.

DALY, M. J. Extremophiles Handbook. **Extremophiles**, p. 1118–1130, 2010.

DAOUD, L. et al. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 232–237, 2013.

DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 705–727, 2010.

DE JESUS ASSIS, D. et al. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2016a.

DE JESUS ASSIS, D. et al. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 29 jun. 2016b.

DE LOS SANTOS, M. C. et al. Identification and characterization of the part of the bacterial community associated with field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea*) cv. SFRO Don Tomás in Uruguay. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1-14, 2015.

DHAKAR, K.; PANDEY, A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 1–12, 2016.

DHANGDHARIYA, J. H. et al. Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 254–261, maio 2015.

DIAS, A. C. F. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 2009.

DIKEN, E. et al. Genomic analysis reveals the biotechnological and industrial potential of levan producing halophilic extremophile, *Halomonas smyrnensis* AAD6T. **SpringerPlus**, v. 4, p. 393, 2015.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. rpoB Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1333–1338, 2002.

EDDOUAOUDA, K. et al. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 408–418, 2012.

EL-DEEB, B.; FAYEZ, K.; GHERBAWY, Y. medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. **Journal of Plant Interactions**, v. 9145, n. June 2015, p. 1–9, 2012.

ELLEUCHE, S. et al. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 25, p. 113–119, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Laboratório de Microbiologia Ambiental. 2014. 1 fotografia.

FABER, M. DE O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 2016.

FERREIRA, C. **Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

GENBANK. National center for Biotechnology Information. Disponível em: (www.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em: 4 out. 2015.

GIAMMARINARO, P. et al. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3673–3680, 2005.

GONÇALVES, V. N. et al. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. **Polar Biology**, p. 1143–1152, 2015.

GOOGLE. Google imagens. **Mapa bioma caatinga**. 2016. Disponível em: <https://www.google.com.br>. Acesso em: 15 jun. 2014.

GOOGLE. Google Earth. 2016. **Areia Branca**. Disponível em: <https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/download/thanks.html#os=win#updater=yes>. Acesso em: 18 maio 2016.

GOUDARZI, G. et al. Particulate matter and bacteria characteristics of the Middle East Dust (MED) storms over Ahvaz, Iran. **Aerobiologia**, v. 30, n. 4, p. 345–356, 2014.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4490, p. 56–8, 3 abr. 1981.

GUGLIANDOLO, C. et al. Antiviral and immunomodulatory effects of a novel bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 1028–1034, 2014.

HAMEDI, J.; MOHAMMADIPANAH, F.; VENTOSA, A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. **Extremophiles**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2013.

HEYMANN, D. et al. Anti-metastatic properties of a marine bacterial exopolysaccharide-based derivative designed to mimic glycosaminoglycans. **Molecules**, v. 21, n. 3, 2016.

HOLBEN, W. E. et al. GC Fractionation Enhances Microbial Community Diversity Assessment and Detection of Minority Populations of Bacteria by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis GC Fractionation Enhances Microbial Community Diversity Assessment and Detection of Minority Po. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2263–2270, 2004.

HUANG, L. et al. The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source. **Waste Management**, v. 52, p. 77–85, jun. 2016.

ISNANSETYO, A.; KAMEI, Y. Bioactive substances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 10, p. 1239–1248, 2009.

JAIN, R.; NAGAL, S.; JAIN, P. C. Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. **Microorganisms in Environmental Management**, 745-766, 2012.

JOGHEE, N. N.; JAYARAMAN, G. Biochemical Changes Induced by Salt Stress in Halotolerant Bacterial Isolates is Media Dependent as Well as Species Specific. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, n. March 2015, p. 37–41, 2014.

JUIBARI, M. M. et al. Investigation of a Hot-Spring Extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* Strain Thermo-BF for Extracellular Biosynthesis of Functionalized Gold Nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 5, n. 4, p. 233–241, 2015.

KAPLAN, D. et al. A survey of the microbial community in the rhizosphere of two dominant shrubs of the Negev Desert highlands, *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) and *Atriplex halimus* (Amaranthaceae), using cultivation-dependent and cultivation-independent methods. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1713–1725, 2013.

KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013a.

KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–91, 6 maio 2013b.

KIM, M. K. et al. *Curtobacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 2393–2397, 2008a.

KIM, S. K. et al. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 5, p. 511–523, 2008b.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–20, dez. 1980.

KÖHLER, K. A. K. et al. D-Xylose assimilation via the Weimberg pathway by solvent-tolerant *Pseudomonas taiwanensis*. **Environmental Microbiology**, v. 17, p. 156–170, 2015.

KREYENSCHULTE, D.; KRULL, R.; MARGARITIS, A. Recent Advances in Microbial Biopolymer Production and Purification. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 1–15, 29 mar. 2014.

KUHLMAN, K. R. et al. Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. **Icarus**, v. 174, n. 2, p. 585–595, 1 abr. 2005.

KULKARNI, S. O. et al. International Journal of Biological Macromolecules Production of copolymer , poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 784–789, 2015.

KUMAR, P. et al. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1543–1561, dez. 2013.

KUMAR, P. et al. Ecobiotechnological Approach for Exploiting the Abilities of *Bacillus* to Produce Co-polymer of Polyhydroxyalkanoate. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 151–7, 2014.

LIANG, T. W.; WANG, S. L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: Production, isolation, structure, and bioactivities. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1847–1863, 2015.

LINDGREN, A. R. et al. Life on the Edge—the Biology of Organisms Inhabiting Extreme Environments: An Introduction to the Symposium. **Integrative and Comparative Biology**, p. 1–7, 2016.

LIU, L. et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 99, 2011.

LIU, R. et al. *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 2008, p. 1404–1408, 2008.

LOPES, M. S. G. et al. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1751–1756, 2009.

LOPES, M. S. L. et al. Role of CcpA in polyhydroxybutyrate biosynthesis in a newly isolated *Bacillus* sp. MA3.3. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 63–69, 2011.

MANDIC-MULEC, I.; STEFANIC, P.; ELSAS, J. A. N. D. V. A. N. Ecology of Bacillaceae. **American Society for Microbiology**, p. 1–25, 2015.

MARRONI, I. V. Screening of bacteria of the genus *Bacillus* for the control of the plant-pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 302–315, 2014.

MÁTHÉ, I. et al. Vertical physico-chemical gradients with distinct microbial communities in the hypersaline and heliothermal Lake Ursu (Sovata, Romania). **Extremophiles**, v. 18, n. 3, p. 501–514, 2014.

MAYELI, N.; MOTAMEDI, H.; HEIDARIZADEH, F. Production of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus axaraqunsis* BIPC01 using Petrochemical Wastewater as Carbon Source. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 643–650, 2015.

MOHAPATRA, S. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus* Strain Isolated from Waste Water and Its Biochemical Characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v 4, n. 16, p. 1-8, 2015.

MOKHTARZADEH, A. et al. Bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 367–384, 2016.

MOORKOTH, D.; NAMPOOTHIRI, K. M. Bioresource Technology Production and characterization of poly (3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 253–260, 2016.

MOTA, M. J. et al. Microorganisms under high pressure - Adaptation, growth and biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1426–1434, 2013.

MUANGWONG, A. et al. Medium chain length polyhydroxyalkanoates consisting primarily of unsaturated 3 - hydroxy - 5 - cis - dodecanoate synthesized by newly isolated bacteria using crude glycerol. **Microbial Cell Factories**, v.15, n. 55, p. 1–17, 2016.

NARANJO, J. M. et al. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38–44, 2013a.

NARANJO, J. M. et al. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38–44, abr. 2013b.

NEIFAR, M. et al. Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. In: Gupta, V. K.; TUOHY, M. G. **Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications**. West Sussex: John Wiley & Son, 2015. p. 736.

NESSNER KAVAMURA, V. et al. Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

NICOLAUS, B. et al. Polysaccharides from extremophilic microorganisms. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 34, n. 1–2, p. 159–169, 2004.

ORDOÑEZ, O. F. et al. Extremophile culture collection from Andean lakes: Extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 3, p. 461–473, 2009.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, v. 4, p. 2, jan. 2008.

OREN, A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. **Environmental Technology**, v. 31, n. 8–9, p. 825–834, 2010.

PAULO, E. M. et al. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 710–714, dez. 2012.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1132–1147, 2009.

PODAR, M.; REYSENBACH, A.-L. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 250–255, 2006.

POLI, A.; ANZELMO, G.; NICOLAUS, B. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1779–1802, 2010.

POWELL, J. T. et al. Desert crust microorganisms, their environment, and human health. **Journal of Arid Environments**, v. 112, p. 127–133, jan. 2015.

PRADOS, E.; MAICAS, S. Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). **Universal Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 23–30, 2016.

RADDADI, N. et al. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 7907–7913, 2015.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2093–8, 1990.

RAVEENDRAN, S. et al. Extremophilic polysaccharide nanoparticles for cancer nanotherapy and evaluation of antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 310–319, 2015.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 2010.

RIBOSOMAL DATABASE PROJECT II. Version 11. Michigan State University, 2014. Software. Disponível em: <http://rdp.cme.msu.edu>. Acesso em: 4 out. 2015.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography A**, v. 445, p. 285–289, jan. 1988.

RIVERA-TERCEROS, P. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 22, n. 8, p. 1–9, 2015.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A. et al. Influence of glycerol on poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50–57, 2015.

ROOHI, A. et al. Isolation and phylogenetic identification of halotolerant/halophilic bacteria from the salt mines of Karak, Pakistan. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 16, n. 3, p. 564–570, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning - A Laboratory Manual. E5. New York: Cold Spring Harbor, 1989. v. 3.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P. Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, 2012.

SARMIENTO, F.; PERALTA, R.; BLAMEY, J. M. Cold and Hot Extremozymes: Industrial

Relevance and Current Trends. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 148, 2015.

SCHLEGEL, H. G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 71, n. 3, p. 283–94, 1970.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–24, 2015.

SHARMA, G. et al. Biologicals *Pseudomonas aeruginosa* biofilm : Potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, p. 1–7, 2013.

SHENG, J.; LING, P.; WANG, F. Constructing a recombinant hyaluronic acid biosynthesis operon and producing food-grade hyaluronic acid in *Lactococcus lactis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 197–206, 2014.

SHI, W. et al. *Anditalea andensis* ANESC-S^T - An alkaliphilic halotolerant bacterium capable of electricity generation under alkaline-saline conditions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.

SHIN, J.-S. et al. Exopolysaccharide fraction from *Pediococcus pentosaceus* KFT18 induces immunostimulatory activity in macrophages and immunosuppressed mice. **Journal of Applied Microbiology**, p. n/a-n/a, 2016.

SILVA, L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 2–7, 2014.

SILVI, S. et al. Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharide. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 10, 2013.

SINDHU, R. et al. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 67–72, set. 2013.

SINGH, G. et al. Optimization of Poly-B-Hydroxybutyrate Production from *Bacillus*

species. **European Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 4, p. 112–116, 2011.

SINGH, G. et al. Cost Effective Production of Poly- β -Hydroxybutyrate by *Bacillus subtilis* NG05 Using Sugar Industry Waste Water. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 441–449, 25 jun. 2013a.

SINGH, M. et al. Production of Polyhydroxyalkanoate Co-polymer by *Bacillus thuringiensis*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 77–83, 2013b.

SIRAJUNNISA, A. R. et al. Optimization, kinetics and antioxidant activity of exopolysaccharide produced from rhizosphere isolate, *Pseudomonas fluorescens* CrN6. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 35–43, 2016.

SOARES, F. L. et al. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2195–2203, 2012.

SPANÒ, A. et al. In Vitro Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from the Marine Thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. **Current Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 518–528, 2016.

SPANÒ, A.; ARENA, A. Bacterial Exopolysaccharide of Shallow Marine Vent Origin as Agent in Counteracting Immune Disorders Induced by Herpes Virus. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 37, n. 3, p. 251–260, 2016.

STOTT, M. B.; TAYLOR, M. W. Microbial ecology research in New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 40, n. 1, p. 12–28, 2016.

SUKAN, A.; ROY, I.; KESHAVARZ, T. Dual production of biopolymers from bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 47–51, 2015.

SURIYAMONGKOL, P. et al. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 148–175, 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, 1 dez. 2013.

TRIPATHI, P. Nitric oxide and the immune response. **Indian Journal of Biochemistry**

Biophysics, v. 44, p. 310–319, 2007.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Acompanhamento de safra**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 10 set. 2016.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Global environment outlook: environment for development (GEO – 4)**. Section B State and – Trends of the Environment: 1987–2007. Malta: Valletta, 2007. 540 p.

UPADHYAY, K. H. et al. Diversity assessment and EPS Production Potential of Cultivable Bacteria from the Samples of Coastal site of Alang. **Journal of Microbiology and Food Sciences**, p. 661–666, 2016.

VALAPPIL, S. P. et al. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 1, p. 1–17, 2006.

VARSHNEY, P. et al. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 363–372, 2015.

VATSA, A. M.; ZAKARI, Y. I.; IGWE, J. C.; ISEGHOHI, F.; AKPA, A. U.; JIBRIN, A. Y.; ABUBAKAR, A. K.; ADAMU, R. Review of anticancer and antioxidant activities of radioresistant extremophiles at molecular level: an itinerary to the discovery of cancer drugs in Nigerian extreme radiation environments. **Nigerian Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 40–47, 2014.

VENTOSA, A. et al. Halophile and Halotolerant Micro-Organisms from Soils. **Microbiology of Extreme Soils**, p. 87–115, 2008.

VENTOSA, A. et al. Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach. **Current Opinion in Microbiology**, v. 25, n. JUNE, p. 80–87, 2015.

VENTOSA, A.; ARAHAL, D. R. Halophily (Halophilism and Halophilic Microorganisms). **Extremophiles**, v. 2, 2011.

VISHNIVETSKAYA, T. A.; KATHARIOU, S.; TIEDJE, J. M. The *Exiguobacterium* genus: Biodiversity and biogeography. **Extremophiles**, v. 13, p. 541–555, 2009.

WANG, G. et al. Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces macrophage activation. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 112–120, 2016.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WIDNER, B. et al. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3747–3752, 2005.

XIE, F. et al. *Pseudomonas kunmingensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from a phosphate mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 559–564, 2014.

YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic Studies on corynneform bacteria. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 431, n. 18, p. 417–431, 1972.

YANG, H. et al. Two Novel Exopolysaccharides from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1: Antioxidation and Effect on Oxidative Stress. **Current Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 298–306, 2015.

YÁÑEZ, J. et al. Biodegradation of tributyltin (TBT) by extremophile bacteria from atacama desert and speciation of tin by-products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, n. 1, p. 126–130, 2015.

YE, S. et al. Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 764–770, 2012.

YE, S. et al. Biosynthesis of selenium rich exopolysaccharide (Se-EPS) by *Pseudomonas* PT-8 and characterization of its antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 230–239, 2016.

YILDIZ, S. Y. et al. Genomic analysis of *Brevibacillus thermoruber* 423 reveals its biotechnological and industrial potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2277–2289, 2015.

YIN, J. et al. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. **Biotechnology Advances**, 2014.

YU, H. et al. A high-throughput screen for hyaluronic acid accumulation in recombinant *Escherichia coli* transformed by libraries of engineered sigma factors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 788–796, 2008.

YUE, H. et al. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 108, 2014.

YUMOTO, I. et al. *Exiguobacterium oxidotolerans* sp. nov., a novel alkaliphile exhibiting high catalase activity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2004, p. 2013–2017, 2004.

ZHANG, B. et al. Inverse metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for xylose utilization based on adaptive evolution and whole-genome sequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 885–896, 2014.

ZHANG, L. et al. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 276–281, 2005.

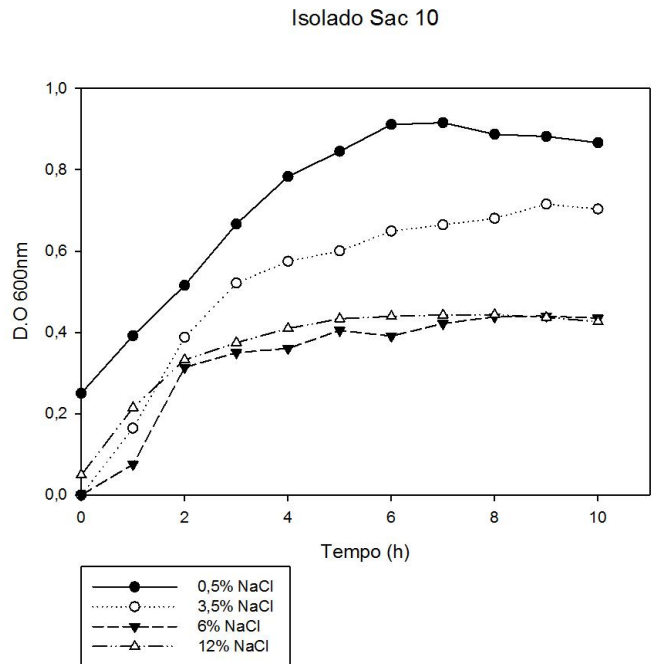
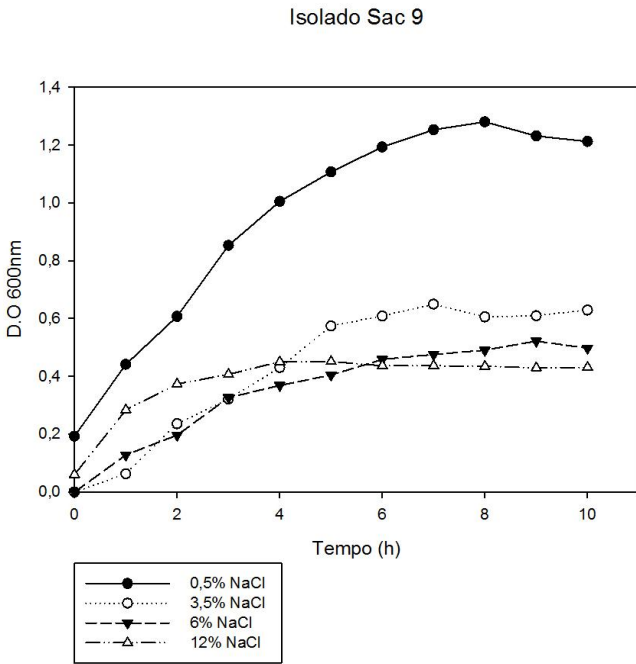
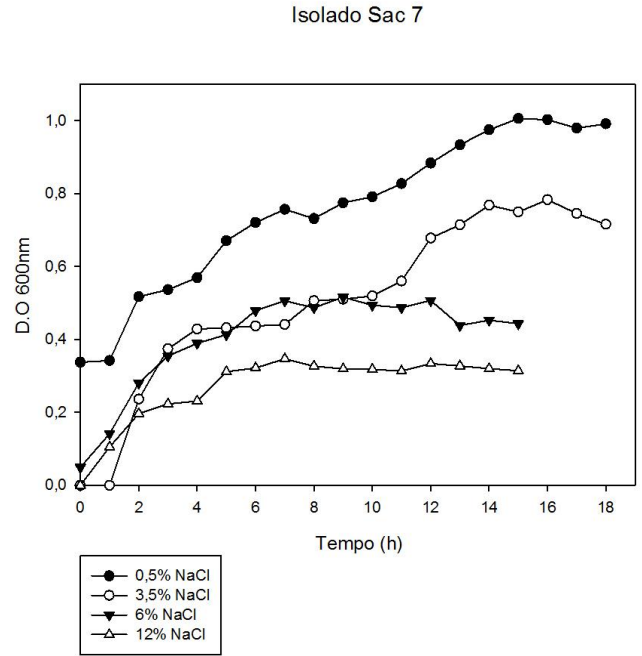
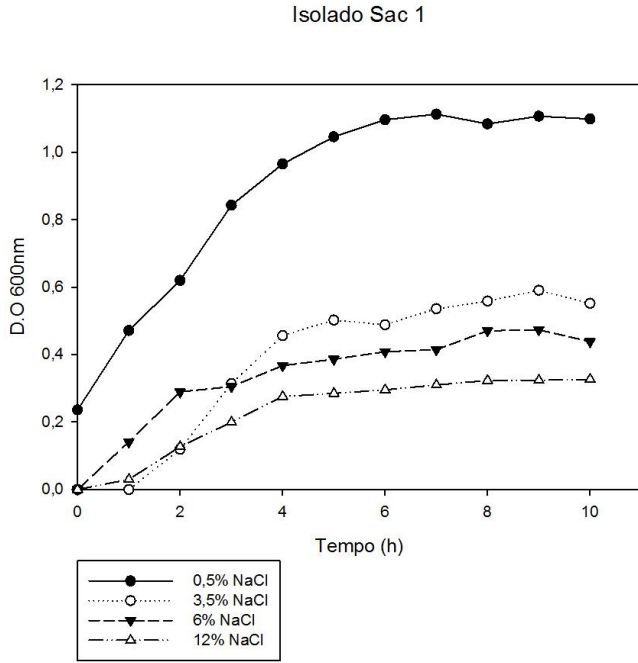
ZHAO, Y. et al. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e92486, 20 mar. 2014.

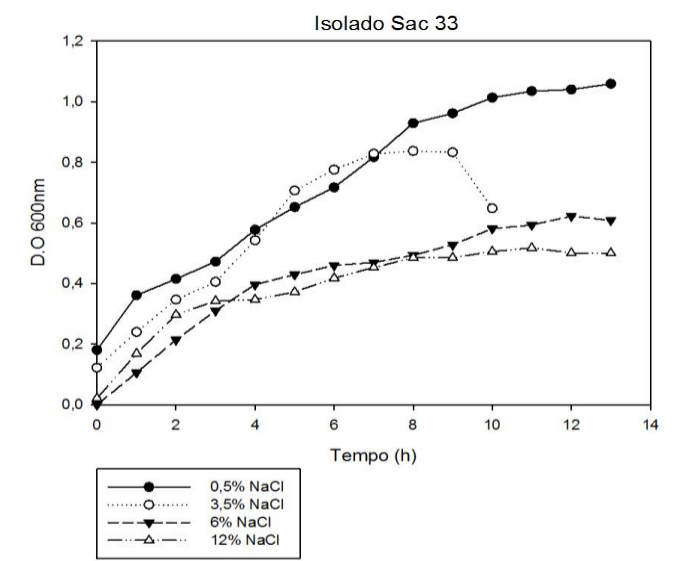
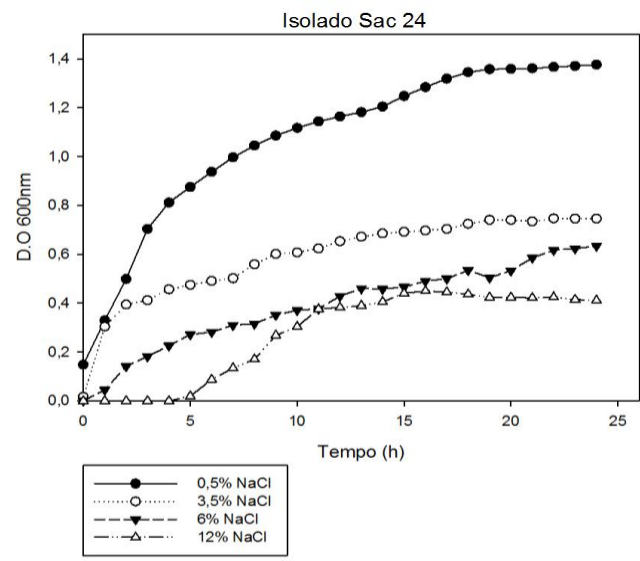
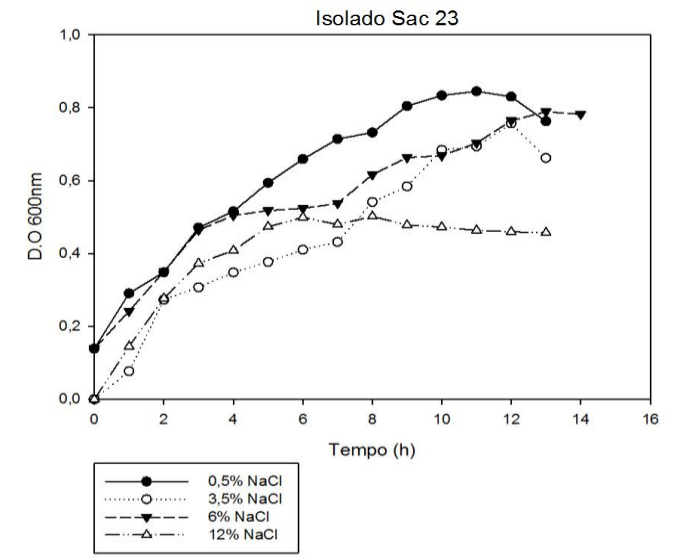
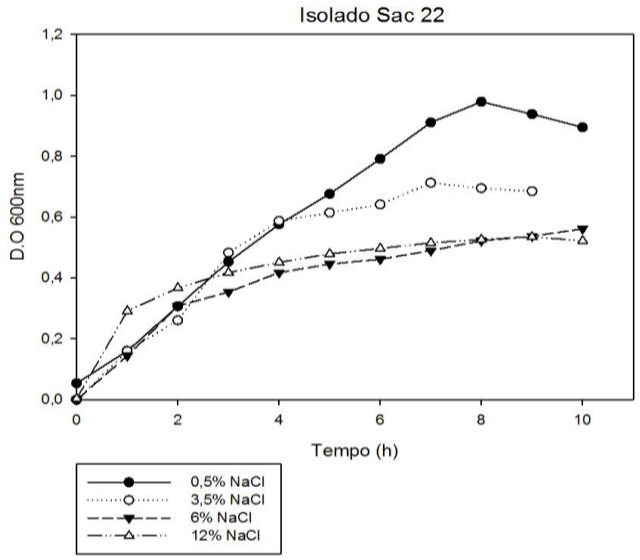
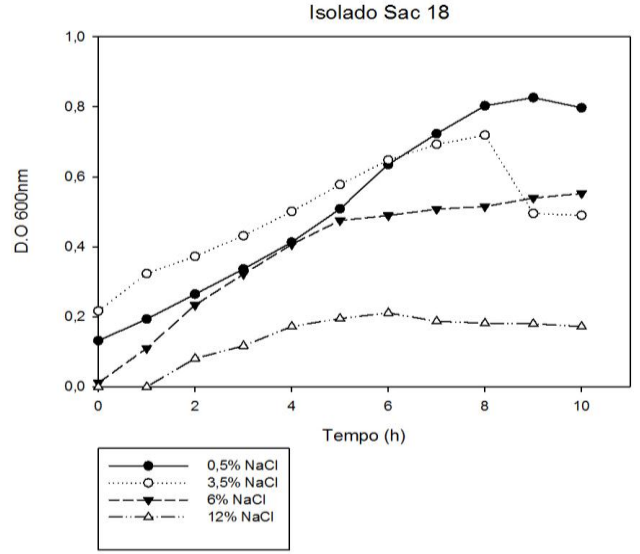
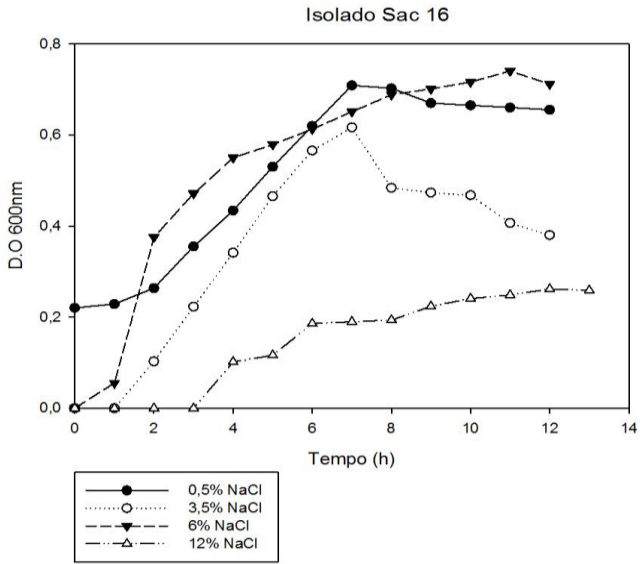
ZHENG, J. et al. Antimicrobial ergosteroids and pyrrole derivatives from halotolerant *Aspergillus flocculosus* PT05-1 cultured in a hypersaline medium. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 963–971, 2013.

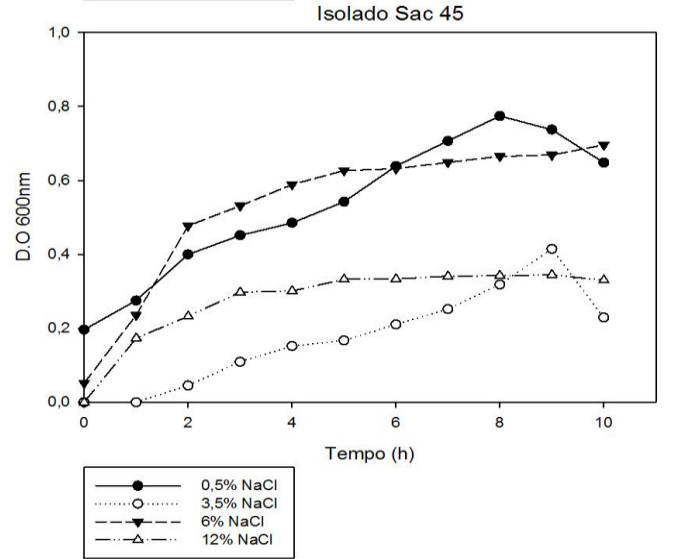
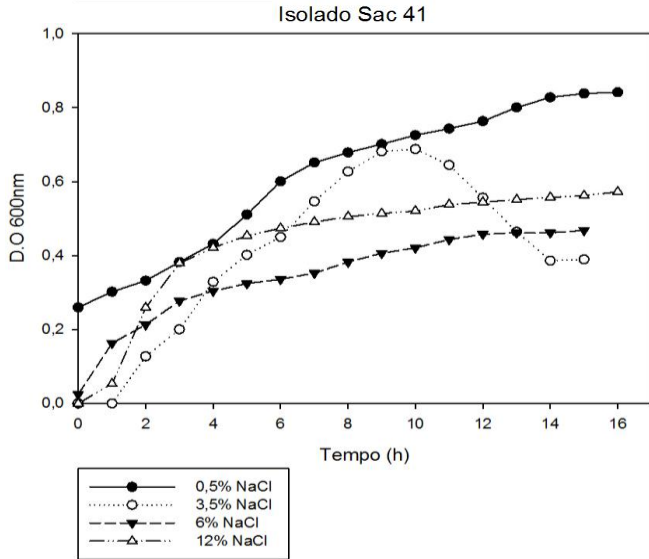
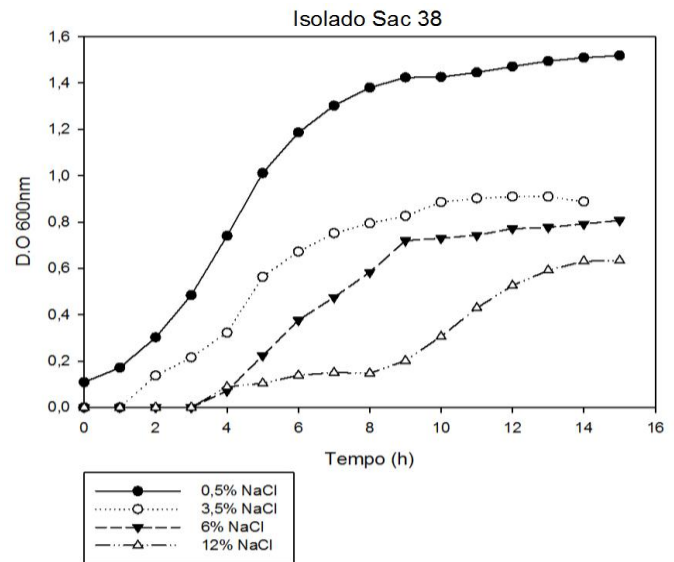
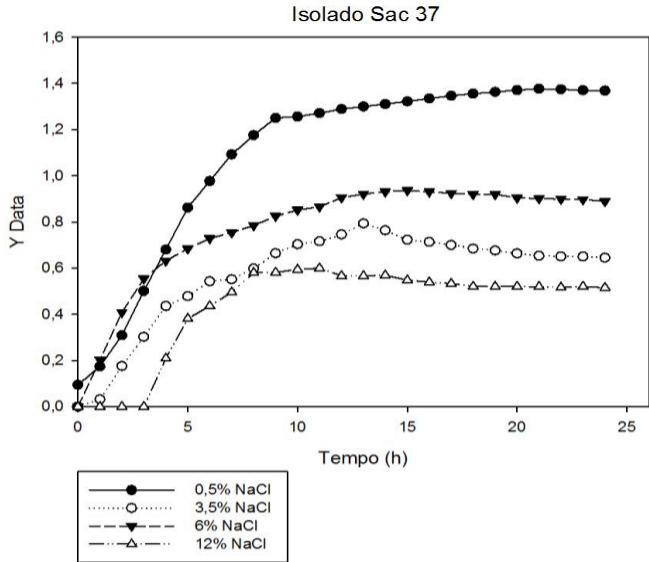
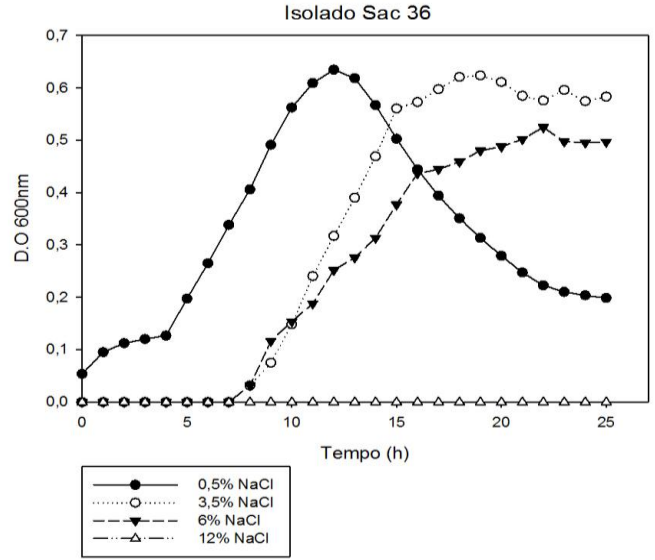
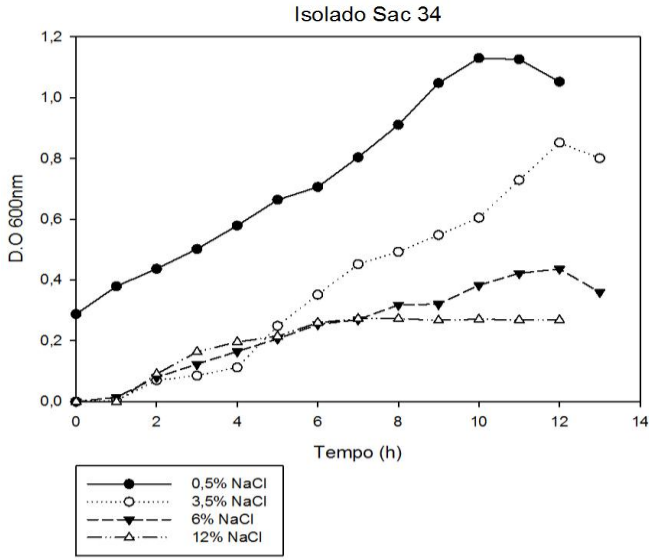
ZHU, D. et al. *Bacillus ectoiniformans* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from deep-sea sediments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 616–622, 2016.

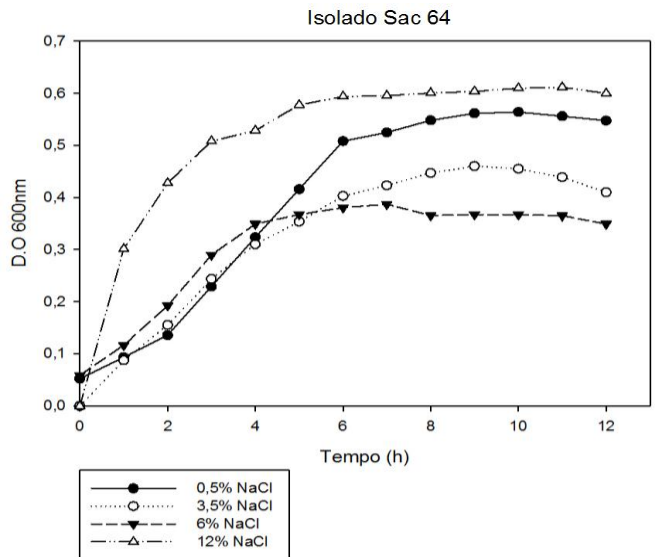
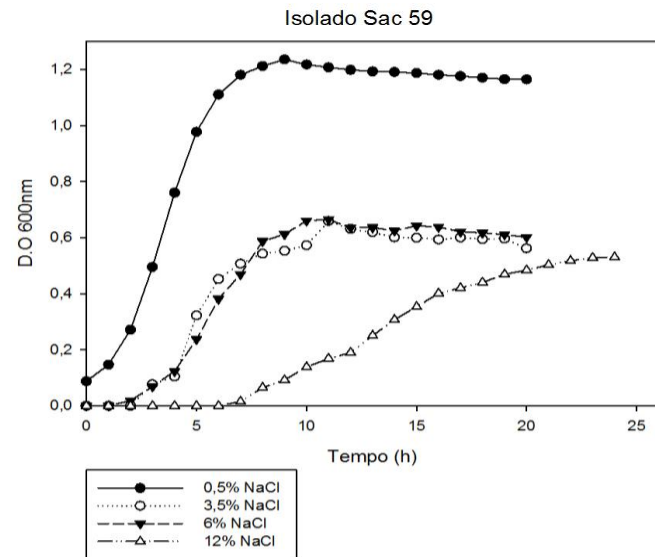
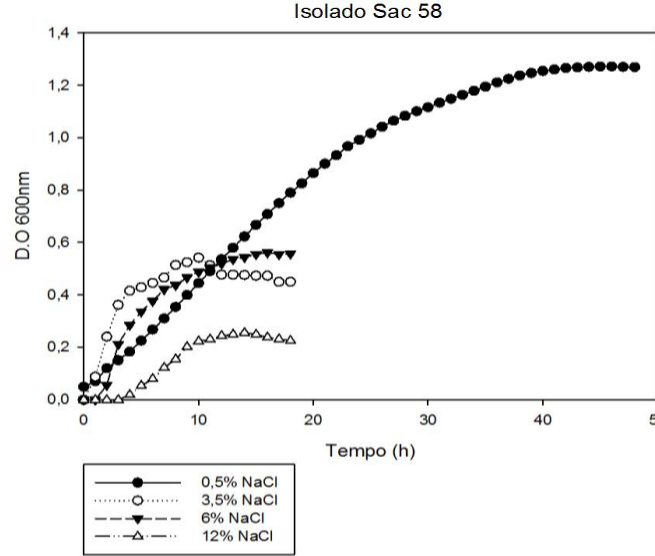
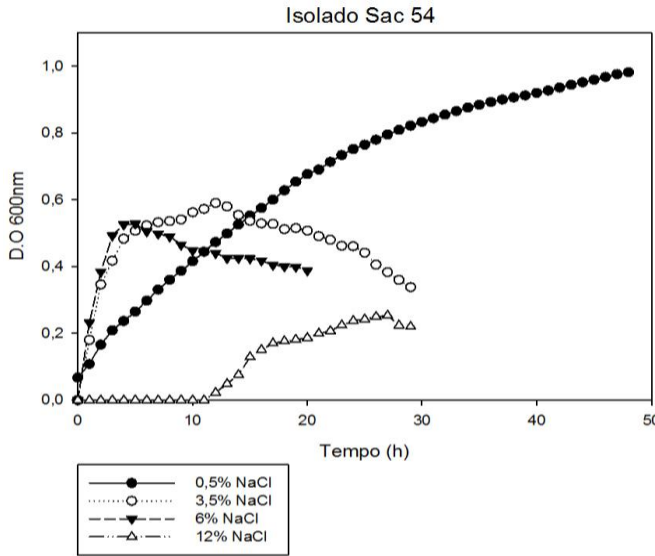
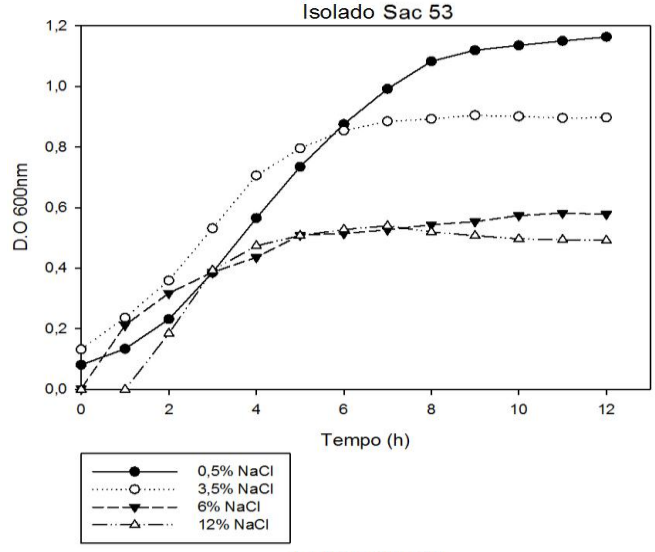
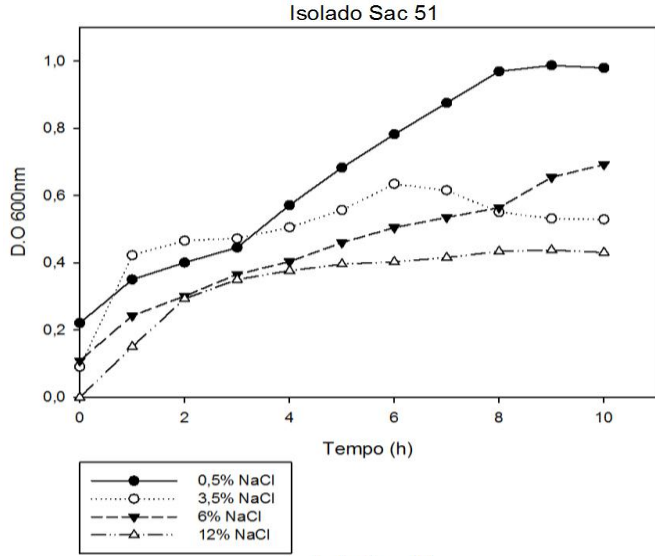
APÊNDICES

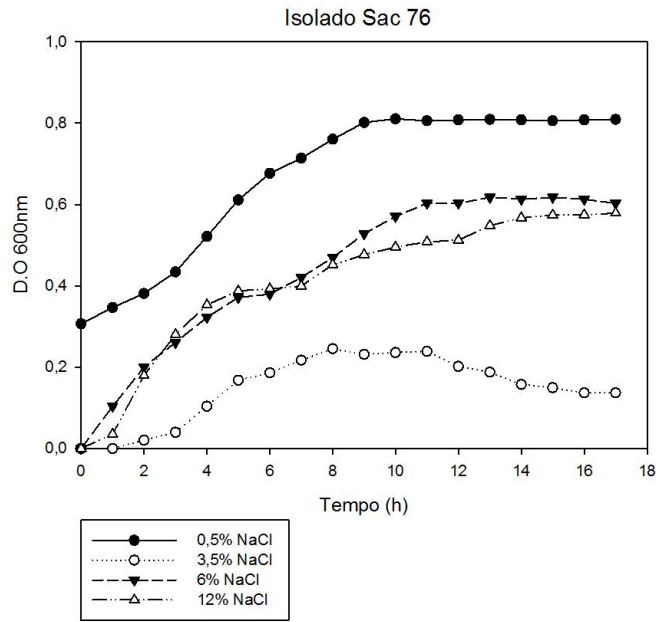
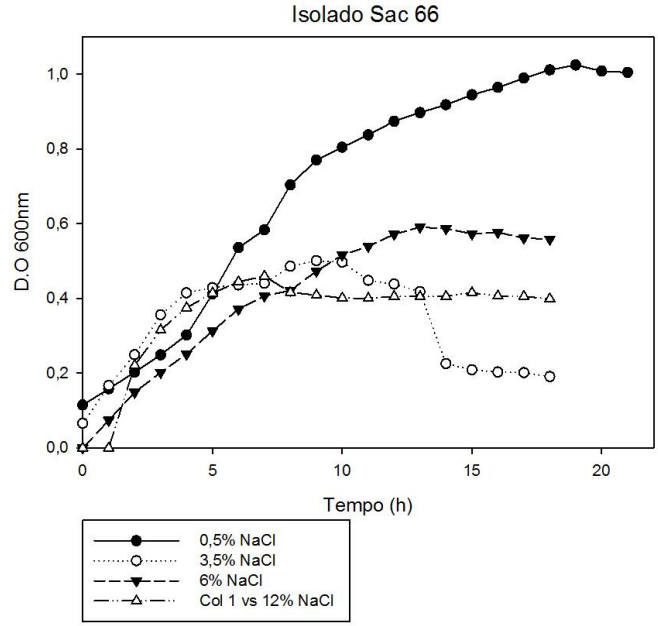
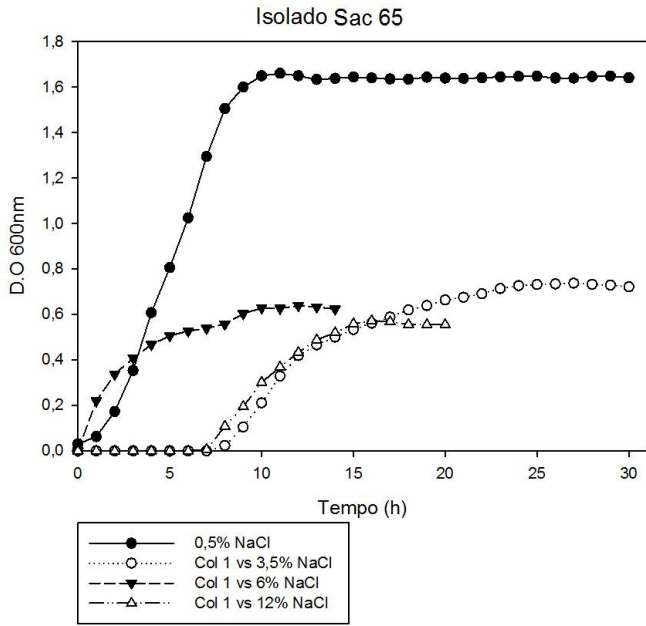
APÊNDICE A - Curvas de crescimento dos isolados da caatinga em meio TSB suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl











APÊNDICE B - Curva padrão de ácido hialurônico

Concentração AH (mg/L)	D.O _{540nm}
0	0,804 ± 0,0
50	0,758 ± 0,1
100	0,681 ± 0,0
200	0,464 ± 0,0
300	0,348 ± 0,0
500	0,273 ± 0,0

