



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



PRISCILLA ANNE CASTRO DE ASSIS

AVALIAÇÃO DOS LIPÍDEOS DE MEMBRANA E DAS ORF'S DOS  
CONTRATRANSPORTADORES  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ASSOCIADOS A MECANISMOS DE  
ADAPTAÇÃO À HALOFILIA EM *Halococcus morrhuae*

JOÃO PESSOA – PB  
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ECOLOGIA



PRISCILLA ANNE CASTRO DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DOS LIPÍDEOS DE MEMBRANA E DAS ORF'S DOS  
CONTRATRANSPORTADORES  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ASSOCIADOS A MECANISMOS DE  
ADAPTAÇÃO À HALOFILIA EM *Halococcus morrhuae***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, como parte integrante dos pré-requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof.Dr. Sávio Torres de Farias  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica B. Rodriguez

JOÃO PESSOA - PB  
2011

A848a Assis, Priscilla Anne Castro de.

**1.1.1.1 Avaliação dos lipídeos de membrana e das ORF's dos contratransportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  associados a mecanismos de adaptação à halofilia em *Halococcus morrhuae* / Priscilla Anne Castro de Assis. - - João Pessoa: [s.n.], 2011.**

*157f. : il.*

*Orientador: Sávio Torres de Farias.*

*Co-Orientadora: Mônica Bucciareli Rodriguez.*

*Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN.*

*1. Genética molecular. 2. ORF's. 3. Halococcus morrhuae.*



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ECOLOGIA



PRISCILLA ANNE CASTRO DE ASSIS

**AVALIAÇÃO DOS LIPÍDEOS DE MEMBRANA E DAS ORF'S DOS  
CONTRATRANSPORTADORES  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ASSOCIADOS A MECANISMOS DE  
ADAPTAÇÃO À HALOFILIA EM *Halococcus morrhuae***

Dissertação de Mestrado avaliada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Sávio Torres de Farias**

Departamento de Biologia Molecular - Orientador

---

**Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo**

Universidade Federal da Paraíba - Examinador Interno

---

**Prof. Dr. Anderson Miyoshi**

Examinador Externo – Universidade Federal de Minas Gerais

---

**Prof. Dr. José Pinto Siqueira Júnior**

Universidade Federal da Paraíba - Suplente

À Deus, aos meus pais, minhas irmãs e à  
Fábio, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus:

Agradeço a Deus, Pai e soberano de minha vida, que sempre me ajudou a realizar os sonhos que planejei, pois Ele me conhece com intimidade e sabe o que me faz feliz. Ele mudou completamente os meus planos, mas acredito que terminei voltando ao meu primeiro amor. Toda a glória para Ele, pois ele é o responsável pela concretização de todos os meus planos de vida.

À minha família:

Deus visita a minha vida todos os dias e acredito que ele use o semblante de quem eu tenho por ser a minha mãe, pois ela é o maior sinônimo de amor que tenho. Minha mãe é minha matriz, é o meu porto-seguro e ela é a responsável por ser quem sou.

Um agradecimento muito especial ao meu pai, que sempre me incentivou nos meus estudos, que sempre desejou o melhor para mim, com certeza, muito mais do que eles mesmos puderam ter. Agradeço todo carinho, amor e dedicação.

As minhas irmãs Cibelle Castro e Thaís Josy pelo companheirismo de todos os momentos, pelo apóio em tudo na vida, o que não foi diferente em relação ao mestrado.

À Fábio Pedrosa por todo amor, carinho, compreensão, cumplicidade e entusiasmo para a conquista de tudo, dentre elas a construção e concretização desse trabalho. Muito obrigada por ter estado tão presente, tão participativo, sempre ao meu lado.

Aos professores:

Muitas pessoas passaram pela minha vida, mas poucas deixaram marcas por atitudes imprescindíveis como o meu orientador Sávio Torres. Muito obrigada pela oportunidade de aprender tantas coisas, por toda força, incentivo, atenção e, principalmente, confiança.

Ao professor Mário Vasconcellos pelo carinho de tantos anos, obrigada por desejar contribuir sempre para a melhora do meu trabalho. Muito obrigada pela confiança de sempre e pela amizade.

Agradeço ao Professor Demétrius pelo uso de equipamentos e reagentes do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia. Como também gostaria de agradecer ao Professor Siqueira pelo uso do Laboratório Genética de Microrganismo (LGM).

Ao coordenador do Laboratório de Produtos Naturais II, o Professor Dr. Marcelo Sobral pelo apoio na utilização de equipamentos do laboratório para a caracterização dos lipídios e pigmentos de membrana.

Às Coordenações:

Gostaria de agradecer a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular por todos os incentivos, pela oportunidade de fazer um mestrado com professores maravilhosos.

À Coordenação do Curso de licenciatura em Biologia à Distância por todo apoio, compreensão e por ter me liberado para fazer uma parte experimental do mestrado em Belo Horizonte.

Aos amigos:

Meu muito obrigada aos meus amigos do LGM e Labime I, por serem pessoas muito boas para se conviver, conversar, rir e compartilhar os aperreios dos experimentos. Valeu pela companhia: Jú, Ari, Janaína, Danilo, Tarcísio e Maíra.

Algumas pessoas foram decisivas para a realização desse projeto, pois me ajudaram e me ensinaram muito. Desculpe-me pelas inexperiências e por tantas dúvidas, Tia Cris e Itácio Padilha.

Os meus sinceros agradecimentos a Galeto (Thiago) por toda ajuda para realização dos meus experimentos, pois foi decisiva para que eu pudesse realizá-los. Entretanto, o meu maior presente foi a sua companhia, força e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, Fábio, Júnior, Natália, Suervy, Saulo, Wagner e Edilson, muito obrigada por todo apoio com os experimentos de cromatografia, mas o meu muito obrigada é pela amizade, mesmo.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, incluindo o Professor Luis Fernando, por todo apoio ao longo do mestrado. Um agradecimento especial a minha amiga Helena Neta por todo companheirismo, alegria e amizade.

Agradeço também a Isis e Sócrates Golzio pela oportunidade de aprender metodologias novas, pela paciência de ensiná-las e por todo apoio com a extração dos lipídios.

Agradeço à Capes pelo auxílio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

## RESUMO

A salinização do solo é um dos principais fatores para redução do crescimento das plantas e, conseqüentemente, da sua produtividade agrícola. A maioria dos estudos presentes na literatura apresenta como estratégia para redução dos seus efeitos o melhoramento da tolerância a sal pelas plantas pela produção de osmólitos e proteínas de estresse, existindo poucos estudos visando o aumento da tolerância ao sal pelo restabelecimento da homeostase iônica. Neste trabalho foi proposto compreender mecanismos fisiológicos e estruturais relacionados com a adaptação à halofilia em *Halococcus morrhuae*. O crescimento de *H. morrhuae* foi significativo no meio para halobactérias, organiza-se na forma de sarcinas de diferentes tamanhos ao longo do tempo. Os resultados alcançados na tentativa de caracterização de lipídios da membrana da halobactéria, de acordo com os valores de tempo de retenção, correspondem ao ácido fosfatídico (PA) e fosfatidilglicerol (C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub>)(PG), e ao glicolipídio conhecido como diglicosilarqueol (DGA-1). Adicionalmente, os padrões de quebras dos ácidos graxos extraídos de *Halococcus morrhuae* apresentaram uma similaridade significativa quando comparada com a dos ácidos graxos encontrados em organismos do domínio *Eucarya* e *Bacteria*. Os genes dos antiportes Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> e Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> aumentaram a tolerância ao sal, mostrando-se funcionais após expressão em *Escherichia coli* DH5α em meio sólido e em meio líquido. O antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> apresentou uma atividade estatisticamente mais significativa (p<0,03) quando comparada ao crescimento dos clones contendo o antiporte Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2</sup> (p<0,05). Entretanto, ambos os antiportes são candidatos interessantes para a construção de plantas geneticamente modificadas tolerantes a salinidade. Estes dados também contribuem para o entendimento da fisiologia de *H. morrhuae* para futuras aplicações biotecnológicas, dentre elas a inserção desses genes em plantas para avaliar a funcionalidade em modelos eucarióticos.

**Palavras-chave:** Genética molecular; ORF's; *Halococcus morrhuae*.

## ABSTRACT

Soil salinity is a major factor in reducing plant growth and, consequently, their agricultural productivity. Most of the studies in the literature presents a strategy for reducing the effects of improving salt tolerance in plants for the production of osmolytes and stress proteins, and there are few studies aimed at increasing salt tolerance by restoring ionic homeostasis. This work was proposed to understand the physiological mechanisms and structural related with adjustment in the halophyte *Halococcus morrhuae*. This showed significant growth in the medium to halobacterias, that are organized in the form of sarcina of different sizes. The results achieved in attempts to characterize the lipid membrane halobacteria according to the values of retention time corresponding to phosphatidic acid (PA) and phosphatidylglycerol (C20-C20) (PG), and glycolipid known as Diglicosilarqueol (DGA-1 ). Additionally, patterns of breaks fatty acids extracted from *Halococcus morrhuae* showed a significant similarity when compared with the fatty acids found in organisms of the domain *Eucarya* and *Bacteria*. The genes of the antiport  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  proved functional after cloning in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in solid and liquid medium. The antiport  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  activity showed a statistically more significant when compared to the growth of clones containing the antiport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , making it interesting for the construction of transgenic plants tolerant to salinity. These database contribute to understanding the physiology of *Halococcus morrhuae* for future biotechnological applications, among them the inclusion of these genes in plants to assess the functionality in eukaryotic models.

**Key-words:** molecular genetic; ORF's; *Halococcus morrhuae*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa de degradação mundial de solo.....	27
<b>Figura 2</b> – Mapa de desertificação do nordeste brasileiro.....	28
<b>Figura 3</b> – Ilustrações de solos salinizados.....	29
<b>Figura 4</b> – Terras irrigadas danificadas pela salinização no mundo.....	30
<b>Figura 5</b> – Efeitos do sal no crescimento de plantas de trigo cultivadas em diferentes concentrações de sal.....	32
<b>Figura 6</b> – Espécies reativas de oxigênio em plantas sob estresse salino.....	34
<b>Figura 7</b> – Mecanismos de balanço osmótico em plantas sob estresse salino.....	38
<b>Figura 8</b> -Árvore filogenética universal em forma de raiz mostrando os três domínios	40
<b>Figura 9</b> – Árvore filogenética do domínio <i>Bacteria</i> proposta por Woese.....	41
<b>Figura 10</b> – Árvore filogenética do domínio <i>Bacteria</i> proposta por Hungenholtz.....	42
<b>Figura 11</b> – Árvore filogenética do domínio <i>Bacteria</i> proposta por Raapé e Giovannoni.....	43
<b>Figura 12</b> – Taxonomia do Domínio <i>Archaea</i> .....	45
<b>Figura 13</b> – Estruturas das forma B e Z do DNA.....	48
<b>Figura 14</b> – Diferenças na estrutura de membrana entre os Domínios <i>Bacteria</i> e <i>Eucarya</i> .....	49
<b>Figura 15</b> – Estrutura de lipídios neutros isoprenóides de arqueias halofílicas extremas.....	50
<b>Figura 16</b> – Estrutura química básica de lipídios de membrana em microrganismos dos três domínios da vida.....	51
<b>Figura 17</b> – Estrutura tridimensional da bacteriorodopsina.....	52
<b>Figura 18</b> – Medidas de comprimento da câmara de Neubauer (A) com os agregados de <i>Hc. morrhuae</i> durante a curva de crescimento.....	58
<b>Figura 19</b> Sistema de refluxo usado no processo de extração lipídica de <i>H. morrhuae</i> .....	59
<b>Figura 20</b> - Coluna de sílica gel utilizada na separação dos lipídios e pigmentos de <i>H. morrhuae</i> (A) e detalhe do extrato bruto alaranjado (B).....	61
<b>Figura 21</b> – Concentração das frações obtidas na cromatografia em coluna de sílica gel em rotaevaporador.....	62
<b>Figura 22</b> – Mapa genético do plasmídeo pBluescript SK(-).....	67

<b>Figura 23</b> – Esquema das placas contendo transformantes crescidos em 6% de cloreto de sódio e cultivados sem diluições e com diluições de 100(10 <sup>-2</sup> ), 10.000(10 <sup>-4</sup> ) e de 1.000.000(10 <sup>-6</sup> ) vezes.....	71
<b>Figura 24</b> –Mapa genético do vetor pJET 1.2.....	74
<b>Figura 25</b> – Crescimento de <i>Halococcus morrhuae</i> em meio de cultura ATCC112(A) e em meio líquido (B).....	78
<b>Figura 26</b> – Fotomicrografia de <i>Halococcus morrhuae</i> organizada em diversos agregados.....	79
<b>Figura 27</b> – Imagens de <i>Halococcus morrhuae</i> por técnicas de microscopia ótica de luz(A), microscopia de contraste de fase(B) e imagens de <i>Halococcus thailandensis</i> por microscopia eletrônica de varredura(C).....	80
<b>Figura 28</b> – Estrutura química dos possíveis lipídios relacionados aos valores de Rf encontrados neste estudo.....	86
<b>Figura 29</b> – Cromatograma do Extrato 1 de <i>Halococcus morrhuae</i> .....	87
<b>Figura 30</b> - Quebras moleculares relativas da molécula 1 da amostra 1.....	88
<b>Figura 31</b> – Padrões de quebras moleculares de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	89
<b>Figura 32</b> – Quebras moleculares relativas à molécula 2 da amostra 1.....	89
<b>Figura 33</b> – Similaridades das fragmentações do pico 2 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	90
<b>Figura 34</b> – Quebras moleculares relativas à molécula 3 da amostra 1.....	91
<b>Figura 35</b> – Similaridades das fragmentações do pico 3 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	92
<b>Figura 36</b> – Quebras moleculares relativas à molécula 4 da amostra 1.....	93
<b>Figura 37</b> – Similaridades das fragmentações do pico 4 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	93
<b>Figura 38</b> – Quebras moleculares relativas à molécula 5 da amostra 1.....	94
<b>Figura 39</b> – Similaridades das fragmentações do pico 5 com a do 2-oxo-ácido nonanóico.....	94
<b>Figura 40</b> - Cromatograma do extrato 2 de <i>Halococcus morrhuae</i> .....	95
<b>Figura 41</b> – Quebras moleculares relativas do pico 1 da amostra 2.....	96
<b>Figura 42</b> – Similaridades das fragmentações do pico 1 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	96
<b>Figura 43</b> – Quebras moleculares relativas ao pico 2 da amostra 2.....	97

<b>Figura 44</b> – Similaridades das fragmentações do pico 2 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	98
<b>Figura 45</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 3 da amostra 2.....	99
<b>Figura 46</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 4 da amostra 2.....	100
<b>Figura 47</b> - Quebras moleculares relativas da molécula 5 da amostra 2.....	100
<b>Figura 48</b> – Similaridades das fragmentações do pico 5 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	100
<b>Figura 49</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 6 da amostra 2.....	101
<b>Figura 50</b> – Similaridades das fragmentações do pico 6 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	101
<b>Figura 51</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 7 da amostra 2.....	102
<b>Figura 52</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 9 da amostra 2.....	102
<b>Figura 53</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 10 da amostra 2.....	102
<b>Figura 54</b> – Quebras moleculares relativas da molécula 8 da amostra 2.....	103
<b>Figura 55</b> – Similaridades das fragmentações do pico 8 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS.....	103
<b>Figura 56</b> – Espectro de RMN 1H da fração 1.....	106
<b>Figura 57</b> – Espectro de RMN 1H da fração 2.....	107
<b>Figura 58</b> – Crescimento de linhagens de <i>E.coli</i> transformadas por eletroporação....	110
<b>Figura 59</b> – DNA de <i>Halococcus morrhuae</i> extraído pelo método CTAB.....	110
<b>Figura 60</b> – Excisão da faixa leve e pesada do DNA digerido de <i>H. morrhuae</i> .....	111
<b>Figura 61</b> – Digestão do plasmídeo pBluescript com EcoRI.....	112
<b>Figura 62</b> – Colônias de <i>E.coli</i> transformadas com o vetor pBluescript.....	113
<b>Figura 63</b> - Placa do controle mostrando o crescimento de transformantes.....	114
<b>Figura 64</b> – Gel com plasmídios extraídos por Miniprep.....	114
<b>Figura 65</b> – Bandas de DNA após amplificação com primers de <i>Haloferax volcanii</i> .....	115
<b>Figura 66</b> – Transformantes contendo o inserto ligado ao vetor pJET.....	116

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Extensão de áreas afetadas pela salinização.....	30
<b>Tabela 2</b> – Categorias de microrganismos halofílicos.....	47
<b>Tabela 3</b> – Composição química da parede celular de <i>Halococcus morrhuae</i> .....	53
<b>Tabela 4</b> – Correlação dos tamanhos dos agregados com as marcações presentes na câmara de Neubauer.....	58
<b>Tabela 5</b> – Tempo de retenção e porcentagem na amostra 1 de cada molécula detectada pelo CG-MS.....	88
<b>Tabela 6</b> – Tempo de retenção e porcentagem na amostra 2 de cada molécula detectada pelo CG-MS.....	95
<b>Tabela 7</b> – Padrão de crescimento dos recombinantes.....	117
<b>Tabela 8</b> – Análises estatísticas do crescimento da linhagem DH5 $\alpha$ .....	120
<b>Tabela 9</b> – Análises estatísticas do crescimento dos recombinantes contendo o antiporte Anti Na <sup>1</sup> .....	122
<b>Tabela 10</b> – Análises estatísticas do crescimento dos recombinantes contendo o antiporte Anti 5.....	124

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Curva de crescimento de <i>Halococcus morrhuae</i> tendo como variáveis a densidade ótica e o tempo.....	81
<b>Gráfico 2</b> – Curva de crescimento de <i>Halococcus morrhuae</i> com linhas coloridas interligando o valor de densidade ótica com o tempo correspondente.....	83
<b>Gráfico 3</b> – Número e tamanho de sarcinas ao longo da curva de crescimento.....	84
<b>Gráfico 4</b> – Curvas de crescimento de DH5 $\alpha$ não-transformada em diferentes condições de cultivo.....	119
<b>Gráfico 5</b> – Curvas de crescimento dos recombinantes contendo Antiporte Anti Na <sup>1</sup> .....	121
<b>Gráfico 6</b> – Curvas de crescimento dos recombinantes contendo o Antiporte Anti 5..	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APX** – Peroxidase do ascorbato
- ATCC** - *American Type Culture Collection*
- CAT** - Catalase
- CIP**- *Calf intestinal phosphatase*
- CTAB**- Cetyltrimethyl ammonium bromide
- DHAR** – Desidroascorbato
- DGA-1**-Diglicosilarqueol
- DNA**- Ácido desoxirribonucléico
- DBM** – Departamento de Biologia Molecular
- D.O**- Densidade ótica
- EDTA**- *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ERO**- Espécies reativas de oxigênio
- FAO**- *Food and agriculture organization of the United Nations*
- GR**-Redutase da glutationa
- Ha** –hectare
- HSPs**- *Heat shock proteins*
- HM**- Halobacterium medium
- INCQS**- Instituto nacional de controle de qualidade em saúde
- IPTG**- Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
- LABIME** – Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia
- LB**- Meio Luria-Bertani
- LEA**- *Late embryogenesis abundant*
- MAPK**- *mitogen activated protein kinase*
- MC1061**- Linhagem de *Escherichia coli*
- MDHAR** – *redutase do monodesidroascorbato*
- NA**- Meio nutriente ágar
- NIST**- *National Institute of Standards and technology*
- ONU** – Organização das Nações Unidas
- ORF** – *Open Read Frame*
- pBS**- Plasmídeo pBlueScript
- PA**- Ácido fosfatídico
- PG**- Fosfatidilglicerol

**PGP-Me-** Arquetidilglicerol-metilfosfato

**POX** – Peroxidase não- específica

**pUC-** Plasmídeo criado pela Universidade da Califórnia

**RNA-** Ácido ribonucléico

**RMN-**Ressonância magnética nuclear

**RPM-** Rotações por minuto

**SDS-** Dodecil sulfato de sódio

**SOC-** Super ótimo caldo com repressor catabólico

**SOD-** Dismutase do superóxido

**SOS-** *Salt overlay sensitive*

**SOS1-** *Salt overlay sensitive 1*

**SSSA** – *Soil science society of America*

**S-TeGA-** Tetraglicosilarqueol

**S-TGA 1-** Triglicosilarqueol-sulfatado

**TGA 1-** Triglicosilarqueol- não sulfatado

**TE-** Tampão de extração

**XL1/Blue-** Linhagem de *Escherichia coli*

**UFC-**Unidades formadoras de colônias

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>25</b>
3.1 SOLO.....	25
3.2 QUALIDADE DO SOLO E SALINIZAÇÃO.....	26
3.3 A SALINIZAÇÃO NO MUNDO.....	29
3.4 SALINIZAÇÃO E SEUS EFEITOS PARA AS PLANTAS.....	31
3.5 SALINIZAÇÃO E OS MECANISMOS ADAPTATIVOS DAS PLANTAS.....	35
3.6 O MELHORAMENTO GENÉTICO E SALINIDADE.....	36
3.7 PROTEÍNAS ANTIPORTES E PLANTAS TOLERANTES À SAL.....	37
3.8 DOMÍNIOS DA VIDA E DIVERSIDADE.....	39
3.8.1 Archaea e Organismos halófilos.....	44
3.8.1.1 Organismos halófilos e suas características.....	46
3.8.1.1.1 <i>Halococcus morrhuae</i> .....	52
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE <i>Halococcus morrhuae</i> .....	55
4.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Halococcus morrhuae</i> .....	57
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Halococcus morrhuae</i> ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA DE LUZ E DE CONTRASTE DE FASE.....	57
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO CULTIVO AO LONGO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	57
4.5 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS E PIGMENTOS DA ARQUEIA <i>H.morrhuae</i> E SUA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	59
4.5.1 Esterificação do extrato lipídico de <i>H.morrhuae</i> para injeção no cromatografo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas.....	60
4.5.2 Fracionamento e purificação do extrato lipídico de <i>Halococcus morrhuae</i> por cromatografia líquida em coluna de sílica.....	61
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>Halococcus morrhuae</i> .....	62

4.7 PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS COM O VETOR BLUESCRIPT.....	63
4.7.1 Preparo de células eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> linhagem MC1061 e XL1-Blue.....	63
4.7.2 Caracterização do crescimento da linhagem MC1061, XL1-Blue e DH5 $\alpha$ de <i>Escherichia coli</i> nas diferentes concentrações de cloreto de sódio.....	64
4.7.3 Digestão parcial do DNA de <i>H. morrhuae</i> com a enzima de restrição EcoRI.....	65
4.7.4 Eletroforese unidimensional.....	65
4.7.5 Excisão e purificação das bandas de 1,5-2Kb e 2-4Kb de <i>H. morrhuae</i> em gel de agarose.....	66
4.7.6 Digestão do vetor com enzima de restrição EcoRI.....	67
4.7.7 Isolamento e purificação do plasmídio linearizado através do gel de agarose.....	67
4.7.8 Teste para avaliar se o vetor pBS estava linearizado.....	67
4.7.9 Tratamento do vetor com fosfatase alcalina.....	68
4.7.10 Teste para avaliar a desfosforilação do vetor pBS.....	68
4.7.11 Ligação do DNA de <i>H. morrhuae</i> ao vetor pBluescript.....	69
4.7.12 Transformação das células eletrocompetentes com plasmídio pBluescript contendo inserto de <i>Halococcus morrhuae</i> .....	69
4.7.13 Teste para avaliar eficiência da transforma�o.....	70
4.8 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM INSERTO DE <i>H. morrhuae</i> CAPAZES DE CRESCER EM 6% DE CLORETO DE SÓDIO.....	69
4.9 CONFIRMA�O DA PRESENÇA DO INSERTO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EXTRA�O DE DNA PLASMIDIAL-MINIPREP.....	71
4.10 PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA A CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O VETOR pJET.....	72
4.10.1 Preparo de células quimiocompetentes de <i>E.coli</i> linhagem DH5 $\alpha$ .....	72
4.10.2 Amplifica�o do gene dos antiportes Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> e Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> e visualiza�o em gel de agarose.....	72
4.10.3 Purifica�o dos produtos de PCR dos primers dos antiportes.....	73
4.10.4 Clonagem dos produtos de PCR no vetor pJET.....	73
4.10.4.1 Rea�o de corte de produtos de PCR em extremidades cegas.....	73
4.10.4.2 Liga�o dos produtos de PCR ao vetor pJET 1.2.....	73

4.10.5	Transformação por choque térmico.....	74
4.10.6	Teste para avaliar eficiência da transformação.....	75
4.11	ANÁLISES DA FUNCIONALIDADE DOS GENES INSERIDOS EM <i>Escherichia coli</i> .....	75
4.11.1	Análises da funcionalidade em meio de cultura sólido.....	75
4.11.2	Análises da funcionalidade em meio de cultura líquido.....	75
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
5.1	MEIOS DE CULTURA E CRESCIMENTO DE <i>Halococcus morrhuae</i> .....	77
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE E MICROSCOPIA ÓTICA DE LUZ.....	78
5.3	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Halococcus morrhuae</i> .....	80
5.3.1	Tempo de geração de <i>Halococcus morrhuae</i> .....	82
5.4	ANÁLISE DO GRAU DE AGREGAÇÃO DAS SARCINAS DE <i>Halococcus morrhuae</i> AO LONGO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	83
5.5	EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS E PIGMENTOS DA ARQUEIA <i>Halococcus morrhuae</i> E SUA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	85
5.5.1	Análises dos extratos lipídicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	87
5.6	FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LIPÍDIOS DE <i>Halococcus morrhuae</i> POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	105
5.7	CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LINHAGEM MC1061, XL1-BLUE E DH5 $\alpha$ DE <i>Escherichia coli</i> NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.....	108
5.8	BIBLIOTECAS GENÔMICAS CONSTRUÍDAS COM O VETOR BLUESCRIPT.....	109
5.9	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE GENES DE <i>Halococcus morrhuae</i> EM <i>E.coli</i> .....	115
5.9.1	Análises da funcionalidade em meio sólido de cultura.....	117
5.9.2	Análise da funcionalidade em meio líquido de cultura.....	118
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>127</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>128</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>142</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, é crescente a preocupação da humanidade com as condições ambientais do planeta, e dentre os principais focos, está o solo. A camada superficial da terra constitui um recurso natural vital para a manutenção da vida, e em particular, por interferir diretamente na base de toda a cadeia alimentar. No entanto, para que o solo consiga realizar as suas inúmeras funções é necessário que o mesmo apresente uma boa qualidade e, nos últimos anos, a degradação do mesmo tem aumentado devido ao uso inadequado dos recursos naturais, de insumos e de práticas agrícolas impróprias (SSSA, 2011).

Inúmeros fatores estão associados com essa degradação do solo, o que pode ser originado por razões naturais e/ou antrópicas. Há vários fatores que diminuem a qualidade do solo, que pode estar associada à mudanças nas propriedades químicas é chamada de degradação química. Como exemplo, pode-se citar a concentração excessiva de sais no mesmo, interferindo na sua estrutura, diminuindo a sua porosidade e, portanto, na permeabilidade à entrada de água e de oxigênio (SANTOS *et al.*, 1998).

Atualmente, a salinidade é reconhecida como um dos principais problemas da agricultura mundial, sendo mais evidente em regiões áridas ou semiáridas do globo. Estudos realizados em 1978 já demonstravam que a degradação do solo afetava cerca de 35% da superfície do planeta (MABBUTT, 1978) e estimava-se que 0,3% a 0,5% (de 4 milhões a 7 milhões de hectares) das terras produtivas do mundo estavam sendo retiradas da produção anualmente (FAO, 1983).

No Brasil, a porcentagem de solos naturalmente afetados com a salinidade se aproxima de 10%, ou seja, por volta de 86 milhões de hectares. Sendo estes localizados principalmente em áreas secas, onde o índice pluviométrico fica abaixo de 1.000 mm/ano. Por outro lado, dentre a área total de terras irrigadas no Brasil essa porcentagem está em torno de 2%, o que representa 15.000 hectares, sendo grande parte localizada na região nordeste do país, o que leva a expansão das áreas desertificadas sem uma produção agrícola significativa pela infertilidade de seus solos (FAO, 2010).

A salinidade desses solos causa perdas nas produções agrícolas da ordem de bilhões de dólares por ano. Os prejuízos, em dólares, de cultivos em áreas salinizadas estão calculados em US\$ 250/ha, aproximadamente, podendo totalizar US\$ 11 milhões (FAO, 2010).

Uma das possíveis soluções para o problema da salinização é a utilização de práticas de manejo de solo com o objetivo de reduzir ao máximo a salinidade, melhorando o solo para o desenvolvimento e crescimento das plantas, a partir de projetos de irrigação e drenagem destes. Entretanto, a recuperação de solos envolve grandes investimentos, além do tempo exigido para suas execuções (PRISCO, 1987; GHEYI, 2000). A outra forma de minimizar os problemas da salinidade seria através da produção de culturas geneticamente modificadas que possam manter sua produção de forma satisfatória mesmo sob condições de salinidade, sendo esta a alternativa a mais viável. (GHEYI, 2000).

Tradicionalmente, plantas têm sido melhoradas pela seleção natural durante vários ciclos, mas um desafio enfrentado por esta técnica está no fato de que se a resistência natural para uma característica específica não existir ou não aparecer, as técnicas de melhoramento clássico não poderão criá-la. Desta forma, uma boa alternativa seria a transferência e expressão de genes heterólogos em plantas, isto é, a construção das chamadas plantas transgênicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender alguns mecanismos fisiológicos e estruturais relacionados com a adaptação à halofilia em *Halococcus morrhuae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar parâmetros de crescimento em meio líquido para otimizar e planejar os experimentos com esta halobactéria;
- Avaliar a sua susceptibilidade a antimicrobianos de diferentes classes e com diferentes mecanismos de ação;
- Identificar lipídios da membrana de *Halococcus morrhuae*;
- Identificar genes envolvidos na tolerância ao sal;
- Avaliar a funcionalidade desses genes clonando-os em *Escherichia coli*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 SOLO

Na atualidade, é crescente o interesse da humanidade com as condições do ambiente no planeta. O solo é um recurso natural e vital para a manutenção da vida na terra, incluindo o próprio homem. O solo é definido como um corpo natural, dinâmico e vivo composto por material mineral e/ou orgânico, não consolidado, ocorrendo na superfície da terra, contendo matéria viva e suportando ou sendo capaz de suportar plantas. Essa tênue camada é composta por partículas de rochas em diferentes estágios de desagregação, água e substâncias químicas dissolvidas, ar, organismos e matéria orgânica em distintas fases de decomposição (MONIZ,1972).

A sua formação abrange diversos fatores, os quais são denominados de intemperismo e podem ser divididos em forças físicas, que resultam na desintegração das rochas, em reações químicas que levam as alterações observadas nas rochas e nos minerais, além das forças biológicas que levam a uma intensificação das forças físicas e químicas.

Uma característica que é encontrada em todos os solos é a sua formação em diferentes camadas, aproximadamente horizontais, as quais são denominadas de horizontes. Uma seção vertical do solo irá expor diferentes horizontes e a esse conjunto é chamado perfil do solo. O perfil do solo é resultado da ação conjunta de vários fatores, enquanto que a sequência de horizontes caracteriza o solo e determinar-lhe o valor agrícola.

Com todos esses fatores relacionados à formação do solo, têm-se milhares de tipos de rochas e minerais com diferentes propriedades e características físicas, químicas, biológicas e morfológicas, definindo diferentes graus de resistência ao intemperismo e distintas propriedades físicas (MONIZ,1972). Propriedades estas que, por sua vez, irão influenciar na qualidade do solo, na produtividade das culturas, na qualidade do meio ambiente e, conseqüentemente, na saúde das plantas, dos animais e dos homens (PARR *et al.* 1992)

Inicialmente, acreditava-se que o solo possuía como função principal, ou talvez única, servir de local para o crescimento de plantas. Entretanto, no final da década de 30, do século passado, o cientista Ludwig Von Bertalanffy iniciou o desenvolvimento do

pensamento sistêmico, que passou a influenciar diversos campos da ciência, dentre eles, a Ecologia (CAPRA, 1996). Bertalanffy propôs que os sistemas vivos são sistemas “abertos”, precisando alimentar-se de um contínuo fluxo de matéria e de energia extraída do meio ambiente para permanecerem vivos (BERTALANFFY, 1973).

Baseado nesta idéia de Bertalanffy, Addiscot (1992) propõe que o solo também seja visto como um sistema aberto, o qual troca matéria e energia com o meio e desta forma, o solo passa a ter outras funções reconhecidas, dentre elas: a regulação e compartimentalização do fluxo de água no ambiente; o estoque e a promoção da ciclagem de elementos importantes para o desenvolvimento das plantas e animais, como carbono, nitrogênio, fósforo e potássio, entre outros. Adicionalmente, reconheceu-se que o solo atua como um tampão ambiental, ou seja, tem a capacidade de não deixar elementos ou substâncias tóxicas entrarem na cadeia alimentar (EMBRAPA, 2010).

### 3.2 QUALIDADE DO SOLO E SALINIZAÇÃO

Para que o solo consiga realizar as suas diferentes funções é necessário que o mesmo tenha uma boa qualidade, esta que é definida pela Soil Science Society of America (2011), como sendo a capacidade de funcionar dentro dos limites do ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade do meio ambiente e promover a sanidade das plantas e animais.

Essa qualidade pode ser alterada por razões naturais ou antrópicas, resultando na diminuição da sua habilidade de ser um recurso de múltiplos propósitos (LAL, 1989). Na atualidade, a perda da qualidade do solo está muito associada aos problemas que vêm ocorrendo com o uso inadequado dos recursos naturais, de insumos e práticas agrícolas impróprias.

A deterioração do solo pode ser classificada em física, química ou biológica, incluindo, como exemplos, o declínio da fertilidade, a redução na condição estrutural do solo, a própria erosão, a salinidade, efeitos de elementos tóxicos, alcalinidade, etc (LAL, 1989). Em 1978 já se estimava que a degradação do solo afetava cerca de 35% da superfície do planeta (MABBUTT, 1978) e estima-se que 0,3% a 0,5% (de 4 milhões a 7 milhões de hectares) da terra produtiva do mundo está sendo retirada da produção a cada ano e que a taxa de degradação está se acelerando (FAO, 1983).

**Figura 1** - Mapa de degradação mundial de solos

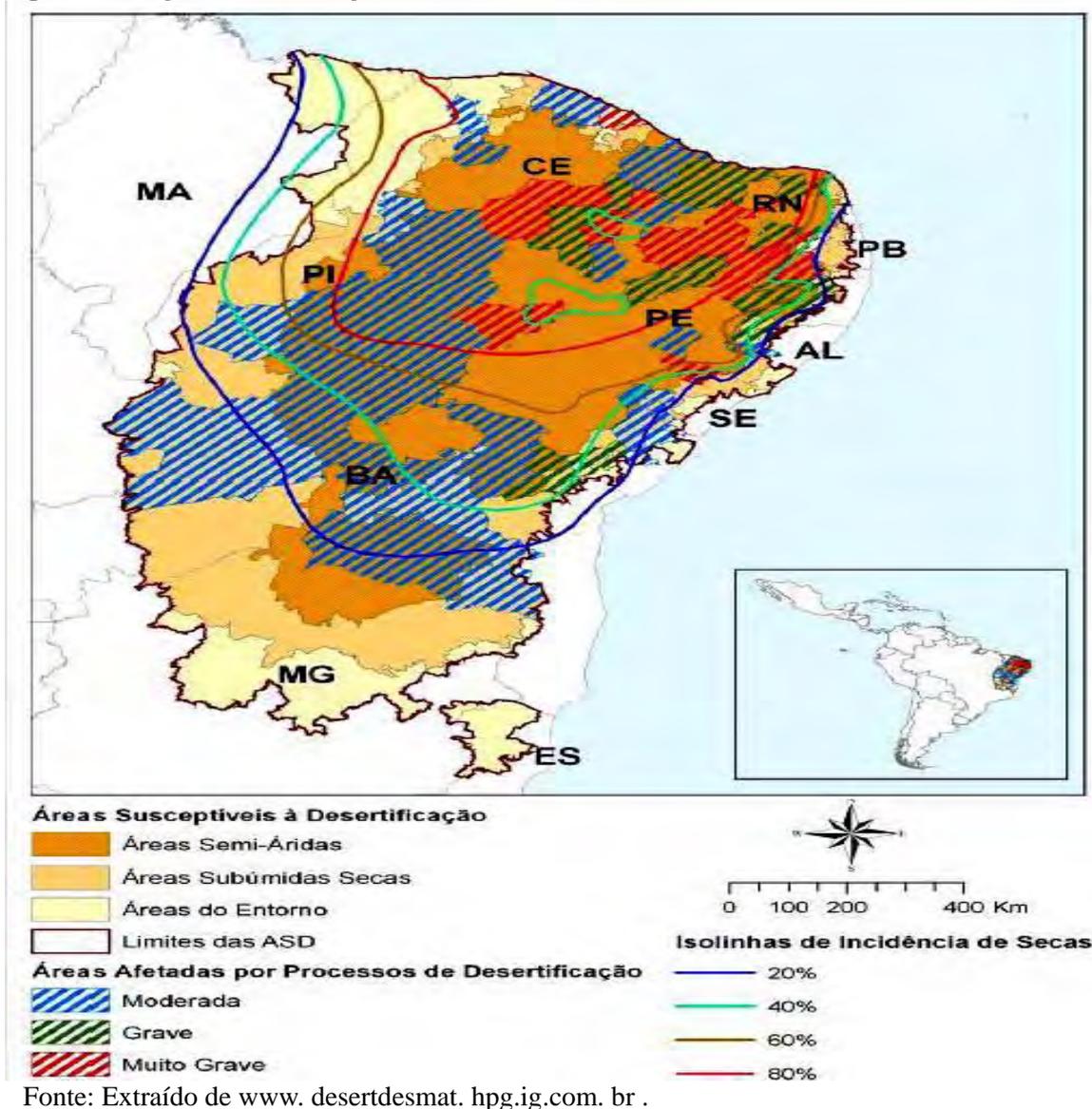


Fonte: Extraído de International Soil Reference and Information Centre, World atlas of desertification, 1997.

Focando na degradação química, a perda da qualidade está relacionada com uma mudança nas propriedades químicas do solo do estado favorável para o desfavorável, o que resulta no decréscimo da produtividade do mesmo. As propriedades químicas importantes do solo são: pH, capacidade de troca de cátions, saturação por bases, oxirredução e teor de matéria orgânica. O processo de degradação química pode ocorrer devido à fertilização inadequada, lixiviação (extração ou solubilização dos constituintes químicos de uma rocha, mineral ou solo), inundação, prática da monocultura por longo tempo na mesma área, erosão, uso de água salina para irrigação e pela calagem excessiva (método para aumentar o pH de solos ácidos) (FAGERIA, 1996).

Esses fatores são mais evidentes em regiões áridas ou semiáridas do globo, dentre estas, o nordeste brasileiro (Figura 2), no qual, em 1985 a ONU já estimava em mais de 9.000.000 hectares a área total ocupada pelos solos salinos nesta região, contribuindo para a expansão de áreas desertificadas sem nenhuma produção agrícola pelas terras terem se tornado inférteis.

**Figura 2 -** Mapa de desertificação do nordeste brasileiro



Como citado, uma das razões para a degradação química do solo é a salinidade, que tem sido reconhecida como um dos principais problemas da agricultura em regiões áridas e semiáridas, como é o caso do Nordeste brasileiro, onde a chuva é insuficiente para lixiviar os sais solúveis para fora da rizosfera (região do solo influenciada pelas raízes), além da presença de altas taxas de evaporação, sendo esse processo acelerado usualmente pelas irrigações irracionais e pela drenagem deficiente (GHEYI, 2000).

Contudo, essa situação se tornou um dos principais problemas da agricultura moderna devido ao crescente aumento de áreas que vão se tornando inúteis devido à acumulação de sais pela utilização de água não adequada para irrigação, drenagem deficitária, presença de águas subterrâneas ricas em sais hidrossolúveis ou mesmo pelo excessivo uso de fertilizantes agrícolas (Figura 3) (GHEYI, 2000).

**Figura 3** - Ilustrações de solos salinizados



Problemas de salinidade são um desafio para os proprietários e profissionais de recursos em regiões semi-áridas e áridas em todo o mundo. (Fonte: extraído de Natural Resources Conservation Service)

Os prejuízos que um solo salino traz são observados ao longo do tempo, pois, de acordo com RHOADES *et al.* (1992), a água salina raramente contém quantidades de sais suficientes para causar injúrias imediatas às plantas, a menos que ocorra contato foliar. Esses sais vão se concentrando na medida em que é transpirada pela cultura ou evaporada pela superfície do solo e o conteúdo desses sais vai aumentando na medida em que se repetem os ciclos agrícolas.

Os sais encontrados neste tipo de degradação do solo são sais solúveis em água, tais como os íons potássio( $K^+$ ), magnésio( $Mg^{2+}$ ), cálcio ( $Ca^{+2}$ ), cloreto ( $Cl^-$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), carbonato ( $CO_3^{2-}$ ), bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) e sódio ( $Na^+$ ). A presença de sal pode ser originada de maneira natural, enquanto que a salinização secundária é causada, principalmente, como consequência da irrigação insuficiente, manejo inadequado das instalações de irrigação, má condição de drenagem interna do solo e qualidade inadequada da água de irrigação (SOCO, 2009).

### 3.3 A SALINIZAÇÃO NO MUNDO

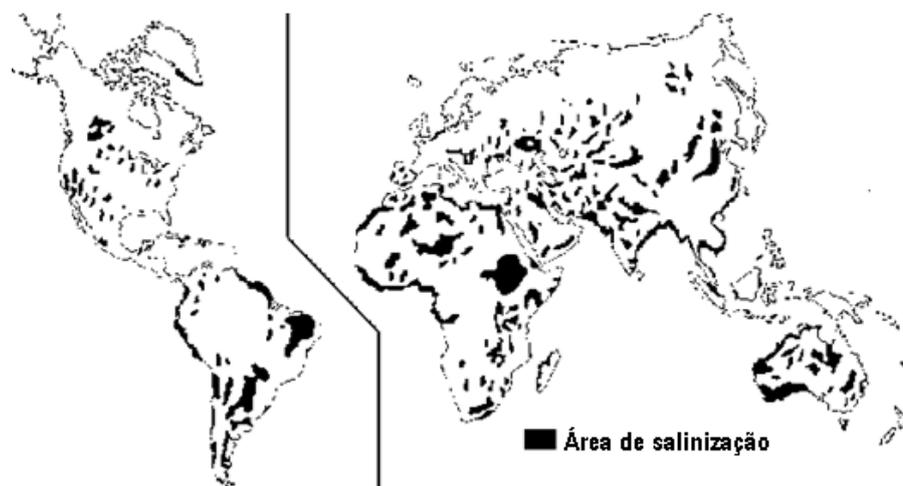
Szabolcks em 1979 demonstrou que o número de hectares afetados pela salinidade no mundo totalizava um milhão de hectares sendo a Austrália o país que apresentou o maior índice de solos afetados pela salinidade (Tabela 1). Após cinco anos, Szabolcks apresentou a distribuição dessas áreas, mostrando que nenhum continente está livre de solos afetados por concentrações tóxicas de sais (Figura 4) (SZABOLCKS, 1985).

**Tabela 1-** Extensão de áreas afetadas

<b>Região</b>	<b>Milhões de hectares</b>
América do Norte	15.7
México e América Central	2.0
América do Sul	129.2
África	80.5
Sul da Ásia	84.8
Norte e Ásia central	211.7
Sudeste da Ásia	20.0
Austrália	357.3
Europa	50.8
<b>Total</b>	<b>952.0</b>

Fonte: Modificado de SZABOLCS (1979).

Já em 2004, segundo Sairam & Tyagi, a salinidade afetava o crescimento e o desenvolvimento de plantas em quase 20% das terras irrigadas (45 bilhões de hectares) e 2,1% das não irrigadas (32 milhões de hectares) da área mundial cultivada. Sendo esta, particularmente evidente, nas regiões áridas e semiáridas do mundo, atingindo cerca de 25% das áreas irrigadas. Atualmente, estima-se que ocorra uma perda de cerca de 1,5 milhões de hectares de terras aráveis a cada ano devido ao acúmulo de sais (FAO, 2006).

**Figura 4 -** Terras irrigadas danificadas pela salinização no mundo

Fonte: Retirado de SZABOLCKS (1985).

No Brasil, embora a informação sobre as áreas salinas ainda não esteja bem definida, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas enfrentem problemas de salinização (FAO, 2006). Este problema é mais conspícuo na região Nordeste, na qual a

prática de irrigação constitui a única maneira de garantir a produção agrícola com segurança.

De acordo com dados da FAO de 2010, atualmente cerca de 10% a 15% das áreas utilizadas para agricultura irrigada no mundo vem sofrendo com vários níveis de salinidade nos solos. Estima-se que a cada ano ocorram perdas de terras irrigadas com problema de salinidade em torno de 0,5 a 1% (hectare plantado). Para se ter uma dimensão do problema em alguns países pelo mundo, como por exemplo, no Paquistão, mais de 25% das áreas irrigadas estão afetadas pela salinidade do solo. Na Tunísia e nos Estados Unidos, as porcentagens estão em torno de 25 e 23%, respectivamente. Na Índia, China e África do Sul, os valores se aproximam de 17%, 15% e 9%, respectivamente.

No Brasil, a porcentagem de solos naturalmente afetados pela salinidade se aproxima de 10%, ou seja, por volta de 86 milhões de hectares localizados principalmente, em áreas secas, onde o índice pluviométrico fica abaixo de 1.000mm/ano. Estima-se que a área irrigada no Brasil afetada por este problema esteja em torno de 2%, representando 15.000 hectares, cuja maior parte está localizada na região nordeste do país (FAO,2010).

A salinidade causa perdas nas produções agrícolas da ordem de bilhões de dólares todos os anos. Os prejuízos, em dólares, de cultivos em áreas salinizadas estão calculados em US\$ 250/ha, aproximadamente, podendo totalizar US\$ 11 milhões. Relatórios da FAO reportam que em alguns cultivos de algodão, sem nenhum estudo prévio, ocorreu salinização extrema dos solos, a qual induziu a diminuição de 20% na produção, correspondendo a perdas de US\$ 200 milhões/ano (FAO, 2010). Dados da mesma organização reportam a perda também nas produções agrícolas destinadas à alimentação humana de, aproximadamente, US\$ 2 bilhões/ano.

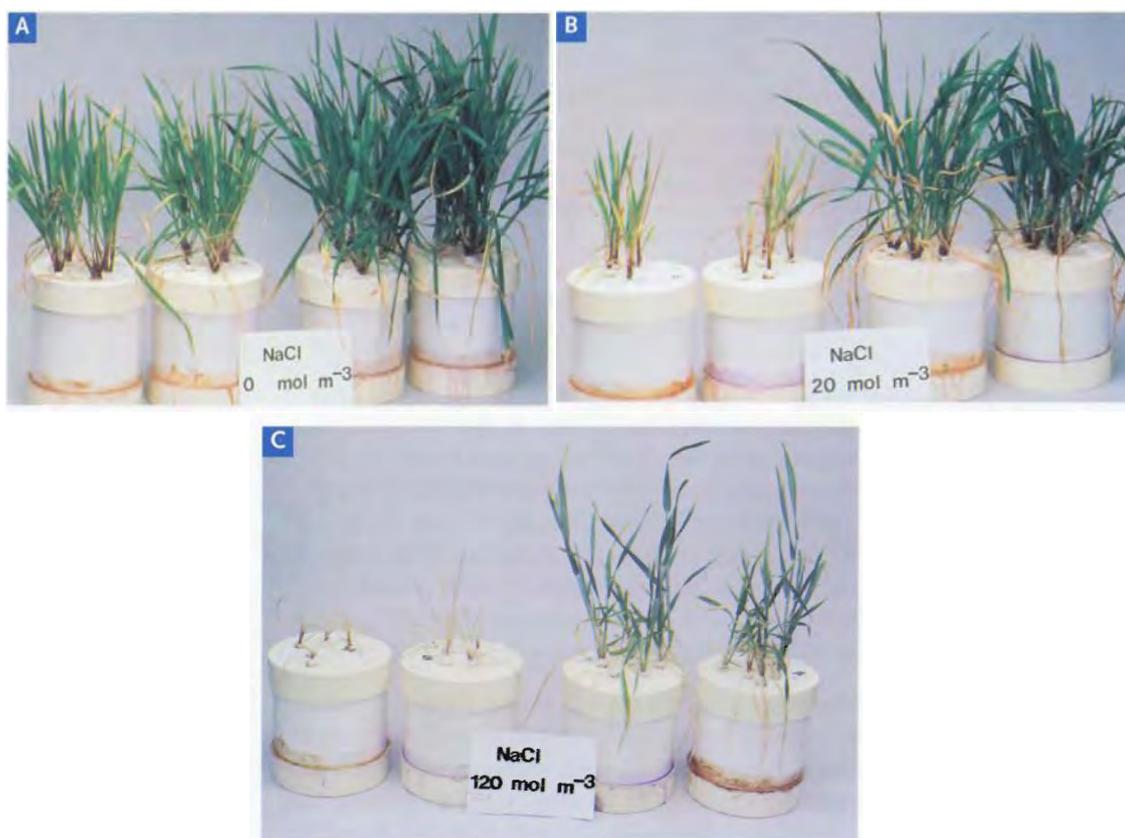
### 3.4 SALINIZAÇÃO E SEUS EFEITOS PARA AS PLANTAS

Grandes áreas agrícolas tem sido gravemente afetadas na sua produtividade devido à marcante susceptibilidade das principais culturas ao excesso de sais. A presença de altas concentrações de sais no solo pode afetar as plantas em todos os aspectos da sua fisiologia e do seu metabolismo (ZHU, 2001). Dentre os diversos efeitos deletérios da salinidade em seu crescimento está a redução do potencial osmótico

da solução do solo (estresse hídrico), distúrbios nutricionais, efeitos específicos de alguns íons (estresse iônico) ou uma combinação desses fatores (ASHRAF, 1994).

Geralmente, o primeiro efeito a ser observado como resultado de altas concentrações de sal no solo é a redução do crescimento das plantas, resultado da diminuição do potencial hídrico da solução do solo abaixo do necessário para que ocorra absorção de água pelas raízes (Figura 5) (BOHNERT *et al.*, 1995; TAIZ & ZEIGER, 2004). Adicionalmente, a salinidade reduz a condutividade hidráulica das raízes (SOHAN *et al.*, 1999), limitando o fluxo de água que vai para a parte aérea da planta. A salinidade do solo afeta também a estrutura e o conteúdo de nutrientes no solo, inibindo tanto o processo de divisão como de expansão celular (ZIDAN *et al.*, 1990).

**Figura 5** - Efeitos do sal no crescimento de plantas de trigo cultivadas em diferentes concentrações de sal



Cultivos mostrados no lado esquerdo da figura foram inundados e potes da direita foram drenados com soluções de borbulhamento de ar com gás nitrogênio. Todos os cultivos mostrados nas figuras B e C estão sob estresse salino. Fonte: retirado de [http://aci-ar.gov.au/files/node/2275/mn050\\_part\\_5\\_pdf\\_19541.pdf](http://aci-ar.gov.au/files/node/2275/mn050_part_5_pdf_19541.pdf)

Um aspecto importante a ser discutido quando se estuda os efeitos do aumento da concentração dos sais no solo, é a distinção entre salinidade que pode ser definida

como o efeito produzido por solos que apresentam altas concentrações de sais totais, e sodicidade que se caracteriza por apresentar altas concentrações de sódio.

Solos sódicos afetam não só as plantas como também a própria estrutura do solo, pois o mesmo possui a capacidade de dispersar as argilas diminuindo a porosidade e, portanto, a permeabilidade à entrada de ar e da água. Por esses motivos, plantas que se desenvolvem em solos salinos sofrem um estresse diretamente associado à falta de água produzido pela queda no potencial osmótico do solo. Essa situação complica-se ainda mais quando o solo é considerado sódico porque a essa queda no potencial osmótico se soma a pouca quantidade de água disponível devido à baixa permeabilidade do solo (SANTOS,1998).

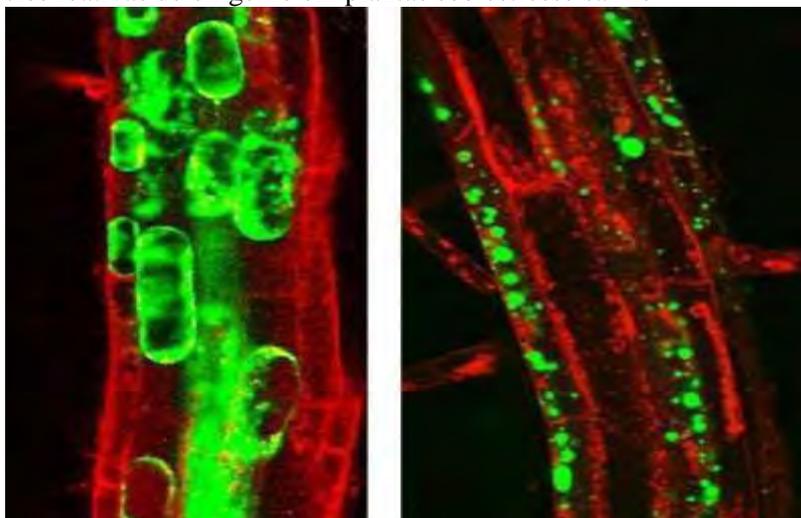
As plantas que estão se desenvolvendo em um ambiente salino apresentam um segundo efeito, resultado do excesso de sais, relacionado com problemas na absorção da água. Isto acontece porque a água está fortemente retida por potenciais altamente negativos e aquelas plantas que não conseguem contornar essa situação apresentam uma síndrome conhecida como *seca fisiológica*, fazendo com que as raízes percam água para o solo.

Oertli em 1968 propôs a existência de um desequilíbrio osmótico interno em plantas sob estresse hídrico, enquanto que Munns & Passioura (1984) demonstraram o processo. Eles observaram um aumento da pressão osmótica na seiva do xilema indicando que nos primeiros dias após o estresse, as células apresentavam um potencial osmótico de -0,05Mpa. Na medida que as células vão se saturando, os sais vão se acumulando na parede celular. Quando o potencial osmótico do apoplasto atinge valores de -0,2 até -0,3 Mpa as células morrem, podendo acontecer como resultado da acumulação de sais no apoplasto, especialmente na parede celular em níveis superiores aos do simplasto levando a um processo de desidratação celular (OERTLI, 1968).

Outro aspecto comum observado nas plantas sob estresses ambientais é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), dentre elas o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxil ( $HO\cdot$ ), estes que são altamente reativos e podem alterar o metabolismo celular normal (Figura 6) (ALSCHER *et al.*, 1997). As espécies reativas de oxigênio colidem com moléculas orgânicas e extraem um elétron destas. Desta forma, o radical se propaga pela célula em uma reação em cadeia, gerando outras espécies reativas de oxigênio. As diferentes formas de EROs causam diversos danos nas células vegetais como: inibição de enzimas sensíveis,

degradação da clorofila, peroxidação lipídica, entre outros (RICHTER & SCHWEIZER, 1997).

**Figura 6** – Espécies reativas de oxigênio em plantas sob estresse salino



A quantidade e a distribuição de espécies reativas de oxigênio (bolhas verdes) na membrana de plantas sensíveis (esquerda) e plantas tolerantes à salinidade (direita) após manipulação genética (Fonte: retirado de <http://www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070613091932.htm>).

As plantas apresentam sistemas antioxidativos de defesa, podendo ser não-enzimáticos (como o ácido ascórbico e a glutatona reduzida, a tocoferol e os carotenóides) ou enzimáticos (incluindo a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases não específicas (POX) e as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase da glutatona (GR) (McKERSIE & LESHEM, 1994; SHALATA *et al.*, 2001).

Estes sistemas oxidativos estão localizados em diversos compartimentos subcelulares, sendo estes suficientes para evitar o dano oxidativo durante períodos de crescimento sob condições normais e de estresse moderado (BRAY *et al.*, 2000). Entretanto, quando estressadas severamente, a produção de ERO pode exceder a capacidade de neutralização dos sistemas antioxidativos e o dano oxidativo pode ocorrer (KANG & SALTVEIT, 2001).

### 3.5 SALINIZAÇÃO E OS MECANISMOS ADAPTATIVOS DAS PLANTAS

Com tantos efeitos negativos nas plantas devido à concentrações tóxicas de sais no solo, as plantas desenvolvem respostas adaptativas que abrangem respostas tanto a nível celular quanto da planta como um todo (YEO, 1998; MANSOUR & SALAMA, 2004). Tais respostas incluem o acúmulo seletivo ou a exclusão de íons, o controle na absorção dos íons pelas raízes, a síntese de solutos compatíveis, mudanças na rota fotossintética, alteração na estrutura das membranas, indução de enzimas antioxidantes e de hormônios vegetais (PARIDA & DAS, 2005).

Podem-se agrupar essas inúmeras respostas das plantas ao estresse salino em três grandes vias sinalizadoras: (I) sinalizadores de estresse osmótico/oxidativo que utilizam moduladores de *Mitogen-Activated Protein kinase* (MAPK), envolvendo a produção de enzimas e componentes anti-oxidantes assim como a produção de metabólitos compatíveis; (II) sinalizadores  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes, iniciando a ativação de genes codificadores de proteínas do tipo *Late embryogenesis abundant* (LEA), *Heat Shock Proteins* (HSPs) e chaperonas, envolvidos na produção de proteínas que respondem ao estresse e são protetoras de membranas e proteínas e; (III) sinalizadores *Salt Overlay Sensitive* (SOS) dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que regulam a absorção de água, homeostase de íons e o transporte destes via aquaporinas e transportadores de íons (WANG, 2003; RODRÍGUEZ *et al.*, 2005).

Estes processos são fundamentais para a re-estabilização da homeostase celular assim como para a reparação, proteção estrutural e funcional de membranas plasmáticas e proteínas. Respostas ineficientes, em qualquer um dos níveis de resposta, podem acarretar em mudanças na homeostase, destruição de proteínas funcionais e estruturais de maneira irreversível, acarretando a morte celular e, em casos mais severos, morte da planta.

Um dos mecanismos comuns de serem observados visando a tolerância a salinidade é a compartimentalização intracelular dos sais nos vacúolos, uma vez que as plantas não toleram grandes quantidades de sais no citoplasma, assim como compartimentalizam os íons em diferentes tecidos (NIU *et al.*, 1995; IYENGAR & REDDY, 1996). Outro mecanismo é a redução do potencial osmótico de suas células ao acumular íons do meio externo, ou pela mobilização de seus próprios constituintes orgânicos, sendo tal processo denominado de ajustamento osmótico ou osmorregulação (YAMAGUCHI & BLUMWALD, 2005).

Além desse mecanismo, muitas plantas que toleram o efeito do estresse salino, o fazem por sintetizar compostos orgânicos, conhecidos como solutos compatíveis. Eles são em número bastante limitado, pois somente poucos compostos podem existir em concentrações relativamente altas no citoplasma sem causar danos às enzimas (LACERDA *et al.*, 2003).

### 3.6 O MELHORAMENTO GENÉTICO E A SALINIDADE

Uma das possíveis soluções para resolver o problema da salinização do solo é a utilização de práticas de manejo de solo com o objetivo de reduzir ao máximo a salinidade, melhorando o solo para o desenvolvimento e crescimento das plantas, a partir de projetos de irrigação e drenagem desses. Entretanto, a recuperação de solos envolve grandes investimentos, além do tempo exigido para suas execuções. Adicionalmente, os locais com solos recuperados ficam restritos à apenas uma determinada área, resolvendo o problema apenas em âmbito local (PRISCO, 1987; GHEYI, 2000).

Neste contexto, a outra forma de minimizar os problemas da salinidade do solo seria através da produção de culturas geneticamente modificadas que possam produzir, satisfatoriamente, sob condições de salinidade, sendo esta alternativa a mais viável e que resolveria o problema em um âmbito mais extenso quando comparado aos resultados de manejo de solo (GHEYI, 2000). Atitudes como estas são de extrema importância em todas as regiões afetadas pela salinidade, mas o destaque vai para aqueles países em desenvolvimento onde os recursos do solo são limitados. (LIANG, 1996)

Contudo, o desenvolvimento de plantas resistentes é bastante complexo, uma vez que a tolerância à salinidade é uma característica controlada por grande número de genes (herança poligênica) que interagem e contribuem, individualmente, com pequeno efeito no fenótipo (HURKMAN, 1992; JAIN, 1993; ZHU, 2000).

Tradicionalmente, plantas têm sido melhoradas utilizando a seleção natural durante vários ciclos agrícolas e este procedimento tem gerado um bom rendimento de variedades, especialmente nos casos que já se trabalha com espécimes híbridos. Um desafio que enfrenta a agricultura tradicional está no fato de que se a resistência natural para uma característica específica não existir ou não aparecer, então as técnicas de melhoramento clássico não poderão criá-la. Desta forma, faz-se necessário a pesquisa

por fontes alternativas de genes, em outras espécies de plantas, microrganismos, fungos, etc.

Vinte anos atrás, os resultados dos primeiros experimentos descrevendo o sucesso da transferência e expressão de genes heterólogos em células de planta foi publicado (De BLOCK *et al.*, 1984; OW *et al.*, 1986). Desde então, plantas transgênicas tornaram-se uma ferramenta essencial de estudo da biologia de plantas para o desenvolvimento de variedades agrícolas apresentando características importantes para serem cultivadas com um rendimento significativo em algumas regiões do mundo.

### 3.7 PROTEÍNAS ANTIPORTES E PLANTAS TOLERANTES À SAL

Uma estratégia para aumentar a tolerância frente a essas condições de crescimento é a produção de compostos osmoprotetores, como açúcares, alcoóis, aminoácidos, entre outros que aumentam o influxo de água e estabilizam a estrutura de membrana (HOLMBERG, 1998).

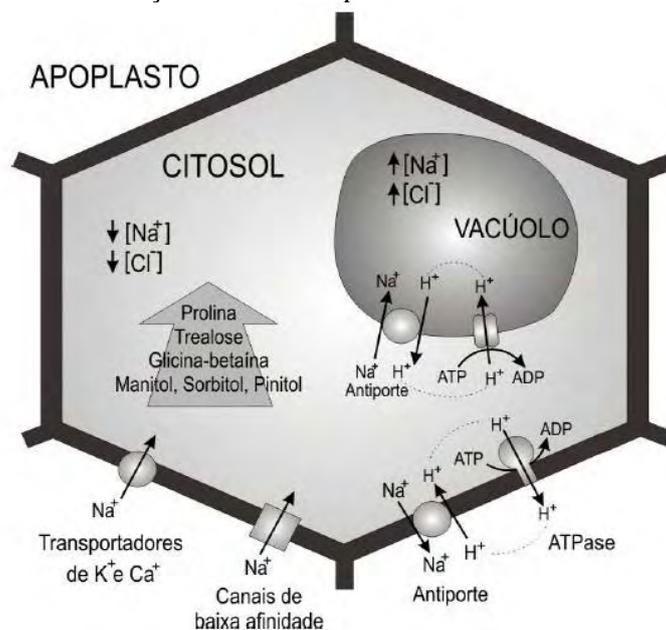
Em plantas halófitas (plantas que se desenvolvem naturalmente em ambientes com elevadas concentrações salinas), muitas vezes, a tolerância à salinidade correlaciona-se positivamente com a concentração de  $\text{Na}^+$  e, quando relacionada com elevadas concentrações citoplasmáticas de  $\text{K}^+$ , favorece o ajuste osmótico da planta em relação ao ambiente. Além de acumular  $\text{K}^+$ , halófitas e glicófitas (plantas que não são capazes de se desenvolver em ambientes com elevadas concentrações salinas) sintetizam solutos orgânicos no citoplasma para fazer frente ao baixo potencial osmótico do vacúolo, devido ao excesso de sais (WILLADINO, 2010).

No caso de estudos visando o desenvolvimento de plantas tolerantes à salinidade, um foco bastante utilizado está relacionado a genes associados ao controle do balanço iônico, sendo este um dos processos mais importantes na determinação da tolerância das plantas a ambientes salinos.

Lembrando que existem três mecanismos principais nas plantas para prevenção do acúmulo excessivo de  $\text{Na}^+$  no citosol, sendo estes: a restrição da entrada de  $\text{Na}^+$ ; a compartimentalização de  $\text{Na}^+$  no vacúolo e, como terceiro mecanismo, a exportação do  $\text{Na}^+$  presente no citosol para o espaço apoplástico ou para o solo/substrato, uma estratégia para a produção de cultivares tolerantes é a superexpressão de genes que codificam proteínas associadas com um desses mecanismos de proteção das plantas.

A extrusão de  $\text{Na}^+$  do citosol, para o vacúolo ou para o apoplasto, ocorre através do antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Figura 7). O efluxo de  $\text{Na}^+$  do citoplasma para o apoplasto é mediado por um produto do gene *SOS1* (*Salt Overly Sensitive 1*) que funciona como um transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  do tipo contra-transporte. Por sua vez, a compartimentalização vacuolar de  $\text{Na}^+$  resulta da atividade de uma família de transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tal como o *AtNHX1* identificado em *Arabidopsis sp.* (WILLADINO, 2010).

**Figura 7** – Mecanismo de balanço osmótico em plantas sob estresse salino



Mecanismos de ajuste osmótico com acúmulo de solutos compatíveis no citoplasma e canais iônicos e transportadores que determinam o mecanismo de absorção e extrusão de sódio  
Fonte: Adaptado de WILLADINO & CAMARA, 2005.

Plantas de *Arabidopsis sp.* geneticamente modificadas para a superexpressão do gene *AtNHX1* e superprodução do antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tem aumentado a tolerância a sal e tem sustentado o crescimento e o desenvolvimento no solo cultivado com concentrações acima de 200mM de  $\text{NaCl}$  (APSE, 1999). Plantas de *Arabidopsis sp.* submetidas ao estresse salino expressam *SOS1* preferencialmente nas células da epiderme do ápice das raízes, evidenciando a ativação do mecanismo de extrusão de sódio para o meio externo (SHI *et al.*, 2002). Detectou-se a ausência do antiporte *SOS1* de forma generalizada nas demais células da raiz e da parte aérea.

Em contraste, o gene *AtNHX* não se expressou no ápice da raiz, o que reflete uma estratégia crucial para a proteção das células meristemáticas, visto que as mesmas, reconhecidamente, não apresentam vacúolos grandes, os quais são fundamentais para a

compartimentalização do  $\text{Na}^+$ . Por outro lado, o gene *AtNHX* expressou-se abundantemente nas células de quase todos os demais tecidos indicando que a compartimentalização do  $\text{Na}^+$  no vacúolo é um mecanismo bastante generalizado nas demais células da planta.

A importância do antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de *Arabidopsis sp.* foram testados, *in vivo*, em tomateiros transgênicos superexpressando o antiporte e estes foram capazes de crescer, florescer e produzir frutos na presença de altas concentrações de sal (200mM), com um baixo conteúdo de sal no fruto e preservando a qualidade do produto (ZHANG, 2001

Apse & Blumwald (2002) demonstraram que a expressão de proteínas reguladoras de leveduras, as quais controlam os níveis intracelulares de  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , e a superexpressão dos antiportes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar e de membrana plasmática (SHI *et al.*, 2002), bem como da  $\text{H}^+$ - pirofosfatase vacuolar (GAXIOLA *et al.*, 2001), em plantas de *Arabidopsis thaliana*, também conferiram aumento na tolerância das plantas à salinidade. Esses resultados indicam que quando se deseja selecionar um genótipo com maior tolerância ao estresse salino, uma importante característica a ser observada é a capacidade de manutenção da homeostase iônica deste organismo.

### 3.8 DOMÍNIOS DA VIDA E DIVERSIDADE

As etapas envolvidas no processo de transgenia compreendem a localização do(s) gene(s) correspondente a uma característica desejada, a obtenção e clonagem ou multiplicação desse gene, a transformação da célula do organismo receptor e a seleção, regeneração da planta e fixação da característica desejada (LAJOLO & NUTTI, 2003).

Para essa proposta, faz-se necessário a escolha do organismo que apresente tolerância ao sal para ser identificado genes de resistência, assim como tentar compreender alguns mecanismos de adaptação a altas concentrações de sal e uma excelente escolha, está em microorganismos resistentes naturalmente à salinidade.

A vida microbiana pode ser encontrada em locais de diferentes concentrações de sal, ocorrendo tanto em água doce como em ambientes marinhos e até outros ambientes com níveis de NaCl acima da saturação. Os microorganismos halofílicos e tolerantes são encontrados nos três domínios da vida microbiana: *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya* (VENTOSA *et al.*, 1998; OREN, 1999).

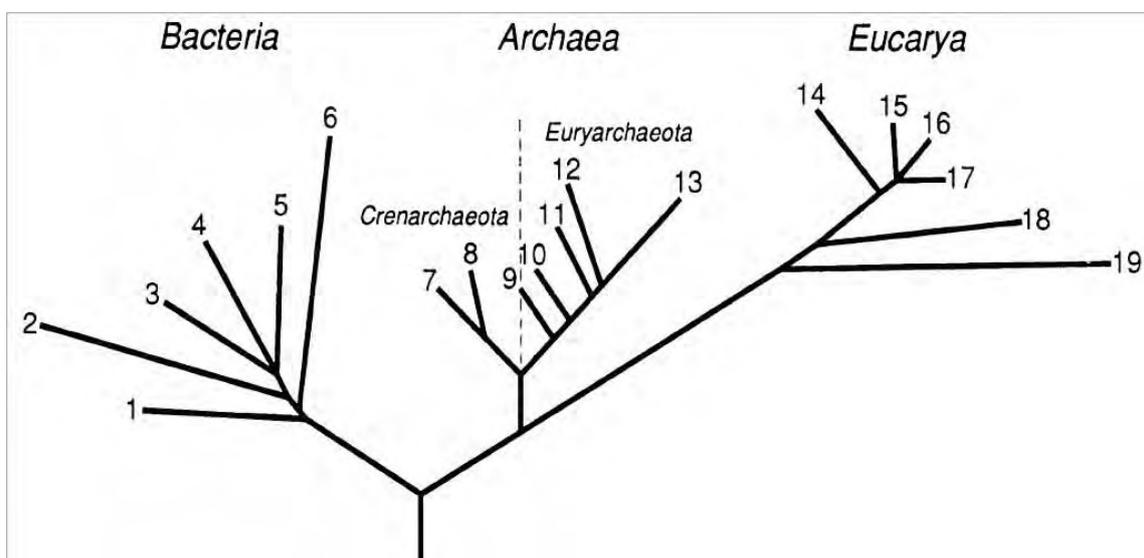
Segundo a taxonomia lineana tradicional, baseada em dados morfológicos e fisiológicos, todas as formas de vida na Terra podem ser classificadas em cinco reinos:

*Animalia, Plantae, Fungi, Protista e Monera* (WHITTAKER, 1969). Pode-se também dividir a vida em dois tipos fundamentais: aqueles que possuem uma membrana nuclear (eucariotos) e aqueles que não a possuem (procariotos) (WHITTAKER, 1969).

Os procariotos (Reino Monera) eram considerados simples, primitivos e relativamente uniformes em suas características (HUGENHOLTZ & PACE, 1996). Esses sistemas perduraram até 1990 quando Carl Woese utilizou as comparações de seqüências de rRNA 16S para propor uma nova classificação universal para a grande diversidade de vida na Terra. Pela primeira vez, uma proposta completa de classificação foi feita baseada em dados moleculares e não morfológicos (WOESE, KANDLER & WHEELIS, 1990).

Os autores propuseram a criação de um novo nível taxonômico, denominado Domínio, sendo a vida no planeta dividida em três Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya* (Figura 8), já que o sistema de cinco Reinos era insuficiente e não refletia a filogenia natural dos seres vivos.

**Figura 8** - Árvore filogenética universal em forma de raiz mostrando os três domínios



A ordem e o tamanho dos braços são baseadas na comparação de seqüências de 16S e 18S rRNA. Os números nos braços correspondem a: Domínio Bacteria: 1) Thermotogales, 2) Flavobacterias e relacionados, 3) Cyanobacteria, 4) Bactérias púrpuras, 5) Bactérias gram-positivas e 6) Bactéria verde-não sulfurosas. Domínio Archaea, Reino Crenarchaeota: 7) Gênero Pyrodictium, 8) Gênero Thermoproteus, Reino Euryarchaeota: 9) Thermococcales, 10) Methanococcales, 11) Methanobacteriales, 12) Methanomicrobiales e 13) Halofilas extremas. Domínio Eucarya: 14) Animais, 15) Ciliados, 16) Plantas verdes, 17) Fungos, 18) Flagelados e 19) Microsporídia. Fonte: Adaptado de WOESE, KANDLER e WHEELIS (1990).

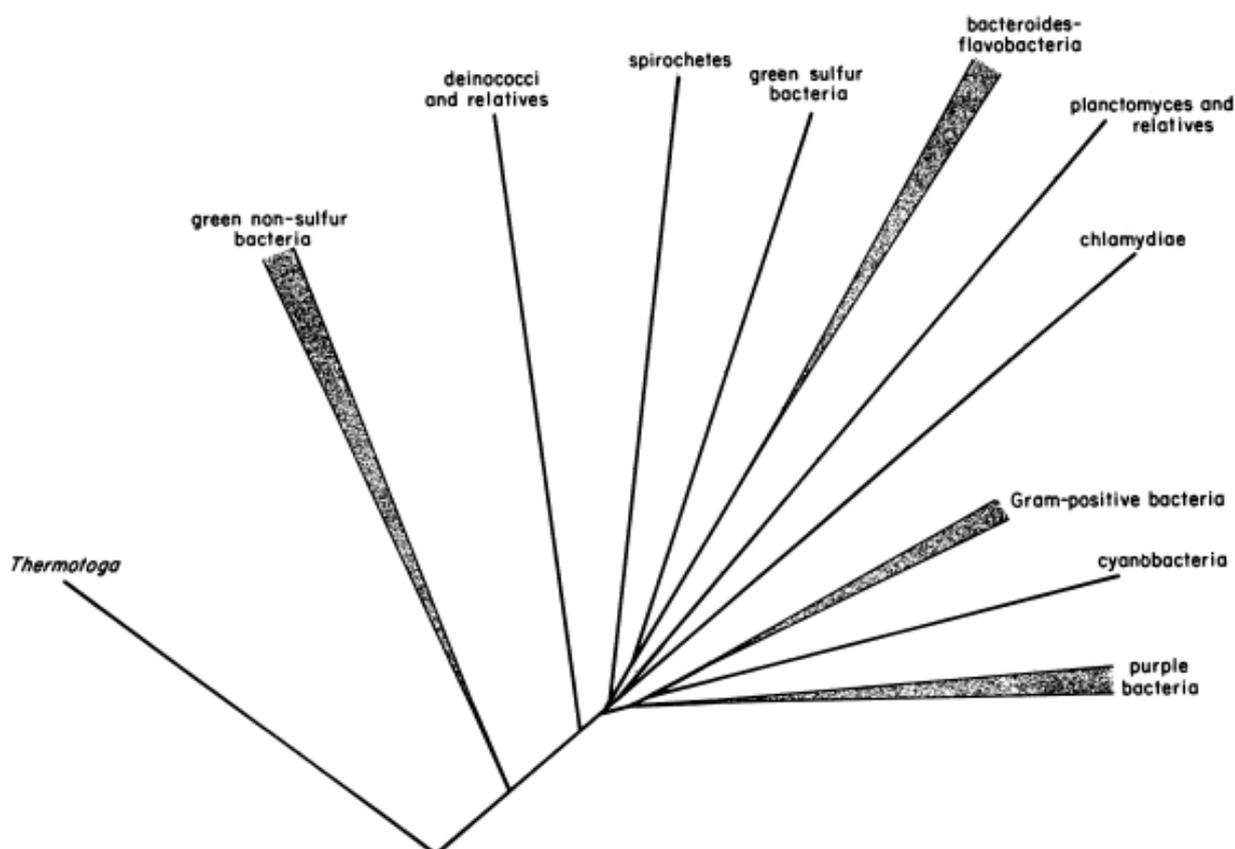
Na proposta inicial de Carl Woese (1987) o domínio *Bacteria* era formado por 11 filos compostos principalmente por indivíduos cultivados e caracterizados (Figura 9).

Entretanto, estudos moleculares independentes de cultivo demonstraram que o Domínio *Bacteria* possuía mais filós, sendo que alguns apresentavam poucos ou nenhum representante cultivável (DeLONG e PACE, 2001).

Desta forma, uma nova classificação, incluindo seqüências de rRNA 16S de organismos retirados diretamente do ambiente, feita por Hungenholtz e colaboradores em 1998 (HUNGENHOLTZ, GOEBEL e PACE, 1998) aumentou o número de filós bacterianos para trinta e seis (Figura 10).

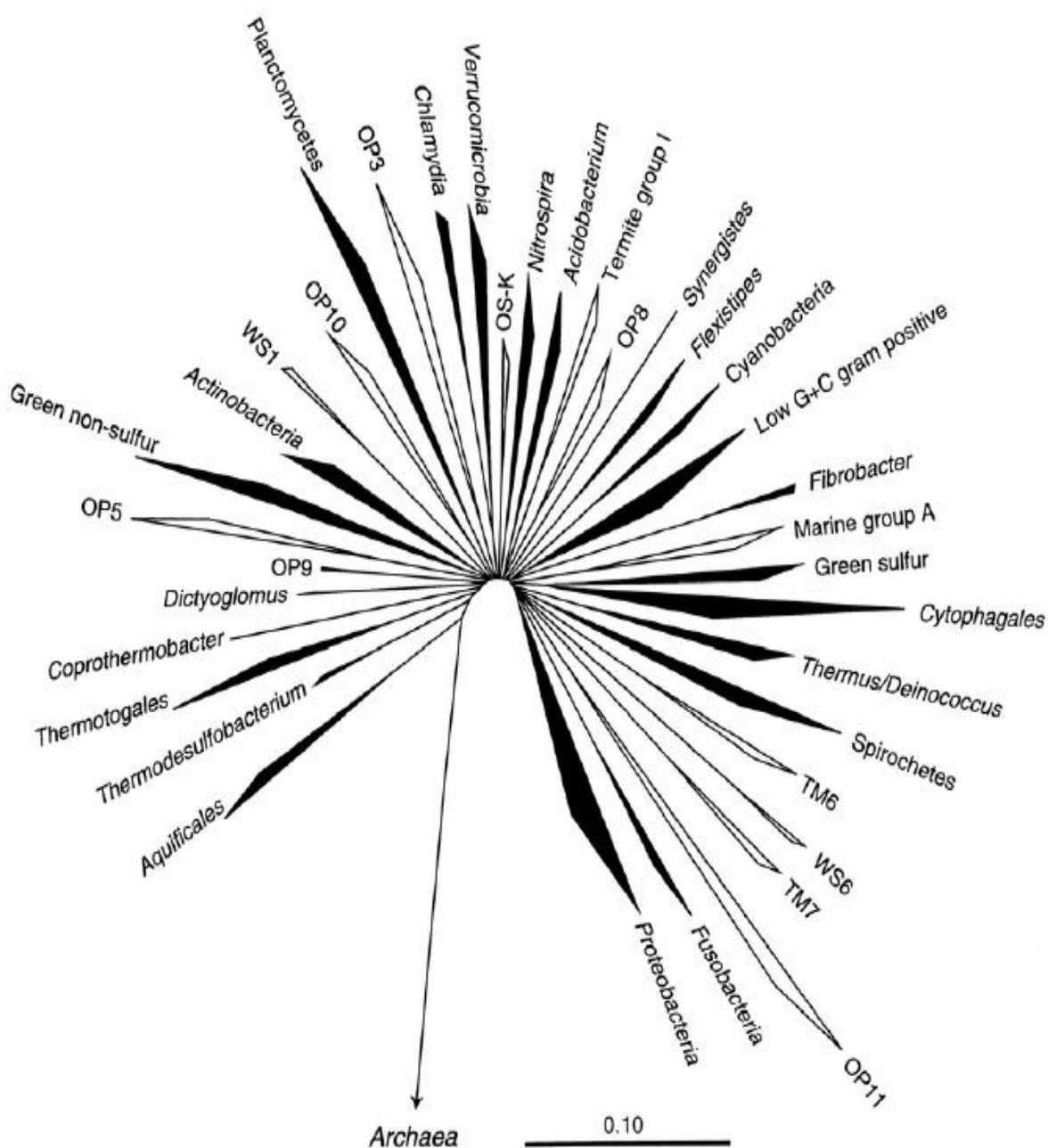
Mais recentemente Rappé e Giovannoni (2003), também utilizando seqüências rDNA 16S amplificadas de DNA total de diversos ambientes, aumentaram esse número para cinquenta e dois filós (Figura 11). Os estudos de amostras ambientais indicam que os microrganismos procarióticos representam o maior reservatório de diversidade genética do planeta (TORSVIK, 2002), tornando-se fonte imensurável de genes que codifiquem características interessantes para várias aplicações biotecnológicas.

**Figura 9** - Árvore filogenética do domínio Bacteria proposta por Woese (1987)



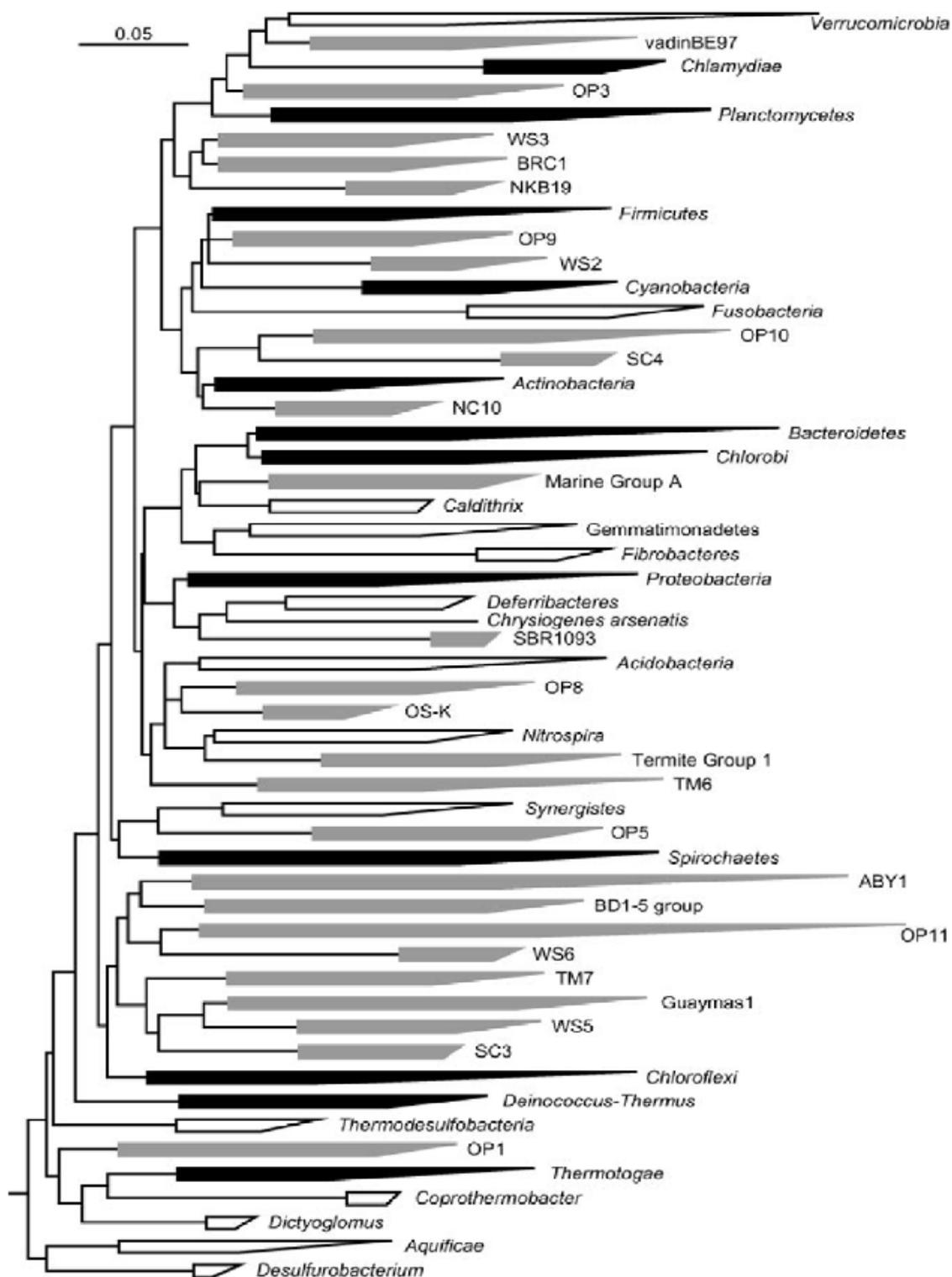
A árvore apresenta onze filós bacterianos. O grupo das bactérias gram-positivas foi posteriormente dividido em *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Árvore retirada de WOESE (1987).

**Figura 10** - Árvore filogenética do domínio Bacteria proposta por Hungenholtz (1998)



A árvore apresenta trinta e seis filotaxonomias bacterianas. Ramos preenchidos indicam filotaxonomia baseada em culturas. Ramos não preenchidos indicam filotaxonomia baseada em indivíduos não cultivados. A barra de escala representa 0,1 mudança nucleotídica por posição. Árvore reproduzida a partir de HUNGENHOLTZ, GOEBEL e PACE (1998).

**Figura 11** - Árvore filogenética do domínio Bacteria proposta por Raapé e Giovannoni (2003)



A árvore apresenta 52 filos bacterianos. Setas preenchidas representam os 12 filos originais (bactérias gram-negativas foram divididas em Firmicutes e Actinobacteria) descritos por Woese (WOESE,1987), setas não preenchidas são aqueles filos que possuem representantes cultivados reconhecidos desde 1987 e em cinza estão os 26 filos candidatos que não possuem representantes cultiváveis conhecidos. A barra de escala representa 0,05 mudanças nucleotídicas por posição. Árvore reproduzida a partir de RAPPÉ e GIOVANNONI (2003).

O número total de células procarióticas na Terra é estimado em  $4-6 \times 10^{30}$ , representando uma quantidade de carbono celular de  $350-550 \times 10^9$  toneladas. A extrapolação de resultados obtidos em vários estudos sugere que 1 grama de solo contém cerca de 10 bilhões de procariotos pertencentes a milhares de espécies diferentes (ROSSELÓ-MORA e AMANN, 2001).

O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo formalmente descritos mais de 70.000 fungos, 36.000 protozoários, 30.000 algas, 5.000 bactérias e 3.600 vírus. Mas esses números ainda estão longe do total de espécies microbianas, estimado em mais de 2 milhões (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). A principal razão para o baixo número de espécies formalmente descritas era a necessidade de cultivo celular no processo de identificação dos microrganismos, o que na grande maioria das vezes não é possível (PACE *et al.*, 1986). A perspectiva de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo estimulou o desenvolvimento de técnicas que permitissem o estudo dessas comunidades microbianas independente de cultivo.

### 3.8.1 ARCHAEA E ORGANISMOS HALÓFILOS

O domínio *Archaea*, conhecido como o terceiro domínio da vida, é composto por microrganismos diversificados quanto a morfologia, a fisiologia e os habitats naturais, uma vez que as arqueias são conhecidas por habitarem ambientes inóspitos, quase que incompatível com a presença de muitos seres vivos.

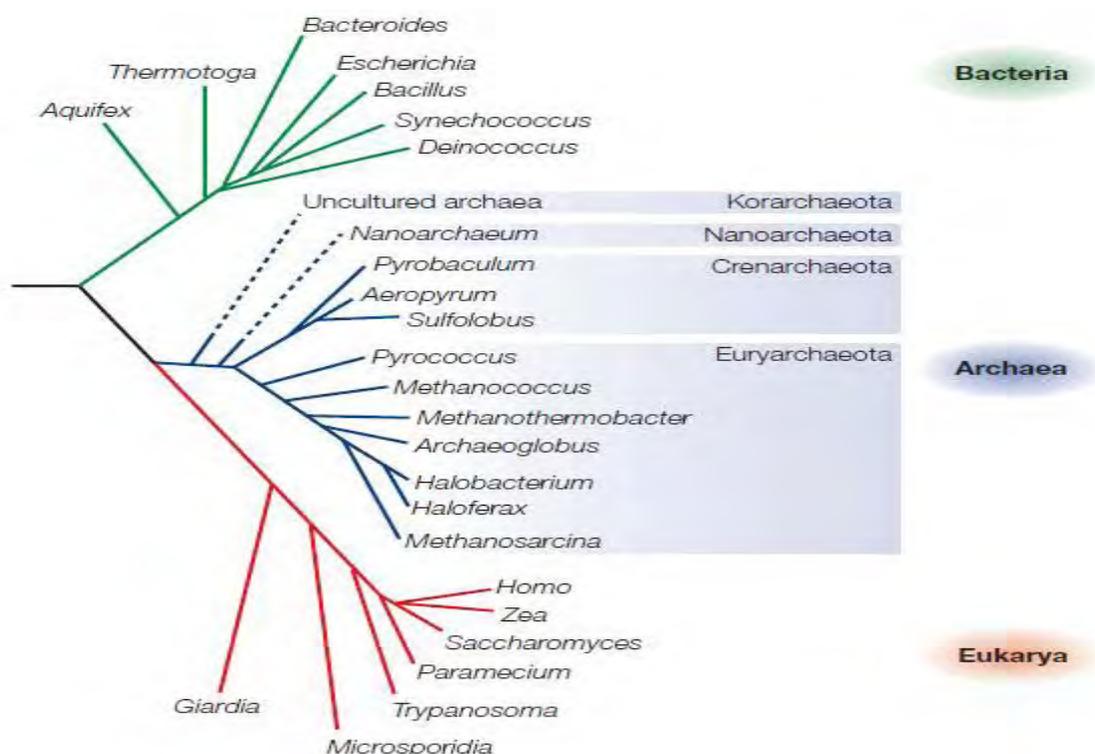
Estes ambientes se caracterizam por apresentar temperaturas próximas a  $100^{\circ}\text{C}$ , valores extremos de pH, concentrações elevadas de sais e ausência de oxigênio (ALLERS *et al.*, 2005). Entretanto, o acúmulo de conhecimentos sobre este grupo vem mostrando que estes microrganismos também podem ser encontrados em oceanos, no solo, em tecido vegetais e até na flora intestinal do homem e de outros animais (DeLONG, 1998).

A criação desse domínio baseou-se em 20 sequências de 16S rRNA obtidas de organismos cultivados (ROBERTSON *et al.*, 2005) e este domínio apresentou-se dividido em dois grandes reinos: *Euryarchaeota* (do grego *euryos*, abrangência, diversidade) o qual é o mais diversificado de todos os filos do domínio, possuindo microrganismos metanogênicos e halofílicos; e *Crenarchaeota* (do grego *crenos*, fonte, origem, baseando-se na teoria do surgimento da vida em uma Terra quente) que inclui

organismos hipertermófilos, compreendendo os organismos capazes de crescer nas maiores temperaturas conhecidas, assim como já é relatado a presença de organismos deste filo em ambientes de baixa temperatura. Estudos filogenéticos subsequentes empregando outros conjuntos de genes além do rRNA 16S deram suporte a essa divisão (BROCHIER-ARMANET *et al*, 2008).

Entretanto, o surgimento e a expansão dos estudos em biologia molecular, principalmente baseada em sequências de rRNA 16S, levaram a descoberta de muitas linhagens ainda não cultivadas. Propôs-se então a criação do reino *Korarchaeota* (BARNS *et al*,1996), para agrupar sequências distintas daquelas pertencentes aos dois reinos iniciais, mesmo sem a obtenção de algum organismo cultivado representante desse reino. Porém, com o aumento das sequências de rRNA 16S disponíveis nos bancos de dados, algumas sequências do reino *Korarchaeota* puderam ser agrupadas dentro do reino *Crenarchaeota* (ROBERTSON *et al.*, 2005), sendo essa última classificação posteriormente confirmada por filogenias baseadas em sequências genômicas (Figura 12)(GRIBLADO & BROCHIER, 2009).

**Figura 12** - Taxonomia do Domínio *Archaea*



Fonte: Árvore extraída de ALLERS (2005).

O reino *Nanoarchaeota*, diferencia-se dos demais reinos por apresentar relações filogenéticas incertas e por ter um único exemplar que apresenta um comprimento de cerca de 400 nm de diâmetro e um genoma de megabases, justificando o nome do reino. (HUBER *et al*, 2002). O mesmo foi proposto com base na sequência de 16S de uma arqueia, *Nanoarchaeum equitans*, encontrada em relação parasítica com outra arqueia, chamada *Ignococcus sp.*(HUGER *et al*, 2002). A sua filogenia foi revista quando genes codificadores de proteínas ribossomais foram empregados para análise filogenética do domínio *Archaea* (BROCHIER,FORTERRE;GRIBLADO, 2005).

A espécie *Nanoarchaeum equitans* apresenta características típicas relacionadas a seu hábito de vida – parasitismo em ambiente hipertermal- e é possível que uma dessas características seja sua rápida taxa evolutiva, que a levou a um distanciamento dessa cepa em relação às demais arqueias, quando são comparadas as sequências do gene para o rRNA 16S (Figura 10)(BROCHIER *et al.*, 2005).

### **3.8.1.1 Organismos halófilos e suas características**

Kushner em 1985 definiu os microrganismos halofílicos em diferentes categorias (Tabela 2): organismos não-halofílicos, os quais crescem em concentrações que variam entre 0 a 1 M de sal e apresentam crescimento ótimo em um meio contendo concentração menor a 0,2 M de sal; ligeiramente halófilo, são aqueles que crescem sob uma variação de 0,2 a 2 M de sal no meio de crescimento; halófilo moderado, são os microrganismos que crescem em meio contendo entre 0,4 a 3,5 M de sal e com crescimento ótimo entre 0,5 a 2,0 M de sal; halófilos extremos limítrofes, organismos que crescem entre 1,4 M a 4,0 M de sal com a taxa máxima de crescimento em 2,0 a 3,0M de sal no meio de crescimento; microrganismos halófilos extremos são os que crescem em 2,0 a 5,2 M de sal apresentando o crescimento ótimo em concentrações acima de 3M; halotolerante são aqueles procariotos que apresentam crescimento ótimo em concentrações de sal abaixo de 0,2 M e haloversatil são os que apresentam crescimento em ambientes com 0 a 3 M de sal e com crescimento ótimo em meio contendo entre 0,2 a 0,5 M de sal (KUSHNER, 1985).

**Tabela 2** - Categorias de microrganismos halofílicos

<b>Categorias</b>	<b>Variação de concentração de sal (M)</b>	<b>Concentração de sal para crescimento ótimo(M)</b>
Não-halófilas	0 - 1,0	< 0,2
Ligeiramente halófilo	0,2 - 20,	0,2 - 0,5
Halófilo moderado	0,4 - 3,5	0,5 - 2,0
Halófilo extremo limítrofe	1,4 - 4,0	2,0 - 3,0
Halofilo extremo	2,0 - 5,2	>3,0
Halotolerante	0 - 1,0	< 0,2
Haloversátil	0 - 3,0	0,2 - 0,5

Fonte: Modificado de KUSHNER (1985).

Desta forma pode-se concluir que a diferença entre microrganismos halófilos e halotolerantes é que aqueles requerem sal para crescer, enquanto que os halotolerantes são organismos capazes de crescer em diferentes concentrações de sal, mas que apresentam seu crescimento ótimo em um meio sem sal.

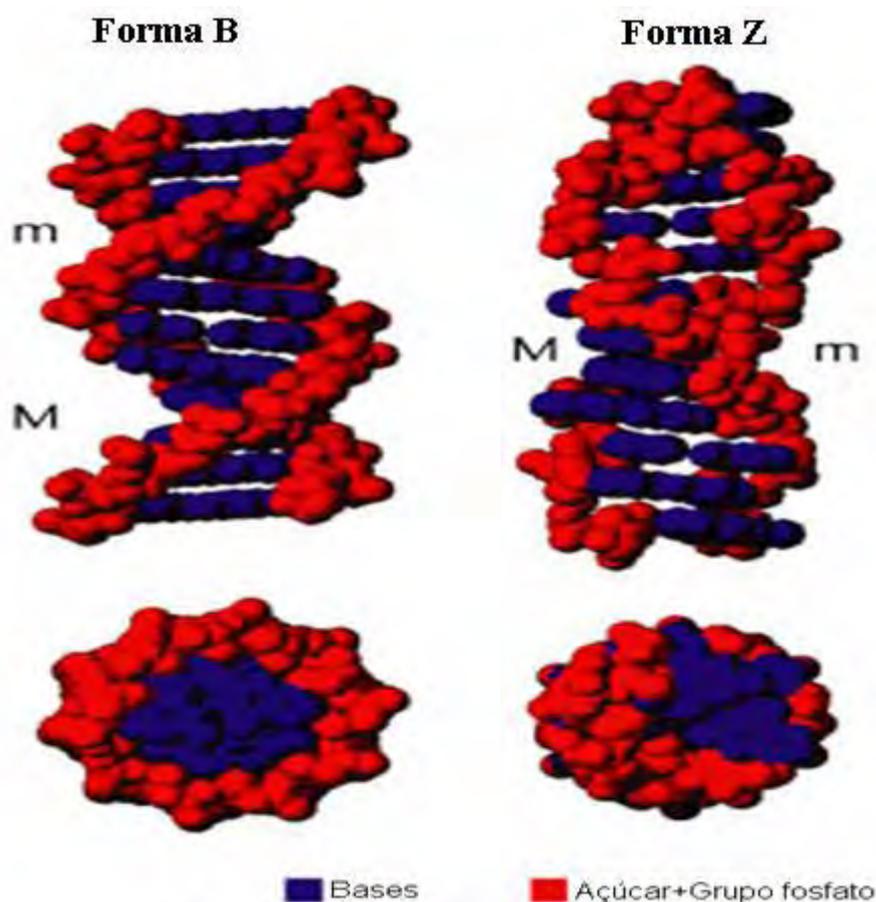
Dentro do filo *Crenarchaeota*, inserido na classe *Halobacteria* e da ordem *Halobacteriales*, encontra-se a família *Halobacteriaceae*, a qual agrupa 26 gêneros e 84 espécies de arqueias halofílicas ( International Committe on Systematics of prokaryotes) (KUSHNER,1985; GRANT *et al*, 1998). A maioria dessas arqueias requerem uma concentração mínima de 1,5M de NaCl para crescer e para manter a integridade estrutural da célula (ROSS,1981), e abaixo dessa concentração observa-se a lise celular. Para que estes microrganismos apresentem um crescimento ótimo, faz-se necessário uma concentração de 4,5M, a qual é dez vezes maior que a quantidade de sais encontrada na água do mar. (DasARMA,1995).

Análises do citoplasma de algumas halófilas obrigatórias mostraram que as mesmas apresentam uma concentração de 4M de potássio e 1M de cloreto de sódio no seu interior criando um ambiente isosmótico com o que vive. Desta forma, arqueias halofílicas não apenas adquiriram mecanismos eficientes de exclusão de sais, mas também tiveram toda a sua maquinaria metabólica e biosintética adaptadas a continuar ativa apesar do contato íntimo com sais, não acontecendo a sua desnaturação e nem a sua precipitação, o que ocorreria em proteínas convencionais (LANYI,1974).

Outra mudança observada nesses organismos é que devido ao ambiente com altas concentrações de cátions, o DNA apresenta uma variação estrutural que configura

a molécula de DNA na forma Z e não na forma B. A forma Z se distingue da forma B em diversos fatores, como o sentido da rotação que é para a esquerda, enquanto que a da forma B é a da “mão direita”; o diâmetro é mais reduzido quando comparado ao da forma B; além de ser mais alongada e mais fina. Adicionalmente, uma volta na hélice da forma B inclui doze bases, enquanto que na forma B, apenas 10,5 (Figura 13)( RICH *et al.*, 1984).

**Figura 13** - Estruturas das formas B e Z do DNA



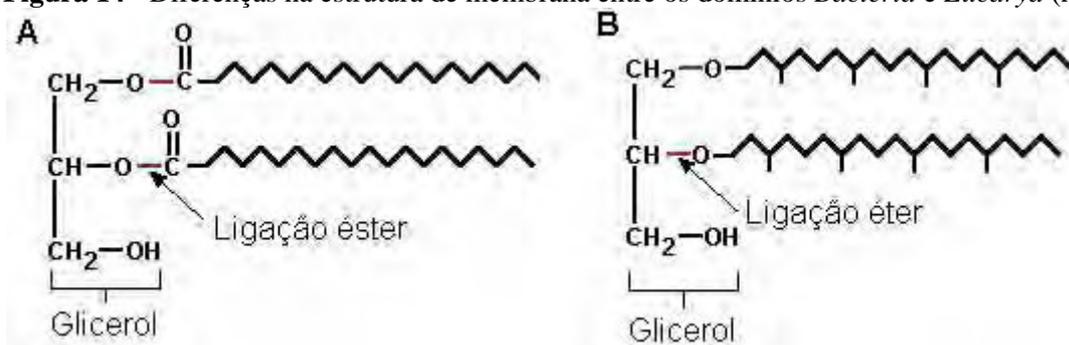
Nas figuras superiores observa-se a visão lateral de cada estrutura, enquanto que as figuras inferiores mostram a visão de cima de cada molécula. O suco maior e o suco menor estão sinalizados pelas letras M e m, respectivamente (Fonte: Extraída de <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0006002.html>)

O termo halobacteria refere-se à arqueias halófilas extremófilas de pigmentação vermelha que são membros da família *Halobacteriaceae*, a única família da ordem *Halobacteriales* (GRANT *et al.*, 1989). A família *Halobacteriaceae* é dividida em seis gêneros, incluindo quatro que crescem em pH neutro, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* e *Halococcus*, e os outros dois gêneros são *Natronobacterium* e

*Natrococcus*, que requerem condições alcalinas de crescimento. Elas são encontradas em todo o mundo em lagos hipersalinos e águas marinhas, dentre estes o mar Vermelho e o mar Morto, ambientes que suportam o crescimento de muito poucos organismos (OREN,1999).

Halobacterias podem ser diferenciadas de bactérias halófilas devido características arqueais básicas, dentre as mais importantes, pode-se citar a composição glicerolípídica da maioria dos lipídios polares das arqueias halofílicas. A diferença está no tipo de ligação que une os lipídios com a porção glicerol, onde nas bactérias encontra-se a ligação do tipo éster (Figura 14A) e nas arqueias esta é do tipo éter (Figura 14B), as quais são quimicamente mais resistentes, contribuindo para a sobrevivência de organismos deste domínio nos ambientes extremos (DAMSTÉ, 2002).

**Figura 14** - Diferenças na estrutura de membrana entre os domínios *Bacteria* e *Eucarya* (A)

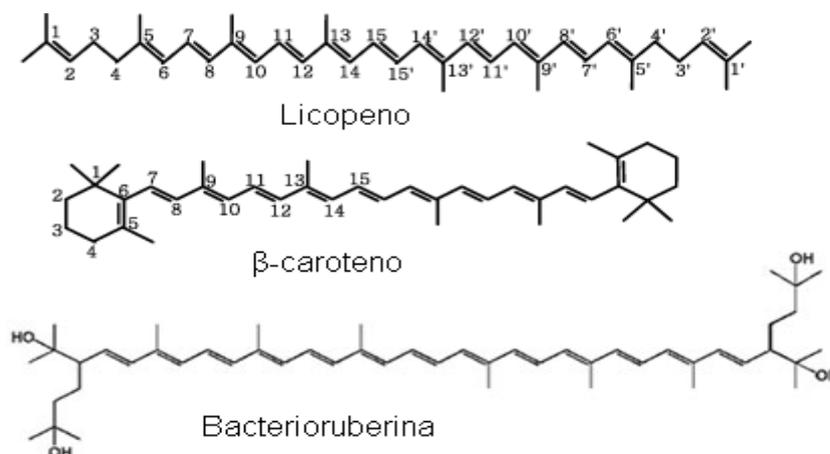


Fonte: Modificado de VALENTINE (2007).

Adicionalmente, a porção hidrocarbonada da membrana de organismos do domínio *Archaea* é baseada em subunidades isoprênicas, formando longas cadeias com várias ramificações colaterais, podendo ser encontrados anéis de ciclopropanos ou de ciclohexanos presentes (DAMSTÉ, 2002). Esta é mais uma característica contrastante com os ácidos graxos encontrados nas membranas de outros organismos, os quais apresentam cadeias sem ramificações ou anéis (DasSARMA, 1995).

Além disso, arqueias halofílicas produzem grandes quantidades de lipídios neutros em sua membrana, incluindo licopeno e o β-caroteno (precursores do retinal) e bacterioruberins, que contribuem para a coloração alaranjada desses microrganismos. O carotenóide bacterioruberin tem se mostrado necessário para a ativação do sistema de fotoreparo para desfazer dímeros de timina no DNA desses microrganismos resultantes da radiação ultravioleta (SPUDICH, 1993).

**Figura 15** - Estrutura de lipídios neutros isoprenóides de arqueias halofílicas extremas



Licopeno e β-caroteno com quarenta carbonos (C<sub>40</sub>) e bacterioruberinas com 50 carbonos. Fonte: Extraído de DasSARMA (1995).

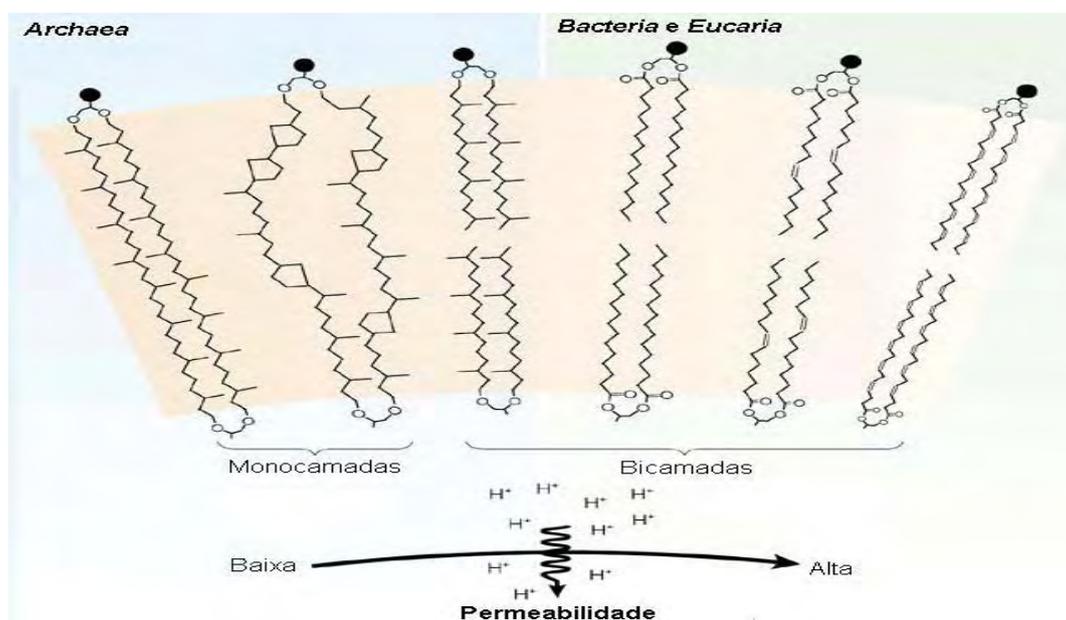
De acordo com a grande variabilidade estrutural desses lipídios, suas funções biológicas também são igualmente diversas. Alguns lipídios estão envolvidos com vários fenômenos celulares, como: receptores para toxinas, interações célula-célula ou célula-parasita, pigmentos que absorvem radiações luminosas, âncoras hidrofóbicas, podendo atuar também como mensageiros intracelulares (KOCHETKOV & SMIRNOVA, 1986; HAKOMORI, 1990; MUNNIK, 1998; MUNNIK, 2001; GRIFFITTS *et al.*, 2005) e a determinação de sua estrutura contribui para o entendimento de mecanismos associados com a halotolerância.

A partir de técnicas de caracterização estrutural, observou-se que nas membranas de arqueias havia uma estrutura comum, designada arqueol, sendo esta composta de duas cadeias de 20 carbonos ligadas ao glicerol através de ligações do tipo éter. No entanto, arqueias também podem conter lipídios com cadeias mais curtas contendo quinze carbonos (C-15), mais longas (C-25) ligadas ao glicerol (MANCUSO *et al.*, 1985; MATSUBARA *et al.*, 1994), ou ainda uma cadeia carbônica maior, de 40 átomos de carbonos, ligados através de quatro ligações éter a 2 unidades de glicerol (MACALADY *et al.*, 2004; FAHY *et al.*, 2005). Além disso, foi relatada a presença de cadeias carbônicas insaturadas nesses microrganismos (STIEHL *et al.*, 2005; GIBSON *et al.*, 2005).

A membrana plasmática observada em halobactérias pode ser constituída por uma bicamada lipídica ou pode ser substituída por lipídios organizados em uma única camada, o que contribui para um aumento na rigidez dessa estrutura, a redução da

permeabilidade a íons e, conseqüentemente, para uma maior resistência a ambientes agressivos (Figura 16)(HANFORD,2002).

**Figura 16** - Estrutura química básica de lipídios de membrana em microorganismos do três domínio da vida



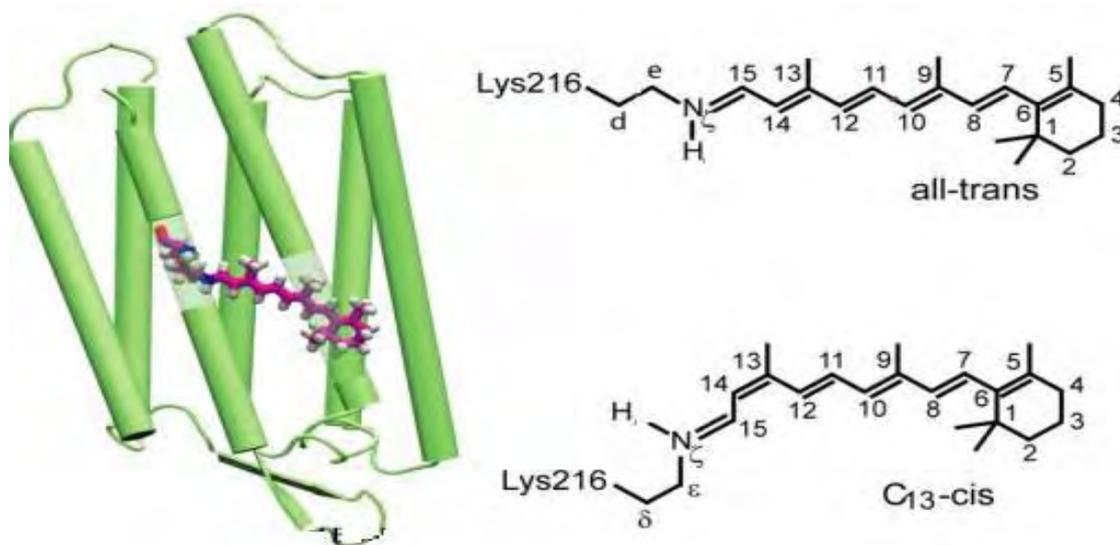
Membranas eucarióticas são semelhantes à de bactéria. Fonte: Extraído de VALENTINE (2007).

Relatando agora outras características encontradas nas arqueias que crescem em ambientes com alta concentração de sais, pode-se observar que muitas delas são fototróficas e usam a luz para produzir energia química na forma de ATP através do funcionamento de uma proteína denominada de bacteriorodopsina, esta que é bastante semelhante as rodopsinas encontradas em organismos vertebrados (KREBS & KHORANA,1993; LANYI,1993). Nas halobactérias essas bombas de íons são ativadas pela luz gerando gradientes iônicos pela extrusão de íons para fora da célula a partir da membrana plasmática. A energia armazenada nesses gradientes eletroquímicos é então convertido em ATP pela ATP sintase (KRIEG,2005). Este processo é uma forma de fotofosforilação.

Essas proteínas retiniais são intrínsecas à membrana plasmática, com um peso molecular de aproximadamente 26 kDa, compartilham uma estrutura constituída de sete hélices transmembranas, denominadas de A, B, C, D, E, F e G, sendo o poro formado entre as hélices B, C, F e G (Figura 17). A capacidade destas bombas em mover íons através das membranas depende de mudanças conformacionais geradas pela luz na estrutura de um cofactor retinal ligado ao resíduo de lisina 216 na hélice G da

bacteriorodopsina (LANYI,2004). A absorção da luz causa a fotoisomerização do retinal de trans para cis, e vice e versa, assim como o armazenamento de energia. Recentemente, diversas novas proteínas retiniais foram identificadas, incluindo a halorodopsina (OESTERHELT *et al.*,1989).

**Figura 17** - Estrutura tridimensional da bacteriorodopsina



Representação esquemática da estrutura tridimensional da bacteriorodopsina e a isomerização do retinal após absorção de luz (Fonte: retirado de <http://www.ks.uiuc.edu/Research/photodynamics>)

Outra diferença importante entre arqueias e bactérias halófilas é quanto à composição química da parede celular que, diferentemente das bactérias, as arqueias não apresentam mureína. Em nível molecular, as arqueias se distinguem das bactérias pela sua maquinaria de transcrição e tradução serem semelhantes a dos eucariotos (DasSARMA,2001), além de serem resistentes a muitos antibióticos ativos em bactérias (BROWN & DOOLITTLE, 1997; FORTERRE *et al.*, 2002).

Enfim, as arqueias apresentam características incomuns que as tornam atraentes para diferentes áreas biotecnológicas e o interesse por esses microrganismo tem crescido ao longo dos anos (DasSARMA,1995).

#### 3.8.1.1.1 *Halococcus morrhuae*

Inicialmente, Volcani em 1940 relatou a presença de vários organismos halofílicos isolados do Mar Morto e, dentre eles, o *Micrococcus morrhuae* e *Sarcina morrhuae*, considerados como espécies diferentes, mas que posteriormente foram

considerados uma única espécie denominada de *Halococcus morrhuae*.(SECKBACH, 1999).

*Halococcus morrhuae* (*H. morrhuae*) é um microorganismo halofílico extremófilo que requer uma concentração maior que 3 M de sal para seu crescimento ótimo. Apresenta uma extraordinária estabilidade osmótica, sua membrana plasmática é constituída de uma única camada com espessura de 50 a 60 nm e suas células são protegidas por uma parede celular rígida e resistente a lise. (KOCUR *et al*, 1972).

A composição da parede celular de *H. morrhuae* foi determinada qualitativa e quantitativamente por Steber e Schleifer (1975). Os resultados (Tabela 3) demonstram que glicose, manose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico; glicosamina, galactosamina; acetato, glicina e sulfatos são os seus maiores componentes (STEBER & SCHLEIFER, 1975).

**Tabela 3** - Composição química da parede celular de *Halococcus morrhuae*

Componentes	µg/mg de parede celular	µmoles/mg de parede celular
Glicose	79	0,44
Manose	63	0,35
Galactose	49	0,27
Total de açúcares neutros	191	1,06
Glicosamina	68	0,38
Galactosamina	36	0,20
Aminoaçúcares totais	125	0,69
Acetato	37	0,62
Fosfato	11	0,1
Sulfato	141	1,47
Água	150	-
Lipídios	21	-

Fonte: Modificado de STEBER & SCHLEIFER, 1975.

Algo interessante é que este mesmo estudo demonstrou que a parede celular de *H. morrhuae* é constituída, em sua maioria, por um complexo de heteroglicanos, estes que são polissacarídeos com mais de uma unidade de açúcares diferentes ligados. Além disso, pode-se ser provado que este heteroglicano encontra-se sulfatado, diferindo consideravelmente de todos os polímeros anteriormente descritos para bactérias (STEBER & SCHLEIFER, 1975). Todas essas características corroboram com a ideia

de que a parede celular tem um papel importante na manutenção da forma e rigidez da sua célula.

Outra característica de *Halococcus morrhuae* que já foi relatada e que é típica de células arqueais, é a semelhança entre a estrutura e a complexidade da enzima RNA polimerase com a observada em eucariotos (MADON,1983). Continuando as pesquisas, a nível molecular, Montero e colaboradores (1988) isolaram e caracterizaram um plasmídeo de 6 kb, assim como construíram o mapa de restrição do mesmo, presente em *Halococcus morrhuae* de maneira natural. Entretanto, diversos plasmídeos já haviam sido encontrados em outras espécies de halófilas extremas, entretanto nenhum plasmídeo ainda tinha sido descrito para *H. morrhuae*. Dentre as halobacterias que apresentam plasmídios caracterizados, pode-se citar: *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium halobium*, *Halobacterium cutirubrum*, *Haloferax vulcanii*, *Halobacterium trapanicum*, entre outros (PATON *et al.*, 1981; PFEIFER *et al.*, 1981; EBERT *et al.*,1984; TINDALL *et al.*,1984; ROSS & GRANT, 1985; GUTIKRREZ *et al.*, 1986).

Outro estudo realizado com esta espécie extremófila foi feita por Kocur e Bohacek em 1972, os quais avaliaram a composição de bases nitrogenadas do DNA de nove linhagens diferentes catalogadas com número também diferentes de *Halococcus morrhuae*, estas que apresentaram uma média de valores do seu conteúdo de guanina+citosina(G+C) entre 60,5 a 65,8%, resultando numa média de 62,6% do conteúdo total de bases nitrogenadas de seu DNA(KOCUR, 1972).

Assim, *Halococcus morrhuae* é um organismo halófilo extremo, com propriedades únicas de biocatálises e este, assim como outras halobactérias extremófilas, tem sido alvo de estudos visando à compreensão de seus mecanismos de resistência as concentrações tão altas de sal. Há uma escassez de dados literários a respeito desse microorganismo quanto a sua fisiologia e bioquímica, fazendo-se necessário mais estudos para o entendimento de suas características contribuindo para aplicações biotecnológicas futuras.

Um dessas possíveis aplicações é a descoberta de genes associados com a halotolerância, estes que poderiam ser introduzidos em plantas sem que haja a fecundação, trazendo a possibilidade de transferência de características de interesse codificadas nos genes entre organismos não relacionados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE *Halococcus morrhuae*

Os experimentos realizados neste trabalho foram feitos com um microrganismo do domínio *Archaea* conhecido como *Halococcus morrhuae*, este que é catalogado no *American Type Culture Collection* (ATCC) pelo número 17082 e foi isolado do Mar Vermelho. A cepa deste microrganismo foi adquirida liofilizada e foi revivida no meio de cultura líquido para halobactérias( Meio 1).

▪ Meio de cultura 1:

- 0,75%(v/v) de casaminoácidos;
- 1% de extrato de levedura;
- 0,3% de citrato de sódio;
- 0,2% de cloreto de sódio;
- 2% sulfato de magnésio heptahidratado;
- 0,005% de sulfato ferroso heptahidratado
- 25% de cloreto de sódio.

Em seguida, os reagentes foram diluídos em água destilada, tiveram o pH ajustado para 7,4 e o meio de cultura foi autoclavado (BOHACEK,1968).

▪ Meio de cultura 2:

- 1% de extrato de levedura;
- 0,5% de proteose peptone;
- 0,1% de glicose;
- 25% de cloreto de sódio;
- 2% de bactorágar (meio sólido)

Em seguida, os reagentes foram diluídos em água destilada, tiveram o pH ajustado para 7,4 e o meio de cultura foi autoclavado como escrito em 1988 por Ventosa e colaboradores (VENTOSA,1988).

▪ Meio de cultura 3:

- 0,1% de bifosfato de potássio;
- 0,05% de sulfato de magnésio;
- 1% de extrato de levedura;
- 25% de cloreto de sódio;
- 0,005% de sulfato de cobre pentahidratado;
- 0,45% de sulfato ferroso de amônia;
- 0,03% de sulfato de manganês;
- 4,2% de sulfato de zinco heptahidratado;
- 2% de Agar para fazer o meio sólido dessa formulação

Em seguida, os reagentes foram diluídos em água destilada, tiveram o pH ajustado para 7,4 e o meio de cultura foi autoclavado (ROBINSON,2005).

▪ Meio de cultura 4:

- 0,1% de bifosfato de potássio;
- 0,05% de sulfato de magnésio;
- 1% de extrato de levedura;
- 25% de cloreto de sódio
- 2% de Agar para fazer o meio sólido.

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada e tiveram o pH ajustado para 7 a 7,2. Em seguida, o meio foi autoclavado durante quinze minutos a 121°C (KOCUR,1973).

Alíquotas concentradas de *H. morrhuae* foram distribuídas nos meios descritos acima e colocadas para crescer a uma temperatura de 37°C sob agitação (200rpm) e/ou na estufa. As células foram incubadas a 37°C e repicados quinzenalmente para manutenção da viabilidade celular no meio de cultura ATCC 112. A linhagem de *H. morrhuae* foi mantida utilizando as técnicas de criopreservação, esta que foi realizada após o crescimento nas condições acima citadas e após esse período, acrescentou-se um volume de glicerol(50%) que totalize 25% do volume final no meio de cultura e as amostras foram mantidas a -80°C.

#### 4.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Halococcus morrhuae*

*H. morrhuae* foi cultivado em meio líquido descrito por Bohacek (1968) e aqui denominado de Meio para Halobactérias (HM). A cultura foi acompanhada diariamente e foram feitas leituras em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, EUA) até 360 horas do inóculo inicial ter sido realizado. Para uma leitura correta, a alíquota do meio de cultura a ser analisado foi vortexado durante 30 segundos e então, retirado 2µL com a qual se fez a leitura da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm. Cada dosagem no espectrofotômetro foi realizada em duplicata e a curva foi repetida em um número de três vezes.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Halococcus morrhuae* ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ E DE CONTRASTE DE FASE

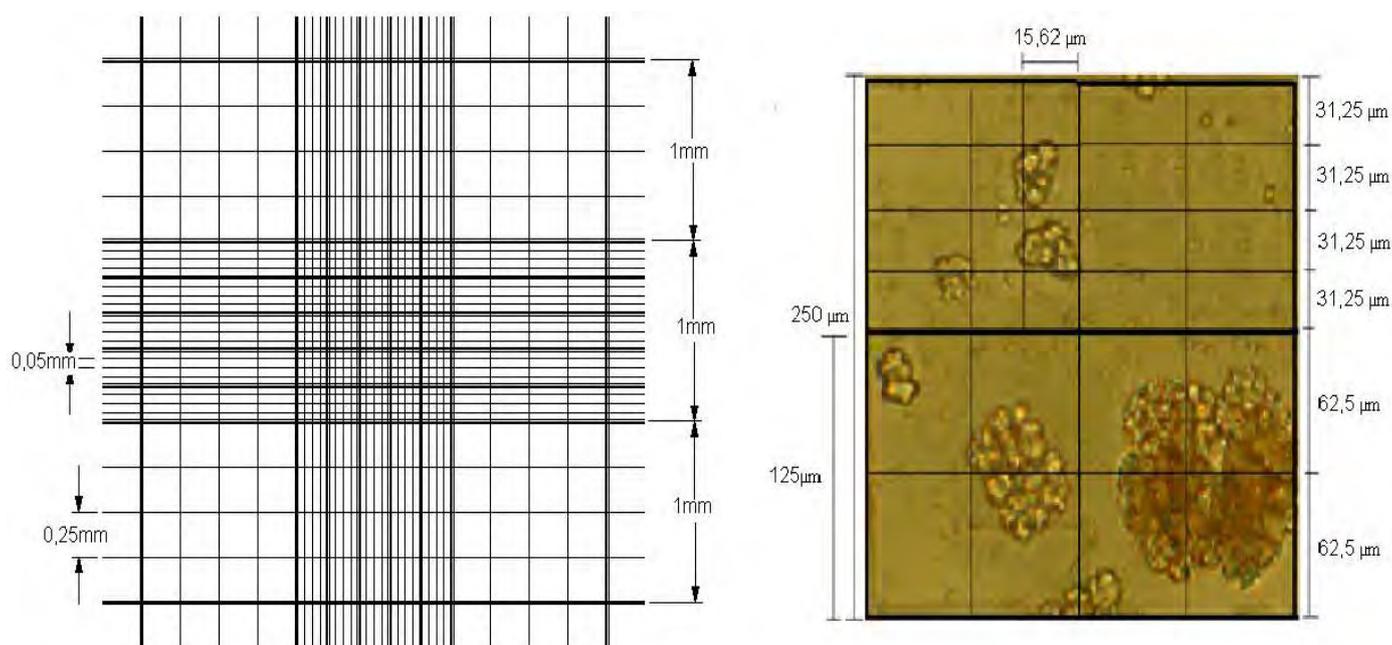
Amostras da cultura da halobactéria *H. morrhuae* cultivadas em meio só foram repassadas para o meio líquido e após uma semana de crescimento, agitou-se o enlemeyer contendo a cultura, alíquotas foram retiradas e inoculadas em lâminas histológicas contendo 100µL de água destilada e focalizadas até o aumento total de 1000x da imagem em microscópio ótico de luz e de contraste de fase.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO CULTIVO AO LONGO DA CURVA DE CRESCIMENTO

As imagens de microscopia óptica e de contraste de fase mostram que *H. morrhuae* se agregam em sarcinas de diferentes tamanhos. Objetivando acompanhar como se dava essa agregação ao longo do crescimento da cultura em meio líquido, alíquotas foram observadas e quantificadas em câmara de Neubauer através de microscopia óptica de luz em um aumento total de 200x.

Analisando o esquema de quadrantes apresentados na Figura 18, pode-se perceber que cada quadrante da câmara hemocimétrica de Neubauer tem 1mm<sup>2</sup> de área, este que é composto por 16 quadrados, tendo cada um 6250µm<sup>2</sup> de área total. Desta forma, é possível fazer uma correlação aproximada dos tamanhos dos agregados, correlacionando-os com as marcações da câmara hemocimétrica de Neubauer. Essa quantificação foi realizada durante os quinze dias da curva de crescimento.

**Figura 18** - Medidas de comprimento da câmara de Neubauer(A) com os agregados de *H.morrhuae* (B) durante a curva de crescimento.



Fonte: PRISCILLA ANNE (2010)

Os agregados também foram medidos utilizando um medidor de comprimento de estruturas microscópicas acoplado à lente objetiva do microscópio de luz (lente hemocimétrica), como um método de confirmação das proporções geradas com a câmara de Neubauer e essas correlações de preenchimento dos quadrados da câmara e o comprimento dos agregados estão resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Correlação dos tamanhos dos agregados com as marcações presentes na câmara de Neubauer

TAMANHOS	PREENCHIMENTO DO QUADRADO (%)	COMPRIMENTO
Muito pequeno	0 – 7%	0 a 22μm
Pequeno	8 – 30%	23 a 43μm
Médio	31 – 65%	44 a 64μm
Grande	66 – 100%	65 a 85μm
Muito grande	Maior que o tamanho do quadrado	≤ 86μm

#### 4.5 EXTRAÇÃO DOS LÍPÍDEOS E PIGMENTOS DA ARQUEIA *H. morrhuae* E SUA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

*H. morrhuae* foi cultivado durante dez dias e seu conteúdo foi centrifugado para se obter um pellet de 2g de células sem meio de cultura. Em seguida foi acrescentado metanol-clorofórmio em uma proporção de 2:1(v/v) e esse conteúdo foi mantido sob refluxo a 60°C por duas horas (2 vezes) (Figura 19). Os extratos foram combinados, concentrados e analisados por placa cromatográfica de sílica-gel 60G (Merck) e corados com reagente de molibdênio (7g Ácido fosfomolibidênio em 100mL de etanol) (DITTMER & LESTER, 1964).

**Figura 19** – Sistema de refluxo usado no processo de extração lipídica de *H. morrhuae*



Foto: PRISCILLA ANNE (2010)

Para as análises das placas cromatográficas, foram utilizados os seguintes eluentes:

- a) Clorofórmio/metanol/90% ácido acético (65:4:3,5 por volume)
- b) Clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio concentrado (65:35:5 por volume)
- c) Clorofórmio/metanol/ácido acético/água (85:22,5:10:4 por volume)
- d) Etil éter/hexano (0,25 : 99,75 v/v)
- e) Etil éter/hexano (1 : 99 v/v)
- f) Etil éter/hexano (6 : 94 v/v)
- g) Etil éter/clorofórmio (0,5 : 99,5 v/v)
- h) Etil éter/clorofórmio (1 : 99 v/v)
- i) 5% de acetona em benzeno

- j) 7% de acetona em benzeno
- k) 35% de acetona em benzeno
- l) 50% de acetona em benzeno
- m) 7% metanol em clorofórmio

Após as placas terem sido eluídas, elas foram coradas com reagente molibdato e os valores de retenção foram calculados.

#### **4.5.1 Esterificação do extrato lipídico de *H. morrhuae* para injeção no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas**

No extrato bruto de lipídios, originado do cultivo de *H. morrhuae*, foram detectadas várias manchas nas placas cromatográficas o que pode representar compostos diferentes. Desta forma, esterificou-se o extrato para que houvesse a redução da polaridade do extrato para injeção no cromatógrafo gasoso.

A metodologia utilizada para a esterificação das amostras inicia-se com a pesagem de 100 mg de lipídios em um tubo de ensaio e a adição de 4mL de Hidróxido de sódio(0,5 N) em metanol e o posterior aquecimento do tubo a 60°C em banho-aquecido, até dissolver os glóbulos de gordura e a solução ficar transparente.

Em seguida, esfriou-se o tubo sob água corrente e depois, adicionou-se 5mL do reagente esterificante (1g cloreto de amônio; 30mL de metanol; 1,5mL de ácido sulfúrico) e vortexou-se o tubo. Este foi aquecido em água fervente durante 5 minutos e esfriado em água corrente.

Adicionou-se 5mL de hexano absoluto e agitou-se no vórtex por 90 segundos. Acrescentou-se sulfato de sódio suficiente para a retirada da água, agitou-se e transferiu-se a fase do hexano para um novo balão. O extrato foi rotaevaporado, dissolvido em 100µL de hexano e injetado no cromatógrafo gasoso.

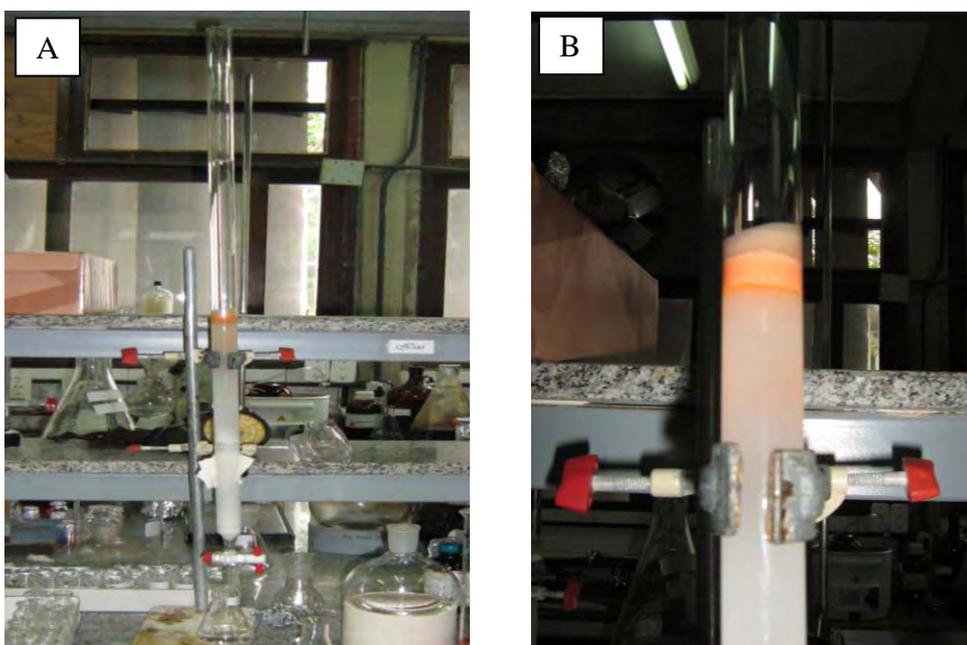
A detecção por massas foi feita através de ionização eletrônica (70 eV) e analisador do tipo *quadrupole*. A temperatura do injetor foi mantida em 240 °C e Hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,1 mL/min. A rampa de aquecimento do cromatógrafo gasoso apresentou uma temperatura inicial de 120°C durante 5 minutos, aumentando de dez em dez graus até alcançar 260°C, na qual permaneceu por cinco minutos. Em seguida, a temperatura chegou a 330°C, aumentando de 35 em 35 graus e nesta temperatura permaneceu por dois minutos.

A análise dos compostos foi realizada pelos respectivos tempos de retenção, espectro de fragmentação de massas, e, em alguns casos, por comparação com padrões autênticos, ou pela biblioteca de massas NIST (*National Institute of Standards and Technology*) conforme será descrito nos resultados.

#### 4.5.2 Fracionamento e purificação do extrato lipídico de *Halococcus morrhuae* por cromatografia líquida em coluna de sílica

As análises realizadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas mostraram que existiam vários compostos diferentes com tempos de retenção e massas moleculares distintas. Desta forma, o extrato bruto não-esterificado foi submetido ao fracionamento e purificação desses compostos em coluna (30 x 2 cm) contendo sílica-gel 60G (Merck, EUA), eluída com hexano/acetato de etila, com gradiente crescente de polaridade (5,10,15,20,30,40,50,70 e 100% v/v) de acetato em hexano. Após a utilização do sistema hexano:acetato de etila, passou-se a fazer uso do sistema metanol em acetato, com gradiente crescente do metanol (5,10 e 30% de metanol em acetato v/v) (Figuras 20 e 21).

**Figura 20** - Coluna de sílica gel utilizada na separação dos lipídios e pigmentos de *H.morrhuae*(A) e detalhe do extrato bruto alaranjado



Fotos: PRISCILLA ANNE (2010)

**Figura 21** – Concentração das frações obtidas na cromatografia em coluna de sílica gel em rotaevaporador



Foto: PRISCILLA ANNE(2010)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) foram obtidos em espectrômetro da marca MERCURY-VARIAN operando a 200 MHz ( $^1\text{H}$ ).

As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se em solvente deuterado da Cambridge Isotope Laboratories ( $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de  $^1\text{H}$  pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas deste solvente: clorofórmio ( $\delta\text{H}$  7,24), metanol (dH 3,30 ppm).

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE *Halococcus morrhuae*

A halobactéria *Halococcus morrhuae* foi colocada para crescer em meio líquido sob agitação a  $37^\circ\text{C}$  durante três dias. Em seguida, a cultura foi aliquoteada em tubos de plástico estéreis, contendo cada tubo 1,5mL da suspensão e centrifugado durante cinco minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 0,5mL de tampão de extração (20 mM Tris pH = 7,5; 25 mM EDTA; 75 mM NaCl e 1/10 volume de SDS 10%) e posteriormente, centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 540  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (TE) e adicionou-se 25 $\mu\text{L}$  de lisozima que estava numa concentração de 10mg/ml. Adicionou-se 30 $\mu\text{L}$  de SDS a 10% e 2  $\mu\text{L}$  de RNase a 10 mg/ml e incubou-

se durante uma hora em banho-maria a 37°C. Posteriormente, acrescentou-se 3µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubado durante uma hora a 37°C em banho-maria. Logo após, adicionou-se 100 µL de cloreto de sódio a 5 M e misturou-se de forma suave. Em seguida, adicionou-se 80 µL de solução pré-aquecida de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) constituída por CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM e β-mercaptoetanol 0,2% (v/v).

Adicionou-se 800µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturou-se de forma cuidadosa. Centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Transferiu-se a fase superior de cada amostra para um novo tubo de plástico estéril e adicionou-se 700µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e misturou-se por cinco minutos por inversão. Centrifugou-se, novamente, a 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo de plástico estéril e foi adicionado 300µL de isopropanol gelado em cada amostra e misturado.

Por fim, cada tubo foi centrifugado a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 80% gelado ao precipitado e misturou-se por inversão. Centrifugou-se a 12.000 rpm durante 5 minutos à 4°C e o precipitado foi seco a temperatura ambiente dentro do fluxo laminar. Em seguida, acrescentou-se 20µL de tampão de extração e o DNA foi guardado no freezer a -20°C. Todas as amostras de DNA foram quantificadas quanto a sua concentração e pureza através do espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific).

#### 4.7 PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GENÔMICAS COM O VETOR BLUESCRIPT

##### **4.7.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* linhagem MC1061 e XL1-Blue**

Uma colônia de *Escherichia coli* (*E. coli*) foi utilizada para fazer o pré-inóculo em 100mL do meio 2xYT (5g NaCl; 16g triptona; 10g extrato de levedura e 1L de água destilada) e foram mantidas no shaker a 37°C por 16 horas. No dia seguinte, 10mL da cultura foi repassada para 1litro do meio de cultura 2xYT e crescidas até obterem a densidade ótica (DO) de 0,2 a 0,25 no comprimento de onda de 600nm. Após ser

alcançada a densidade ótica, o recipiente contendo o meio de cultura foi colocado no gelo durante 1 hora.

Em seguida, dividiu-se o conteúdo em seis garrafas contendo 150mL e centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado imediatamente, o pellet ressuspense em 50mL de glicerol (10%) e todo o conteúdo foi dividido apenas em duas garrafas. Logo depois, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm e a 4°C e depois, cada pellet foi ressuspense em 100mL de glicerol 10% e esse procedimento é repetido mais uma vez. Após a segunda ressuspensão com 100mL de glicerol a 10%, a suspensão foi centrifugada e ressuspense em 50mL de glicerol 10% e todo o conteúdo foi colocado em um única garrafa.

Posteriormente, fez-se a última centrifugação a 10.000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o conteúdo foi ressuspense em 1mL de glicerol 10%. Retirou-se 25µL da suspensão e adicionou-se em 10mL de glicerol e a densidade ótica da suspensão foi determinada a 600nm no espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific). Quando a densidade foi maior que 0.15, acrescentou-se mais glicerol até que fosse alcançada essa densidade. O conteúdo foi alíquotado em tubos de plástico estéreis contendo cada um 40µL e congelado rapidamente em gelo seco e estocado a -80°C.

#### **4.7.2 Caracterização do crescimento da linhagem MC1061, XL1-Blue e DH5α de *Escherichia coli* nas diferentes concentrações de cloreto de sódio**

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada como modelo de célula procariótica para a biblioteca utilizando células eletrocompetentes e o plasmídeo Bluescript foi a DH10B e XL1-Blue, gentilmente cedida pela Professora Mônica Buciarelli Rodriguez do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Por outro lado, as bibliotecas genômicas construídas com o vetor pJET e células quimiocompetentes foram feitas com a linhagem DH5α, gentilmente cedida pelo Professor Dr. Demétrius Araújo do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba.

O crescimento das linhagens MC1061, XL1-Blue e DH5α de *E. coli* foi observado em diferentes concentrações de cloreto de sódio, tendo como objetivo verificar a concentração ideal para a seleção dos recombinantes contendo gene(s) adaptação à halofilia. Para tanto, preparou-se o meio Nutriente ágar, com os seguintes componentes: 0,8% de caldo nutriente e 1,5 % de ágar, além das diferentes

concentrações de cloreto de sódio, que foram de 0% para o grupo controle e 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 ou 7,5% para os grupos experimentais.

Paralelamente, duas colônias de cada linhagem de *E.coli* foi cultivada *overnight* em 300mL, dividido em dois frascos, de meio líquido Luria-Bertani (LB) constituído por 1% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio. As culturas foram mantidas a 37°C sob agitação a 180 rpm. Passado esse tempo, as culturas foram centrifugadas por dez minutos a 14.000 rpm e os pellets foram reunidos em um único tubo falcon e ressuspensos em 2ml de meio LB.

Posteriormente, o tubo foi vortexado durante 30 segundos e foram preparadas placas para o controle positivo, das quais a metade tiveram um inóculo de 10 µL, e na outra metade o inóculo foi de 100 µL. A cultura utilizada para o controle foi diluída 100.000.000 vezes. As placas foram acompanhadas diariamente e foi realizada a contagem de colônias e/ou microcolônias presentes nas mesmas até quinze dias depois do cultivo inicial nas placas com cloreto de sódio.

#### **4.7.3 Digestão parcial do DNA de *Halococcus morrhuae* com a enzima de restrição EcoRI**

Após as amostras com DNA total de *Halococcus morrhuae* terem sido preparadas e quantificadas, o próximo passo foi a clivagem do DNA com a endonuclease EcoRI. A enzima cliva em sequências GAATTC, numa proporção de 1µg de DNA para cada 1U da enzima, criando extremidades coesivas. Para a digestão com esta enzima, foi colocado em um tubo de plástico 3 µL do tampão da enzima (10X), 10 µL do DNA de *H. morrhuae* ( $\approx 5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 16µL de água milliQ para completar o volume e 1 µL da enzima EcoRI e em seguida, levou-se a amostra para o banho-maria por dez horas a 37°C.

#### **4.7.4 Eletroforese unidimensional**

O método de eletroforese é utilizado em várias etapas neste estudo. A primeira é para observação da extração de DNA total de *Halococcus morrhuae* e, posteriormente, foi utilizado para visualização da digestão parcial do DNA da arqueia com *EcoRI*. Para tanto, fez-se necessário a preparação do gel de agarose a 1% em Tampão TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 1X, constituído por 0,04M de Tris-Acetato e 0,001M de EDTA,

adicionado a brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O marcador molecular utilizado foi o Gene Ruler™ 1Kb DNA ladder da Fermentas.

#### **4.7.5 Excisão e purificação das bandas de 1,5 - 2Kb e 2 - 4Kb de *H. morrhuae* em gel de agarose**

O DNA de *H. morrhuae* após ser digerido, foi colocado em uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% no qual foi excisado do gel com bisturi as bandas com peso molecular aproximado entre 1,5 e 2Kb, por apresentarem tamanho aproximado de um gene. Adicionalmente, foi retirado do gel as bandas com peso molecular de 2 a 4Kb, com o intuito de isolar um operon inteiro. Em seguida, as bandas foram purificadas com o kit de extração de DNA#K0513 (Fermentas Life Science) e sua concentração foi dosada em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermal Scientific).

#### **4.7.6 Digestão do vetor com enzima de restrição *EcoRI***

As bibliotecas genômicas foram construídas neste estudo através de duas metodologias diferentes. Na primeira, o vetor utilizado foi o plasmídeo de expressão pBluescript pSK (Figura 22) e a enzima utilizada para sua digestão foi a mesma utilizada para digestão do DNA da arqueia, a *EcoRI*. Para tanto, foi utilizado 1 µL do vetor (≈ 50 ng/ µL); 1 µL da *EcoRI*; 2 µL do Tampão Multi Core da enzima e o volume foi completado com água ultrapurificada até 20 µL. Em seguida, esse conteúdo foi mantido a 37°C durante seis horas em banho-maria.



necessário digerir novamente o plasmídeo, uma vez que as colônias cresceriam na presença de ampicilina. Para que a eletroporação fosse realizada fez-se necessário o inóculo de 1 $\mu$ L da reação inserto: vetor a uma amostra de 50 $\mu$ L de células eletrocompetentes de *E. coli* MC1061 ou XL1-Blue. Em seguida, esse conteúdo foi transferido para uma cubeta pré-resfriada de 0,2cm e as células foram submetidas a uma descarga elétrica de 2,5 kV, por 2,5 mseg, em eletroporador BIORAD. Imediatamente após o choque, adicionou-se 1mL de meio SOC (2% Triptona; 0,5% de extrato de levedura; 10mM de cloreto de sódio; 2,5mM de cloreto de potássio; 10mM de cloreto de magnésio; 10mM de sulfato de magnésio e 20mM de glicose) e incubou-se em banho-maria a 37°C por 1 hora. Passado esse tempo as células foram plaqueadas em meio LB suplementado com Ampicilina como descrito acima.

#### **4.7.9 Tratamento do vetor com fosfatase alcalina**

Após a digestão do vetor pBluescript SK- com a endonuclease EcoRI, e o isolamento do vetor linearizado, o plasmídeo foi tratado com fosfatase alcalina para evitar a religação das suas extremidades, o que impediria a ligação do DNA de *Hc. morrhuae* no plasmídeo de expressão. A desfosforilação foi realizada utilizando 1 $\mu$ L da enzima CIP- Calf Intestine Phosphatase numa concentração de 5U/ $\mu$ L; 2 $\mu$ L do tampão da enzima que estava concentrada em 10x; acrescentou-se 1 $\mu$ L do vetor e completou-se o volume de 20 $\mu$ L, adicionando-se 16 $\mu$ L de água milliQ. Em seguida, o conteúdo presente no tubo de plástico estéril foi misturado e dado um spin de 13.000 rpm por cinco segundos. Logo após, incubou-se durante 10 minutos a 37°C no banho-maria e colocado a 75°C por cinco minutos. Por fim, a concentração do plasmídeo foi dosada no Nanodrop.

#### **4.7.10 Teste para avaliar a desfosforilação do vetor pBS**

Após conseguir o vetor linearizado de forma adequada, fez-se o tratamento com a fosfatase alcalina e em seguida, eletroporou-se o plasmídeo em células MC1061 ou XL1-Blue com esse vetor já linearizado e desfosforilado. O objetivo desse teste foi avaliar se a desfosforilação do plasmídeo teria acontecido como esperado. Caso fosse observadas colônias nas placas contendo as células eletroporadas, era possível concluir

que a desfosforilação não se deu de maneira correta, pois o vetor estaria circular, conferindo a resistência à Ampicilina.

Ao final desses dois testes, o vetor apresentava-se totalmente linearizado e desfosforilado como necessário para iniciar a construção da biblioteca genômica.

#### 4.7.11 Ligação do DNA de *H. morrhuae* ao vetor pBluescript

A ligação do DNA de *Halococcus morrhuae* ao plasmídeo pBluescript foi realizado tanto com o DNA que tinha um peso molecular que variava de 1 a 2Kb, quanto com o DNA das bandas que ficaram entre 2 e 4Kb. Para tanto, em um tubo plástico estéril foi colocado 1µL da enzima T4-ligase (3U/µl), juntamente com 1 µL do tampão da enzima (10x), 1µL do DNA digerido com EcoRI ( $\approx 1\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 7µl do plasmídeo ( $\approx 100\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e o volume foi completado para 10µL com água milliQ. Posteriormente, o tubo de plástico contendo todos esses reagentes foi mantido a 16°C durante 16 horas.

O cálculo do inóculo utilizado na reação de ligação foi feito pela seguinte fórmula e a taxa molar do inserto:vetor utilizada neste estudo foi de 3:1.

$$\frac{\text{Concentração do vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (Kb)} \times \text{Taxa molar do inserto / vetor}}{\text{Tamanho do vetor (Kb)}} = \text{ng do inserto}$$

#### 4.7.12 Transformação das células eletrocompetentes com plasmídeo pBluescript contendo inserto de *Halococcus morrhuae*

A transformação tem como objetivo a introdução do plasmídeo pBluescript contendo inserto de *H. morrhuae* para o interior de bactérias eletrocompetentes, tornando-as geneticamente modificadas. Para a transformação com pBluescript foram utilizadas as linhagens de *Escherichia coli*, a MC1061 e o método utilizado foi o de eletroporação, na qual pulsos deletromagnéticos tornam permeável reversivelmente a membrana plasmática, permitindo que o plasmídeo contendo o inserto possa ser transportado para dentro da célula de *Escherichia coli*.

Para tanto, descongelou-se as células eletrocompetentes no gelo e, em seguida, inoculou-se 1 µL do plasmídeo pBluescript contendo o inserto de DNA de *H. morrhuae* a 40 µL de células de eletrocompetentes e a amostra foi incubada no gelo durante ci:

minutos. Posteriormente, transferiu-se o conteúdo para uma cubeta de eletroporação de 2mm estéril e previamente resfriada. Logo após, foi dado um pulso no eletroporador com 2500 volts. Imediatamente após o choque, a cubeta foi removida do aparelho e adicionou-se 1mL de meio SOC e o conteúdo foi transferido para um novo tubo de plástico, o qual foi mantido a 37°C no banho - maria por uma hora. Alíquotas foram retiradas e foram plaqueadas em meio LB para o controle e meio ágar nutriente contendo 6% de cloreto de sódio para selecionar os transformantes.

#### 4.7.13 Teste para avaliar eficiência da transformação

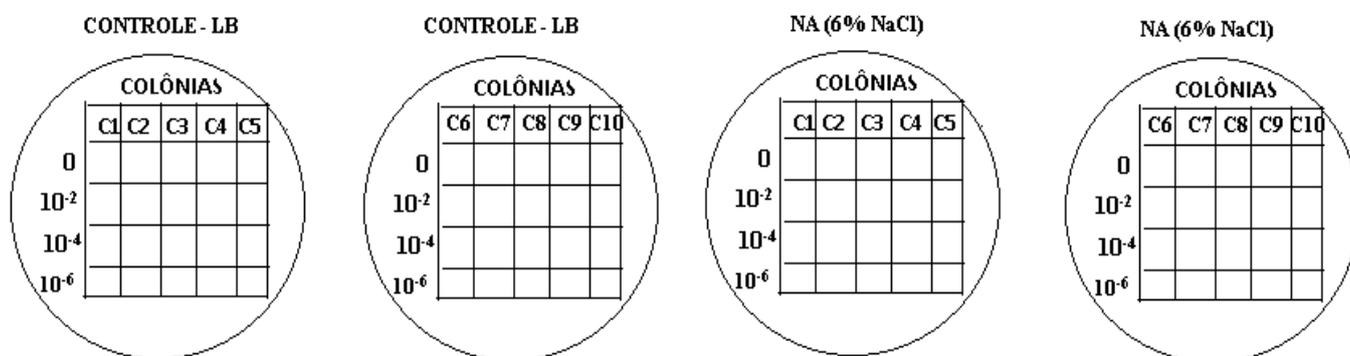
A eficiência das células eletrocompetentes em colocar o DNA exógeno para o seu citosol foi realizado utilizando o protocolo de transformação por eletroporação com o vetor PUC-19 fechado. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB com adição de ampicilina (100µg/mL). O cálculo para este parâmetro é feito da seguinte maneira:

$$\text{Eficiência da transformação} = \frac{\text{Nº de transformantes/mL}}{\text{1 nanograma de DNA}}$$

#### 4.8 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM INSERTO DE *H. morrhuae* CAPAZES DE CRESCER EM 6% DE CLORETO DE SÓDIO

Após a introdução do plasmídeo contendo o inserto de *H.morrhue* dez colônias apresentaram capacidade de crescer em meio Nutriente ágar contendo 6% de cloreto de sódio, ampicilina e Isopropil β-D1 Tiogalactopiranosídeo (IPTG). Com esse resultado, foi realizada uma transferência dessas colônias para o meio LB suplementado com ampicilina e após 24 horas, essas colônias foram repassadas para o meio nutriente ágar contendo 6% de cloreto de sódio, ampicilina, com e sem IPTG, enquanto que o controle foi realizado em meio LB suplementado com ampicilina, mas com uma concentração 0,5% de cloreto de sódio. As culturas foram plaqueadas sem diluição e com diluições de 100 (10<sup>-2</sup>), 10.000 (10<sup>-4</sup>) e de 1.000.000 (10<sup>-6</sup>) vezes. Os inóculos foram de 3µL de meio líquido contendo a correspondente colônia e com as sucessivas diluições. Em cada placa de petri foram colocadas cinco colônias diferentes como mostrado no esquema abaixo (Figura 23).

**Figura 23** - Esquema das placas contendo transformantes crescidos em 6% de cloreto de sódio e cultivados sem diluições e com diluições de 100 ( $10^{-2}$ ), 10.000 ( $10^{-4}$ ) e de 1.000.000 ( $10^{-6}$ ) vezes.



#### 4.9 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIANO- MINIPREP

A metodologia de miniprep tem como objetivo a extração rápida dos plasmídios que foram anteriormente introduzidos em *E. coli* por eletroporação. Esses plasmídios serão, posteriormente, introduzidos em novas células eletrocompetentes visando a confirmação de que seja o vetor, contendo o inserto, o responsável pela bactéria adquirir resistência à salinidade e conseguir crescer significativamente em concentrações relativamente altas de cloreto de sódio. Para a obtenção dos plasmídios, a colônia de *E. coli*, transformada e crescida em meio ágar nutriente contendo 6% de NaCl, foi cultivada em meio LB com ampicilina por 16 horas, a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi aliquoteada em tubos plásticos estéreis e centrifugou-se por cinco minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensão em 200µL de solução de ressuspensão (25 mM Tris-HCl, pH=8; 10 mM EDTA e 50 mM de glicose) e vortexado até a completa ressuspensão das bactérias. Em seguida, foi acrescentado 5µL de RNase, 200µL do Tampão de lise (0.2 N NaOH e 1% SDS) e todo o conteúdo foi vortexado. Logo após, centrifugou-se todas as amostras por cinco minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Precipitou-se o DNA com 500µL de isopropanol 100% e os tubos foram mantidos por 90 minutos a -20°C. Logo após a precipitação do DNA, homogeneizou-se o conteúdo por inversão e foi realizada uma centrifugação por cinco minutos a 13.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70% e centrifugado cinco minutos a 13.000 rpm e, novamente, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi colocado para secar a 55°C no banho seco até não ser visto nenhum resquício de

etanol 70%. Logo após, o precipitado foi ressuspensão em 30µL de água milliQ estéril e o conteúdo foi homogeneizado. Posteriormente, os tubos contendo o pellet ressuspensão foi colocado no banho-maria a 37°C durante trinta minutos e foi feita uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% para analisar se a extração plasmidial ocorreu de maneira adequada.

#### 4.10 PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA A CLONAGEM MOLECULAR UTILIZANDO O VETOR pJET

##### 4.10.1 Preparo de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* linhagem DH5α

Uma colônia de *Escherichia coli* (*E. coli*) linhagem DH5α, foi utilizada para fazer o pré-inóculo em 2mL do meio SOB (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub> e pH ajustado para 6,8) e foram mantidas no shaker sob agitação de 150rpm a 37°C por 2 horas. Em seguida, adicionou-se os 2mL do crescimento bacteriano a 50mL de meio SOB, deixando nas mesmas condições anteriormente citadas até alcançar a densidade ótica de 0,5-0,6 no comprimento de onda de 600nm. Após este período, adicionou-se 500µL de MgCl<sub>2</sub> e colocou-se o tubo no gelo durante quinze minutos. Centrifugou-se o conteúdo a 3000rpm por dezessete minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 15mL da Solução I (30mM acetato de potássio; 50mM MnCl<sub>2</sub>; 100mM KCl; 10mM ClCa<sub>2</sub> e 15% de glicerol) e foram mantidas no gelo por 10 minutos. Centrifugaram-se os tubos a 3000rpm durante dezessete minutos a 4°C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 2mL de solução II (10mM Na-MOPS pH 7,0; 75mM CaCl<sub>2</sub>; 10mM KCl e 15% de glicerol). Aliquotou-se 50µL das células em tubos novos e as amostras foram armazenadas a -80°C.

##### 4.10.2 Amplificação do gene dos antiportes Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e visualização em gel de agarose

Os genes dos antiportes Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> foram amplificados utilizando primers específicos de *Haloferax volcanii*. As sequências de bases nitrogenadas do primeiro antiporte foram: 5' AGT CCG TTT TCT GAG TGG TTG C 3' (forward) e 5'

GTC GGG TTT TTT CTC ACC G 3' (reverse), enquanto que para o segundo contra-transportador a sequência dos primers foram: 5' AAC GTC CAG CCG GCC AAG AG3' (*forward*) e 5' CAG TCA AGC TCT GAC AAA CG3' (*reverse*).

As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas utilizando cerca de 100 ng/ $\mu$ L de DNA total de *Halococcus morrhuae*; 4,0  $\mu$ L de tampão de reação 10X; 2  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (25mM); 4  $\mu$ L de dNTPs (2mM); 1,6  $\mu$ L de cada *primer* (10pmol); 2  $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu$ L), e água ultrapurificada estéril para um volume final de 40  $\mu$ L. A amplificação ocorreu em termociclador (Perkin Elmer), com as seguintes etapas: 94°C por 5 min, 30 ciclos (94°C por 1 min, 52°C por 1 min e 72°C por 1 min) para o primeiro antiporte e 30 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min) para a amplificação do segundo antiporte, com extensão final para ambos a 72°C por 10 min e manutenção a 4°C por no mínimo 15 min. A visualização da amplificação dos genes dos antiportes acima citados foi realizada em gel de agarose (1%) em tampão TAE (Tris-ácido acético-EDTA) 1X, contendo brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL).

#### 4.10.3 Purificação dos produtos de PCR dos antiportes

Para a remoção de fragmentos pequenos de DNA e dímeros de primers, sais e enzimas que ainda restavam no tubo contendo os produtos de PCR já amplificados, utilizou-se o kit Nucleo Spin Extract II (Machery Nagel) e o protocolo utilizado foi como descrito pelo próprio fabricante.

#### 4.10.4 Clonagem dos produtos de PCR no vetor pJET

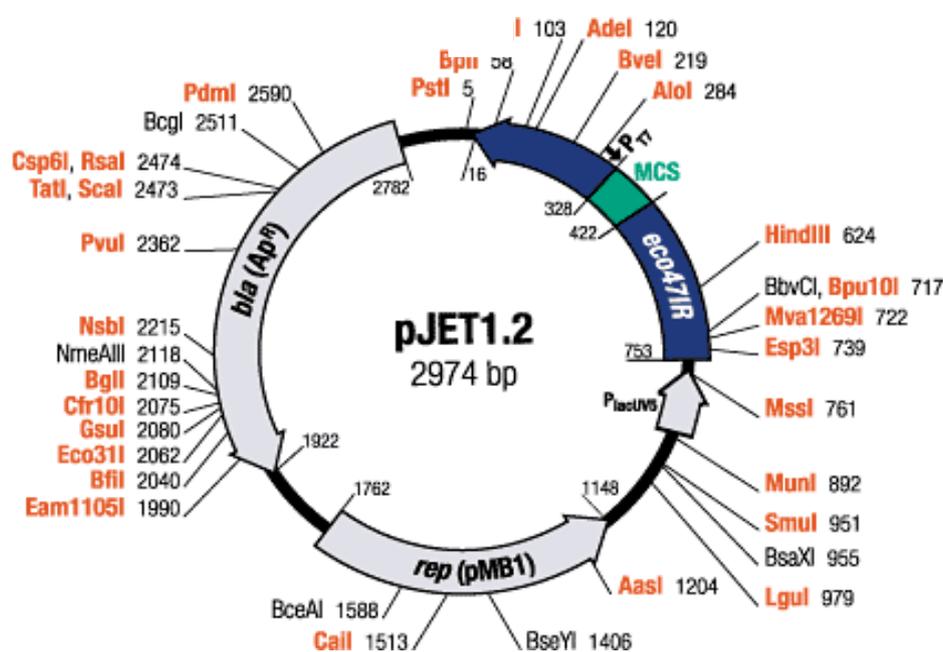
##### 4.10.4.1 Reação de corte de produtos de PCR em extremidades cegas

Os produtos da PCR dos antiportes  $Na^+/Ca^{2+}$  e  $Na^+ / H^+$  foram clonados no vetor pJET 1.2/Blunt (Fermentas), conforme instruções do fabricante. Para tanto, o primeiro passo foi gerar as extremidades cegas nos produtos de PCR através de uma reação contendo 10  $\mu$ L Tampão da reação (2x); 2  $\mu$ L do produto de PCR (100 ng/  $\mu$ L); 5  $\mu$ L de água nuclease free e 1  $\mu$ L da enzima de restrição. Todo esse conteúdo foi vortexado e centrifugado por 5 segundos a 14.000 rpm. Em seguida, o tubo plástico com todo o conteúdo foi incubado a 70°C por 5 minutos e esfriado no gelo, brevemente.

#### 4.10.4.2 Ligação dos produtos de PCR ao vetor pJET 1.2

A reação de ligação do produto da PCR ao vetor pJET 1.2 (Figura 24) foi montado da seguinte maneira: acrescentou-se 1µL do vetor de clonagem e 1µL da T4 DNA Ligase (3 U/µL) e 18 µL da mistura de reação que houve o corte dos produtos de PCR em extremidades cegas, totalizando um volume final de 20 µL. Agitou-se o conteúdo brevemente e o mesmo foi centrifugado durante 5 segundos a 14.000rpm. Depois incubou-se a mistura de ligação a temperatura ambiente por trinta minutos.

**Figura 24-** Mapa genético do vetor pJET 1.2.



Fonte: Fermentas Molecular Biology Tools

#### 4.10.5 Transformação por choque térmico

Após a ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo, uma amostra de células quimiocompetentes foi descongelada, acrescentou-se 3 µL da reação de ligação do plasmídeo com o inserto e incubou-se por 20 minutos no gelo. Passado os vinte minutos, colocou-se o tubo de plástico com as células competentes por 90 segundos em um banho-maria a 42°C e esfriou--a no gelo por 2 minutos. Em seguida, foi acrescentado 950 µL de meio SOC e o tubo foi colocado no shaker a 200 rpm, a 37°C por duas horas. Passado este tempo, as células foram plaqueadas em meio LB com ampicilina (100 µg/mL).

#### **4.10.6 Teste para avaliar eficiência da transformação**

A eficiência das células quimiocompetentes em colocar o DNA exógeno para o seu citosol foi realizado através do protocolo de transformação por choque térmico com o vetor pBluescript fechado. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB com adição de ampicilina (100µg/mL). O cálculo para este parâmetro é feito da mesma maneira que apresentado no tópico da mesma maneira que apresentado no tópico 4.9.12 deste material e métodos.

#### 4.11 ANÁLISES DA FUNCIONALIDADE DOS GENES EM *Escherichia coli*

##### **4.11.1 Análises da funcionalidade em meio de cultura sólido**

No dia seguinte a transformação por choque térmico, as colônias dos recombinantes foram incubadas em 500µL de meio líquido LB, distribuídos em placas de 96 poços. Objetivando manter a pressão seletiva e a transcrição do inserto, o meio de cultura líquido Luria-Bertani foi suplementado com ampicilina numa concentração de 100µg/mL e IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) numa concentração de 200 mg/mL. As colônias foram mantidas a 37°C durante 18 horas sob agitação de 200 rpm.

Passado esse período, as culturas foram diluídas 0, 100(10<sup>-2</sup>), 10.000(10<sup>-4</sup>) e 1.000.000(10<sup>-6</sup>) vezes e foram agitadas durante 30 segundos antes de ser retirada uma alíquota dessa cultura através de 3µL e inoculou-se na placa contendo meio ágar nutriente acrescido de ampicilina (100µg/mL) e IPTG(200 mg/mL). Para as placas do controle, o meio nutriente ágar foi acrescido de ampicilina, enquanto que nas placas experimentais, o meio continha ampicilina (100 µg/mL); 5; 6 ou 7% de cloreto de sódio e poderia ser suplementado, ou não, com IPTG (200 mg/mL).

Esse experimento foi realizado dez vezes, cada repetição fez uso de 96 colônias escolhidas aleatoriamente e inoculadas em duplicata nas placas.

##### **4.11.2 Análises da funcionalidade em meio de cultura líquido**

A funcionalidade dos genes em *Escherichia coli* também foi avaliada em meio líquido, no qual o controle positivo foi realizado com Caldo Nutriente suplementado com Ampicilina (100 µg/mL); o controle negativo foi realizado com *E.coli* não

transformada na presença de IPTG (200 mg/mL), Ampicilina (100 µg/mL) e 6% de NaCl. Por outro lado, foram preparados tubos de ensaio contendo 25mL de meio Caldo nutriente com 6% de NaCl e na presença e na ausência de IPTG.

As análises foram feitas através da densidade ótica mensurada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm. Foram também realizados experimentos para observação do crescimento de *E.coli* DH5α não transformada cultivada em meio NA com ampicilina (100µg/mL), sem ampicilina, meio NA com 6% de NaCl suplementado com IPTG e sem IPTG, objetivando avaliar o crescimento da bactéria nessas condições acima descritas.

Todos os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente utilizando o Test *t student* e ANOVA utilizando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MEIOS DE CULTURA E CRESCIMENTO DE *Halococcus morrhuae*

O crescimento de *Halococcus morrhuae* era esperado que ocorresse quinze dias após a reidratação da amostra liofilizada, sendo a cultura mantida a 37°C, sob aeração e no meio líquido indicado pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde). Entretanto, o cultivo não apresentou crescimento significativo até o décimo quinto dia após o inóculo inicial. Sendo assim, passou-se a acompanhar o crescimento da mesma, a cada vinte e quatro horas, baseado nas absorbâncias geradas pelo espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600nm. Com isso, o resultado das leituras de densidade apresentaram valores muito baixos, variando de 0,0004 a 0,00391, após vinte dias de cultivo, sob agitação, refletindo o mal crescimento da cultura.

Na tentativa de melhorar o crescimento de *H. morrhuae*, buscou-se na literatura meios de cultivo descritos, quatro meios foram selecionados e preparados, sendo estes descritos na metodologia desse trabalho. Após um mês acompanhando diariamente a cultura, foram feitas diversas tentativas de centrifugações objetivando concentrar as células e colocá-las nesses novos meios.

Robinson e colaboradores (2004) relataram que *H. morrhuae* não apresentou nenhum crescimento após 48 horas de cultivo em meio apropriado e que isso foi comprovado pela manutenção dos valores de densidade ótica em  $\leq 0,03$ , mas que eventualmente depois cresceram (ROBINSON, 2004). Desta forma, pode-se observar que já está relatado na literatura problemas de crescimento desta espécie *in vitro*.

A procura por meios de cultura descritos para halobactérias extremófilas contribuiu para o crescimento de *H. morrhuae* em um meio aqui denominado de Meio 112, catalogado no ATCC, além de tentar modificá-lo visando um melhor crescimento da arqueia. Após quarenta e três dias do inóculo inicial em meio sólido, no qual foi colocada a cultura total inicial centrifugada e ressuspendida em 100  $\mu\text{L}$ , foi possível observar cerca de seis colônias isoladas da arqueia. Desta forma, já havia condições de manutenção da linhagem em meio sólido, embora ainda fosse necessário o seu crescimento em meio líquido.

Esse crescimento foi alcançado com o aumento de dois componentes do meio ATCC 112 para halobactérias, sendo o primeiro o sulfato de manganês de 0,06 mg/L para 0,20 mg/L e o segundo composto foi o sulfato ferroso de 0,05 g/L para 0,15 g/L. Adicionalmente, *Halococcus* foi cultivado a uma temperatura de 41°C, uma vez que

havia sido descrito temperaturas ótimas para halobactérias alcançando até 45°C (OREN, 2002). Além disso, como um microrganismo aeróbico, colocou-se o cultivo em enlemeyers grandes e a rotação do shaker foi colocado para 200rpm.

Assim, observa-se que nessas condições, ocorria uma mudança de coloração da cultura para um intenso alaranjado, além da visualização da formação de um precipitado na base do enlemeyer onde estava sendo cultivado o microrganismo, como também nas paredes da vidraria (Figura 25). Adicionalmente, percebeu-se que a mesma apresenta um odor forte.

Assim, alcançando as condições adequadas para o cultivo, também, de *Halococcus* em meio líquido foi possível dar continuidade aos experimentos, não apresentando mais problemas no crescimento da cepa.

**Figura 25** - Crescimento de *Halococcus morrhuae* em meio de cultura ATCC 112(A) e em meio líquido(B)



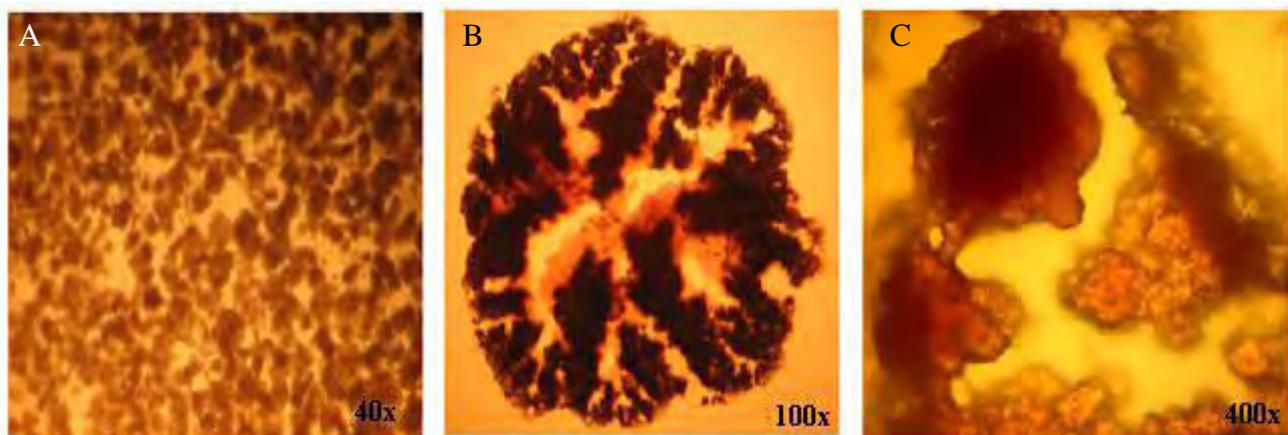
Fotos: PRISCILLA ANNE (2010).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA UTILIZANDO TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE E MICROSCOPIA ÓTICA DE LUZ

Alíquotas do cultivo de *H. morrhuae* foram retiradas para visualização das células em microscópio ótico de luz, em um aumento total de 40x, onde foram observados milhares de agregados celulares de tamanhos variados (Figura 26A). Além disso, pode-se observar que esses aglomerados possuem um formato bem definido e organizado, e que há um arranjo semelhante em todos eles (Figura 26B). Com um

aumento total de 400x, observando mais detalhadamente o interior desses agregados, pode-se perceber que na verdade eles são um conjunto de sarcinas (Figura 26C).

**Figura 26** - Fotomicrografias de *Halococcus morrhuae* organizada em diversos agregados

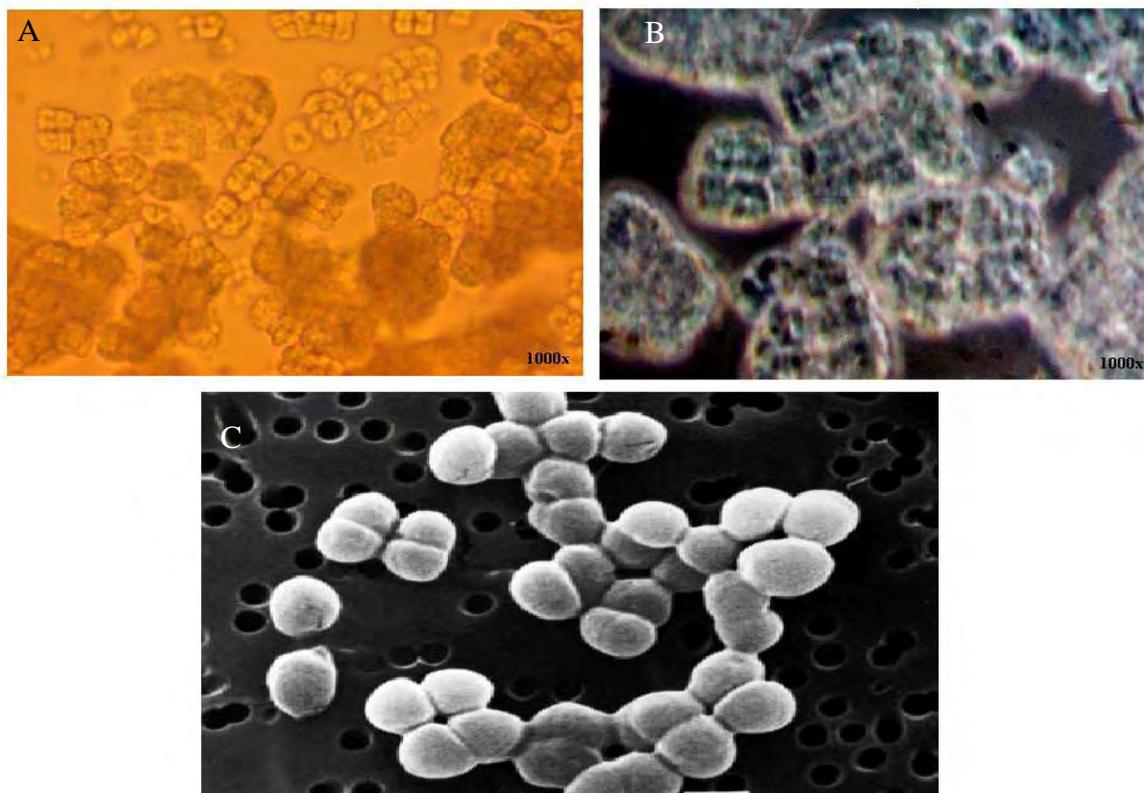


Em A observa-se a visão da lente panorâmica, enquanto que em B o aumento é de 100x, mostrando a forma dos agregados e o interior destes está detalhado em C.

Fotos: PRISCILLA ANNE (2010)

A definição de sarcina diz que é um arranjo morfológico de cocos ou bacilos, neste caso de cocos, que se agregam sob aspecto cúbico e este que pode ser formado de, no mínimo, 8 cocos. Desta forma, pode-se concluir que *H. morrhuae* são cocos que se agregam na forma de sarcinas de diversos tamanhos. A organização morfológica em sarcinas visualizada em *H. morrhuae* (Figura 27A e B) também é observada em outras espécies do gênero *Halococcus*, como por exemplo, em *H. thailandensis*, a qual teve sua fotomicroscopia de varredura apresentada por Namwong e colaboradores (NAMWONG, 2007) (Figura 27C).

**Figura 27** - Imagens de *Halococcus morrhuae* por técnicas de microscopia ótica de luz (A), microscopia de contraste de fase (B) e imagens de *Halococcus thailandensis* por microscopia eletrônica de varredura (C)



Barra=1µm. Fotos A e B: PRISCILLA ANNE (2010) e Foto C: NAMWONG(2007).

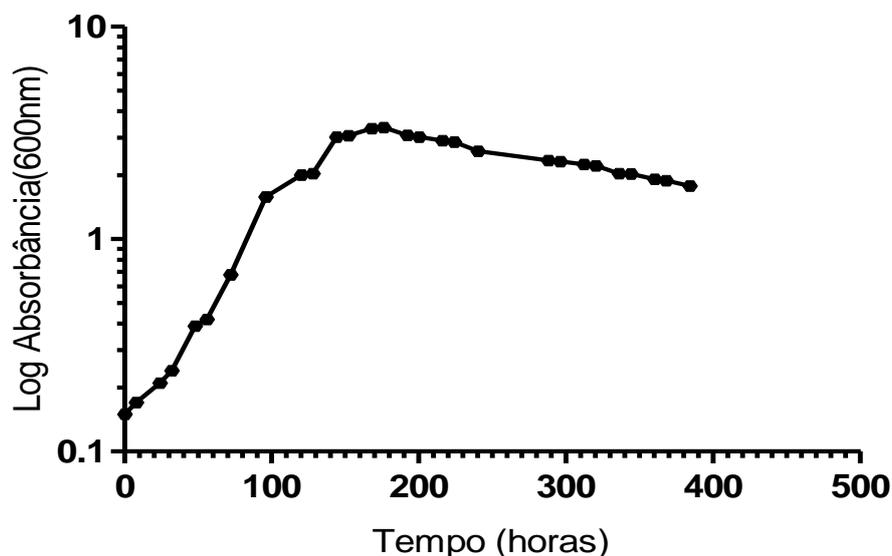
A organização desses cocos em sarcinas pode ser interpretada como um mecanismo de defesa as altas concentrações de sal presente no meio em que vivem, pois através da agregação há a diminuição da área de contato com o meio salino facilitando o seu equilíbrio iônico e reduzindo o seu gasto energético em mecanismo de osmoregulação, tais como o aumento no efluxo de íons  $\text{Na}^+$ , a otimização no sequestro vacuolar de íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  e na produção e acúmulo de osmólito compatível (POSAS *et al.*, 2000).

### 5.3 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Halococcus morrhuae*

O crescimento de *H. morrhuae* foi acompanhado diariamente durante 17 dias e com os valores de densidade ótica foi construída a curva de crescimento deste microrganismo, a qual está mostrada no Gráfico 1. Analisando-se o crescimento de *Halococcus morrhuae*, observa-se que o padrão da referida curva é de uma curva

bacteriana típica, onde, inicialmente, observa-se a fase *lag*, posteriormente a fase exponencial, depois a fase estacionária e por fim, encontraria a fase de morte celular (ZWIETERING,1990; SKARSTAD, 1983).

**Gráfico 1** - Curva de crescimento de *Halococcus morrhuae* tendo como variáveis a densidade ótica e o tempo



O gráfico acima mostra que nos primeiros dias o crescimento foi bastante discreto, semelhante à fase *lag* das curvas de crescimento bacterianas. Já foi relatado que esse comportamento é devido a baixa taxa de divisão celular, em que há a síntese enzimática e de moléculas variadas essenciais para as próximas etapas da divisão celular, resultando em um aumento dos tamanhos das células e do peso seco das mesmas. Nesta fase, não houve um aumento significativo da população, ficando o número de organismos praticamente inalterado durante os dois primeiros dias.

A partir do quarto dia, é possível observar um aumento significativo na densidade ótica, refletindo o aumento do número total de células, caracterizando o início da fase de crescimento exponencial da cultura. Esta fase é observada até 176 horas (sete dias, aproximadamente) após o inóculo inicial ter sido feito, na qual a densidade ótica chega a 3,36, em média.

As células nesta fase, estão com altas taxas metabólicas, e por isso, os experimentos realizados neste trabalho foram planejados e feitos com células que estavam nesta fase de crescimento.

Por outro lado, o gráfico mostra que entre 192 até 240 horas do início do cultivo, a cultura demonstra ter sua densidade ótica praticamente inalterada, variando entre 3,09 a 2,87. Nesta fase, acredita-se que a manutenção da densidade ótica seja o resultado da equivalência entre o número de indivíduos que nascem e o número de indivíduos que morrem, levando a manutenção da densidade do cultivo.

Em seguida, pode-se visualizar um decaimento da densidade ótica ( mais significativamente) a partir de 280 horas da curva de crescimento ter sido iniciada. O decaimento da absorvância ocorre de maneira lenta. Cerca de 390 horas após o inóculo inicial, a cultura ainda apresentava uma densidade significativamente alta. Entretanto, é importante lembrar que essa densidade alta, pode estar associada com a formação de sarcinas maiores, como também pode estar relacionada à lise celular dos seus cocos, esta que contribuiria para um aumento da turbidez no meio de cultura, levando a manutenção da densidade ótica ainda em níveis significativos.

Por fim, a última fase da curva seria a de declínio da densidade ótica, a qual poderia ser justificada pela morte celular desses microorganismos ou por uma maior agregação dos mesmos.

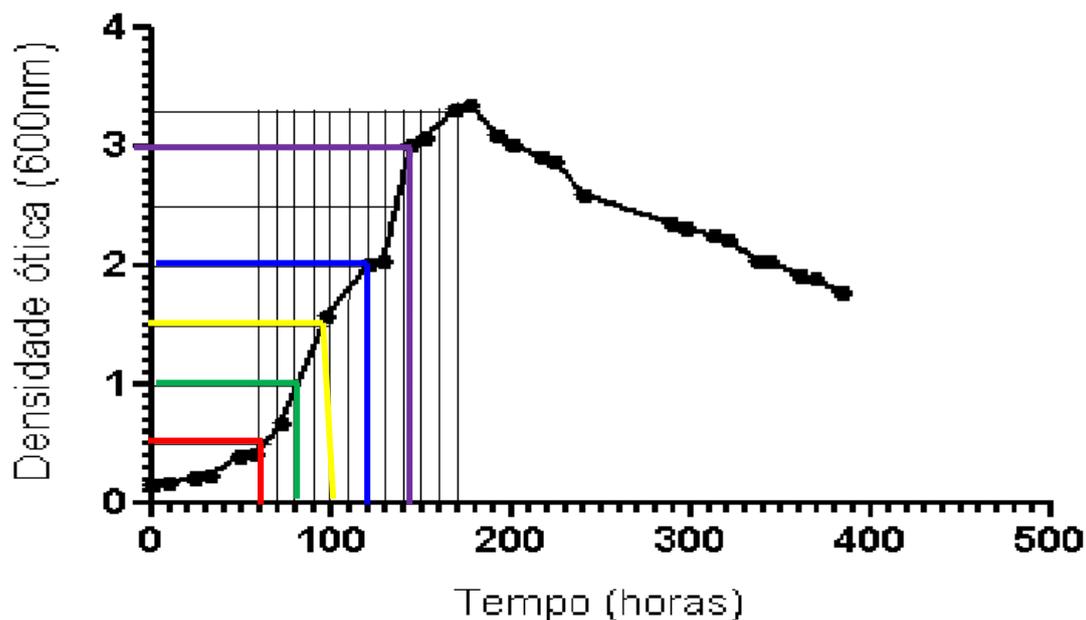
### **5.3.1 Tempo de geração de *Halococcus morrhuae***

Os valores da fase exponencial da curva de crescimento apresentadas no Gráfico 1 foram utilizados para calcular o intervalo de tempo em que uma célula origina duas novas células ou tempo necessário para uma população dobrar de número. Esse intervalo é chamado de tempo de geração.

Para que o cálculo do tempo de geração da curva de crescimento de *Halococcus morrhuae* fosse feito, escolheu-se os valores de densidade ótica de 0,5 e 1, assim como 1 e 2; e 1,5 e 3. Observando o Gráfico 2, pode-se notar que para a densidade duplicar de 0,5 a 1, são necessárias 20 horas.

Do mesmo modo, observando o tempo necessário para que a densidade ótica da cultura partisse de 1 e alcançasse 2, foram precisos 40 horas de cultivo. Adicionalmente, quando se analisa esse tempo para que a cultura cresça e saía da densidade de 1,5 para 3, também foi necessário 40 horas, uma vez que a densidade de 1,5 só foi alcançada após 95 horas do cultivo inicial e a densidade ótica de 3, após 150 horas do início do cultivo.

**Gráfico 2** – Curva de crescimento de *Halococcus morrhuae* com linhas coloridas interligando o valor de densidade ótica com o tempo correspondente.



Com os dados apresentados no gráfico acima e descritos no parágrafo anterior, foi possível calcular o tempo de geração médio que essa cultura apresenta, o qual foi de 33 horas, aproximadamente. É importante lembrar que este experimento foi realizado três vezes, sendo que cada repetição foi feita em duplicata e todos esses cultivos foram feitos sob as mesmas condições.

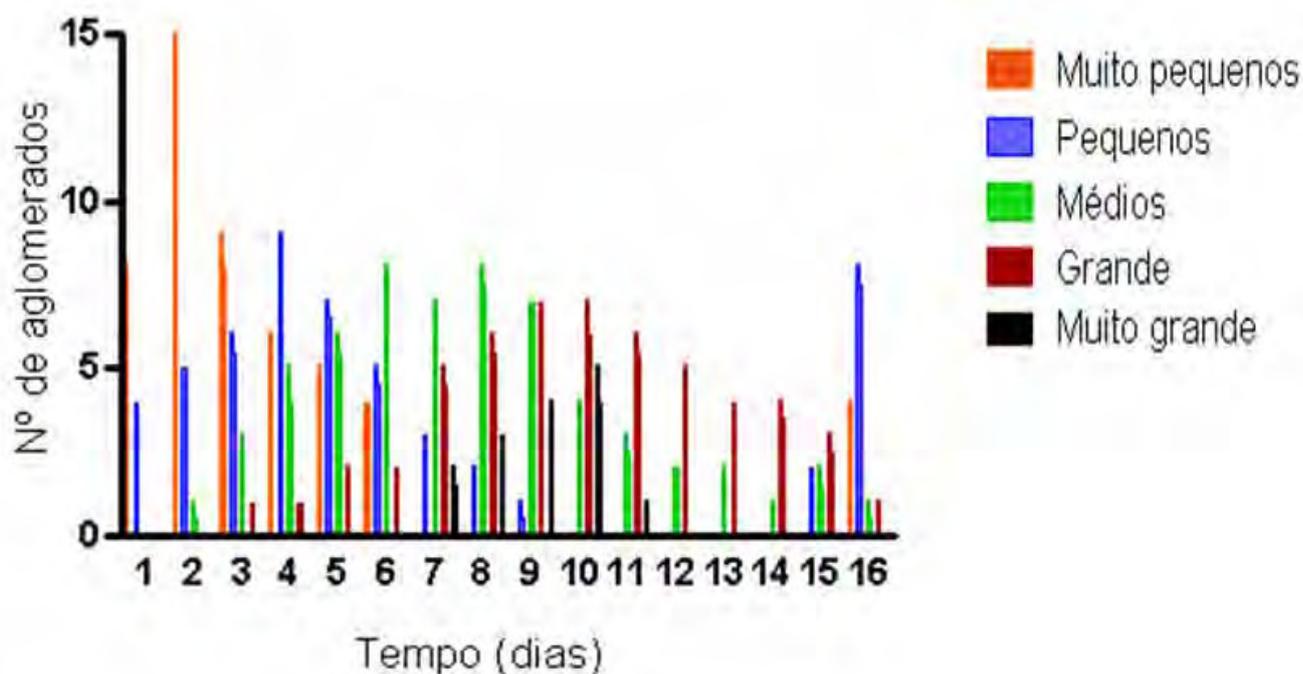
#### 5.4 ANÁLISE DO GRAU DE AGREGAÇÃO DAS SARCINAS DE *Halococcus morrhuae* AO LONGO DA CURVA DE CRESCIMENTO

As quantificações das sarcinas em diferentes tamanhos de agregados foram realizadas paralelamente às leituras de densidade ótica, isto é, as culturas utilizadas para o acompanhamento do crescimento e construção da curva de crescimento foram as mesmas para a construção dessa curva, a qual visou analisar como a cultura se comportava em relação a organização de suas sarcinas.

A correlação aproximada dos tamanhos das sarcinas com as marcações da câmera hemocimétrica de Neubauer facilitou a classificação dos agregados em cinco classes diferentes que variam entre sarcinas muito pequenas a maiores que um dos dezesseis quadrados presentes em um quadrante da câmera hemocimétrica de Neubauer.

As correlações dos tamanhos dos agregados ao longo dos dias após o inóculo inicial ter sido feito, estão apresentados no Gráfico 3. Através de uma visão superficial, pode-se perceber que inicialmente há um grande número de sarcinas classificadas como muito pequenas e estas diminuem ao longo do tempo e só reaparecem após o décimo sexto dia da cultura.

**Gráfico 3** - Número e tamanho de sarcinas ao longo da curva de crescimento



Observando em mais detalhes o gráfico, pode-se perceber que durante os três primeiros dias houve uma maior concentração de agregados de tamanhos muito pequenos, acompanhado de sarcinas de tamanho pequeno, isto é, que variam entre 0,1 a 43 $\mu$ m de tamanho. Em seguida, o número desses agregados de tamanhos muito pequenos foi diminuindo e os de tamanho pequenos foi aumentando. No quarto dia da curva de crescimento o número dos agregados de tamanho pequenos foi a maioria dos agregados presente no cultivo.

Desde o segundo dia da curva de crescimento, o número de sarcinas de tamanho que variam entre 44 a 64 $\mu$ m (tamanho médio) só aumentou até, aproximadamente, o oitavo dia da curva de crescimento, justificando porque os valores a densidade ótica entre o terceiro e o sétimo dia da curva aumentaram (Gráfico 1). Os dados de densidade ótica ao longo do cultivo apresentados no Gráfico 1 demonstram que os valores máximos conseguidos de densidade ótica foram alcançados entre o sétimo e o décimo

dia da curva, e isso pode ser justificado devido a presença de sarcinas grandes e muito grandes.

Depois do décimo dia, observa-se a manutenção de agregados de tamanho grande. Entretanto, os valores de densidade ótica diminuíram devido à aglomeração dessas sarcinas cada vez em tamanhos maiores, aumentando os espaços “livres” no meio de cultura fazendo com que a densidade caísse. No décimo sexto dia da curva de crescimento, a densidade ótica foi um pouco menor devido à presença de aglomerados de tamanhos diferentes, no qual se pode visualizar sarcinas de todos os tamanhos, demonstrando que inicialmente a densidade cai devido à agregação das sarcinas em aglomerados maiores e posteriormente, estas sarcinas começaram a lisar, podendo ser observado células lisadas no meio de cultura visualizado em microscópio ótico de luz.

#### 5.5 EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS E PIGMENTOS DA ARQUÉIA *H.morrhuae* E SUA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

O crescimento microbiano ocorre em uma grande variedade de ambientes, nos quais a concentração de sal pode chegar a até 5 M (OREN, 1999; MARGESIN & SCHINNER, 2001). Para conseguir sobreviver sob essas condições de alta salinidade, microrganismos halófilos e halotolerantes tiveram que desenvolver adaptações e, dentre estas, estão as mudanças em sua membrana plasmática (VREELAND, 1987), a qual se tornou menos permeável a prótons e ao sódio, facilitando a manutenção do balanço osmótico desses organismos (VAN de VOSENBERG, 1999).

Lipídios da membrana de *H. morrhuae* foram extraídos com clorofórmio: metanol, gerando um material sólido na forma de um pó devido a presença compostos com cadeias hidrocarbônicas grandes, estas que podem chegar a cinquenta carbonos, por exemplo (DasSARMA, 1995).

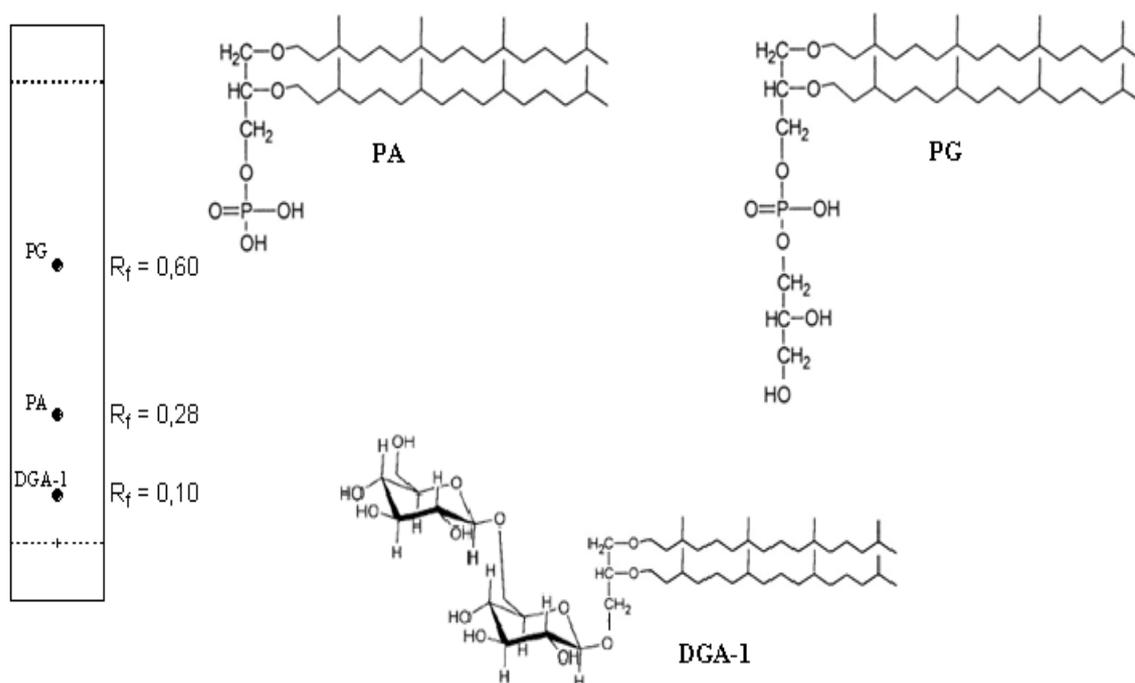
Realizaram-se cinco extrações dos lipídios de *Halococcus morrhuae* nos quais foram conseguidos um total de 7,5409g de um material solúvel apenas em água, demonstrando a sua alta polaridade, incluindo pigmentos que puderam ser observados pela coloração avermelhada do extrato.

A presença dos lipídios foi acompanhada por placas cromatográficas, por meio das quais foi possível observar a presença de uma mancha de cor alaranjada, a qual provavelmente estaria relacionada com algum de seus pigmentos, como, por exemplo, o  $\beta$ -caroteno. Após a utilização do reativo de molibdato (DITTMER & LESTER,

1964) tornaram-se observáveis um maior número de manchas e utilizando esta técnica, pode-se calcular os índices de retenção ( $R_f$ ) dos mesmos, o qual é definido como sendo a razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente.

Em cada placa cromatográfica preparada, observou-se de quatro a seis manchas, estas que tiveram os tempos de retenção, então, calculados. Os valores de  $R_f$  de 0,28; 0,60 e 0,10, respectivamente, correspondem aos fosfolipídios Ácido Fosfatídico (PA) e Fosfatidilglicerol ( $C_{20}$ - $C_{20}$ )(PG), e ao glicolipídio conhecido como Diglicosilarqueol (DGA-1) (Figura 28) (DasSARMA,1995).

**Figura 28** – Estrutura química dos possíveis lipídios relacionados aos valores de  $R_f$  encontrados neste estudo



O ácido fosfatídico (PA), o fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilglicerofosfato (PGP) já foram encontrados em *Haloferax mediterranei* e *Halococcus saccharolyticus* (MOLDOVEANU, 1990). Para *Halococcus morrhuae* já foi descrito alguns lipídios como o arquetidilglicerol-metilfosfato (PGP-Me), arquetilglicerol, Triglicosilarqueol-sulfatado (S-TGA-1) e não sulfatado (TGA-1), além do tetraglicosilarqueol (S-TeGA) (TENCHOV, 2006; MORRIS, 1990).

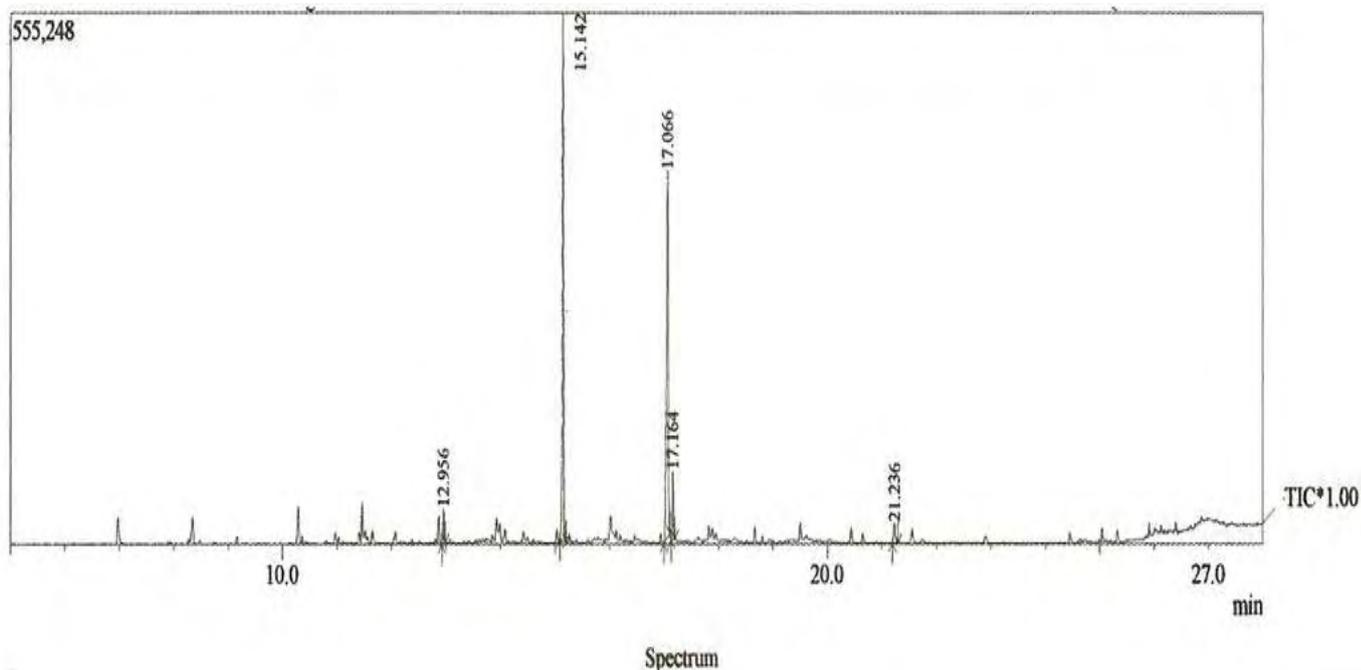
### 5.5.1 Análises dos extratos lipídicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A espectrometria de massas constitui uma importante ferramenta de análise orgânica, cujo propósito central é converter uma substância em fragmentos moleculares mensuráveis, estes que são indicativos da estrutura da molécula original. Inicialmente, a amostra é introduzida na câmara de ionização na qual haverá a remoção de um elétron da camada de valência, formando uma espécie altamente energética (PAVIA, 2001).

Posteriormente, a energia acumulada durante a ionização é dissipada quebrando as moléculas em fragmentos característicos para cada estrutura molecular. Todos os fragmentos carregados positivamente passam através de uma série de fendas constituídas por placas carregadas negativamente onde são acelerados e enviados para dentro do analisador de íons, no qual serão separados pela razão massa/carga ( $m/z$ ). A corrente iônica formada devido às massas iônicas separadas é medida, amplificada e exibida na forma de um espectro de massas.

Os dois primeiros extratos lipídicos foram esterificados e injetados em um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, por meio do qual se observou a presença de diversas moléculas. O cromatograma da primeira amostra (Figura 29) demonstrou a existência de cinco picos principais, onde estes foram integrados, apresentando os seguintes tempos de retenção: 12,926; 15,142; 17,066; 17,164 e 21,236 minutos, respectivamente.

**Figura 29** – Cromatograma do Extrato 1 de *Halococcus morrhuae*



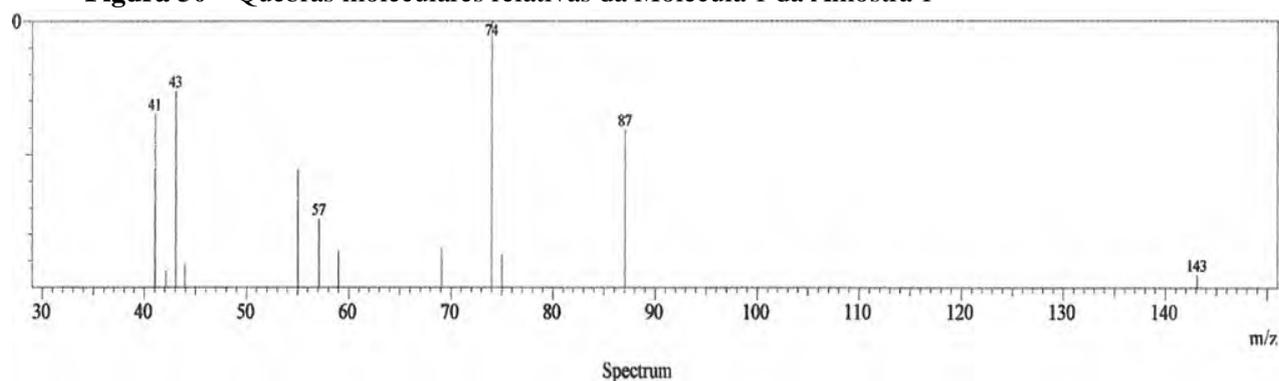
Adicionalmente, as análises da primeira extração por CG-MS, demonstraram que apenas 3% da amostra que foi integrada correspondia a molécula detectada como sendo a do pico 1, enquanto que 44,52% estava associada com a molécula do pico 2, 44,43% da amostra correspondia a molécula do pico 3. Já os pico 4 e 5, representaram 5,53 e 2,52% da amostra total que havia sido injetada no equipamento (Tabela 5).

**Tabela 5** - Tempo de retenção e porcentagem na amostra de cada molécula detectada pelo CG-MS

Número do pico	Tempo de Retenção( min)	Porcentagem na amostra
1	12,956	3,0
2	15,142	44,52
3	17,066	44,43
4	17,164	5,53
5	21,236	2,52

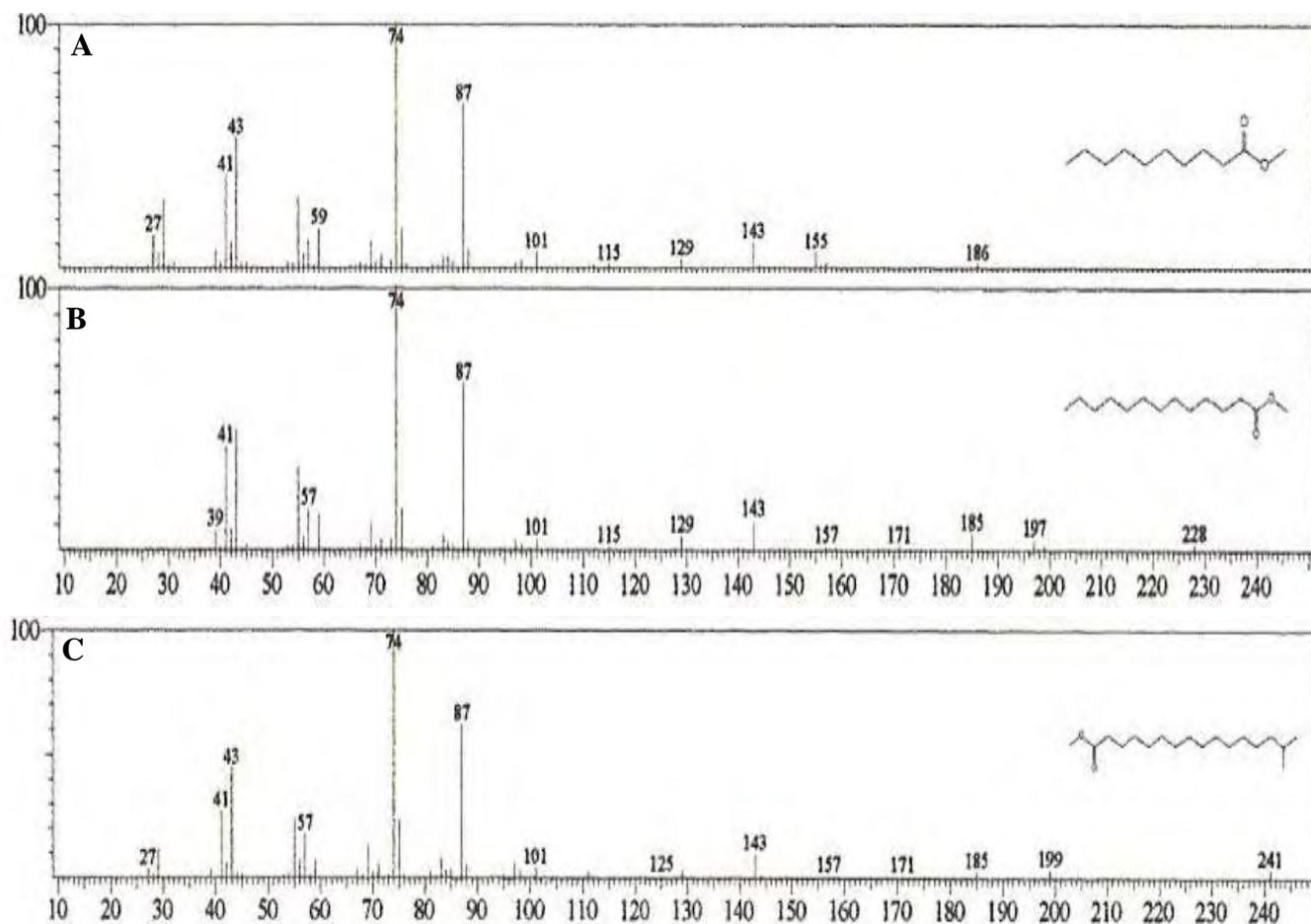
O padrão de fragmentação dos picos são únicos para cada tipo de substância e são característicos desta substância. No primeiro pico, observou-se que a molécula apresentava uma razão de massa/carga de 143 e o padrão de quebras originados na análise (Figura 30) foi comparados aos existentes no banco de dados.

**Figura 30** – Quebras moleculares relativas da Molécula 1 da Amostra 1



Os resultados apontam que as quebras apresentaram 84% de similaridade com a do ácido decanóico, também conhecido como ácido cáprico, presente nas membranas de organismos do Domínio *Bacteria* e *Eucarya*. Adicionalmente, esse mesmo pico apresentou 83% de semelhança com as quebras que caracteriza o ácido g Tridecanóico e 82% com o ácido hexadecanóico (Figura 31).

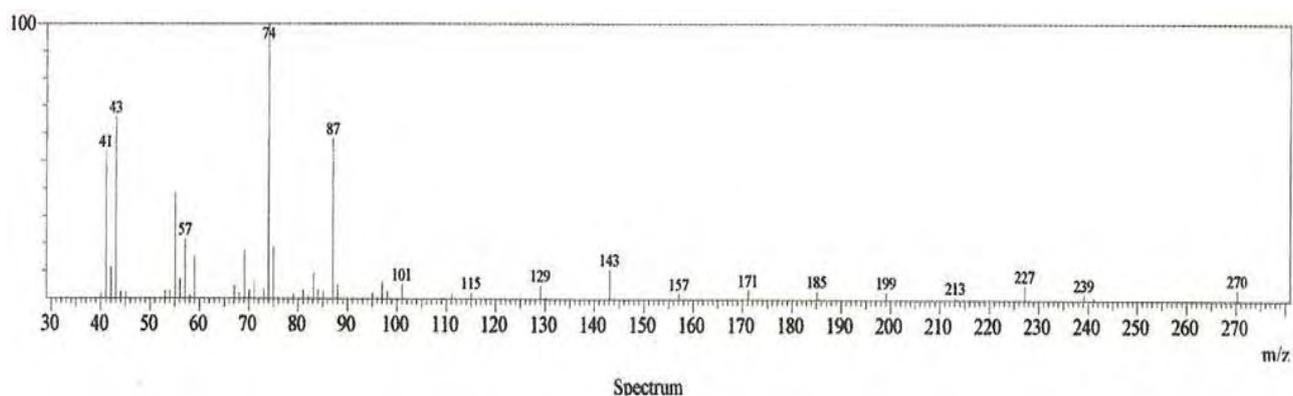
**Figura 31** - Padrões de quebras moleculares de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS



Em A, observa-se as quebras do ácido decanoico, em B as quebras do ácido graxo conhecido como Tridecanoico e em C a do ácido hexadecanoico.

O segundo pico que apareceu no cromatograma é o que apresentou a maior altura, o que representa a maior abundância. Observando a Figura 32, pode-se perceber que o mesmo mostrou uma razão de massa/carga de 270.

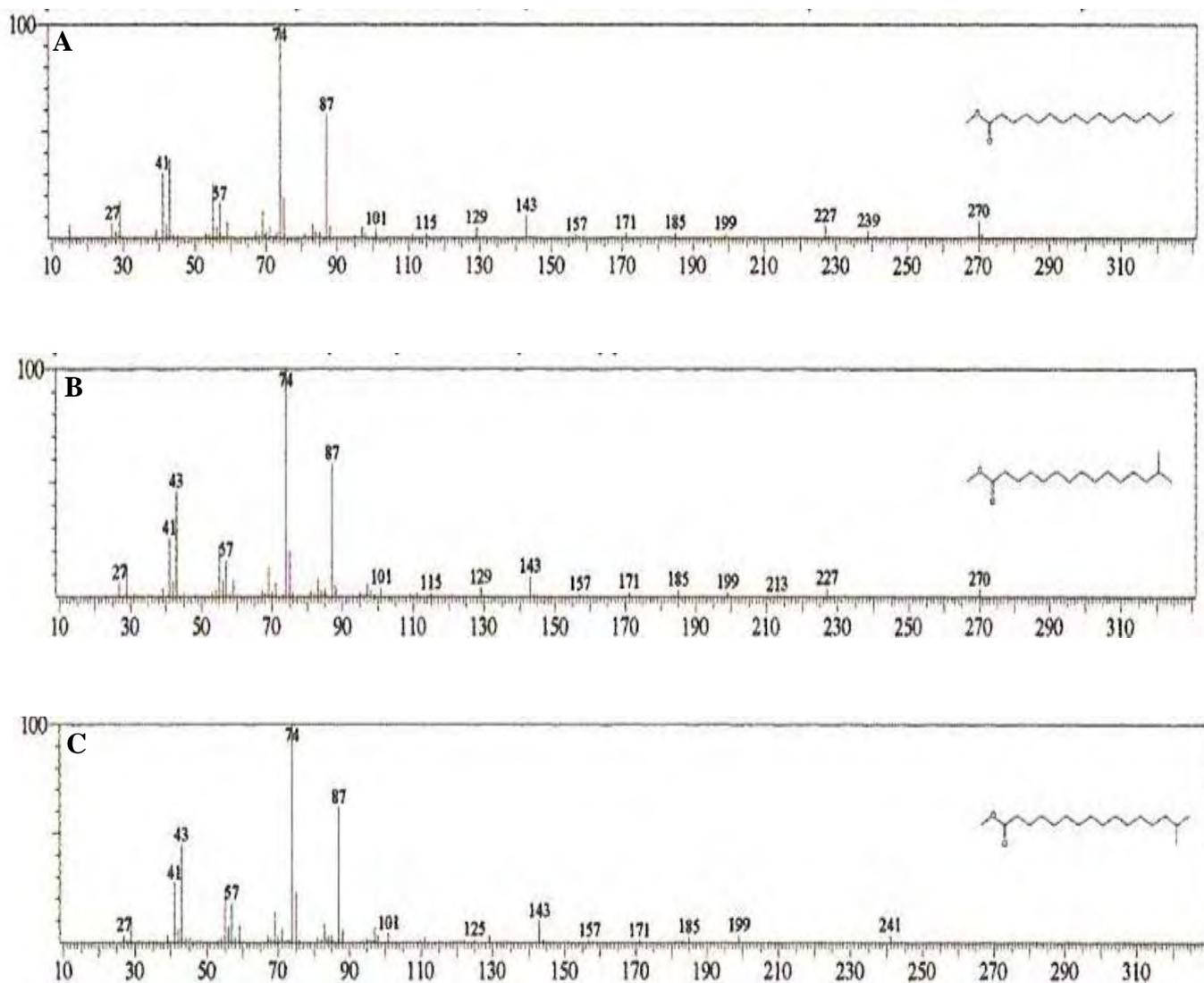
**Figura 32** - Quebras moleculares relativas da Molécula 2 da Amostra 1

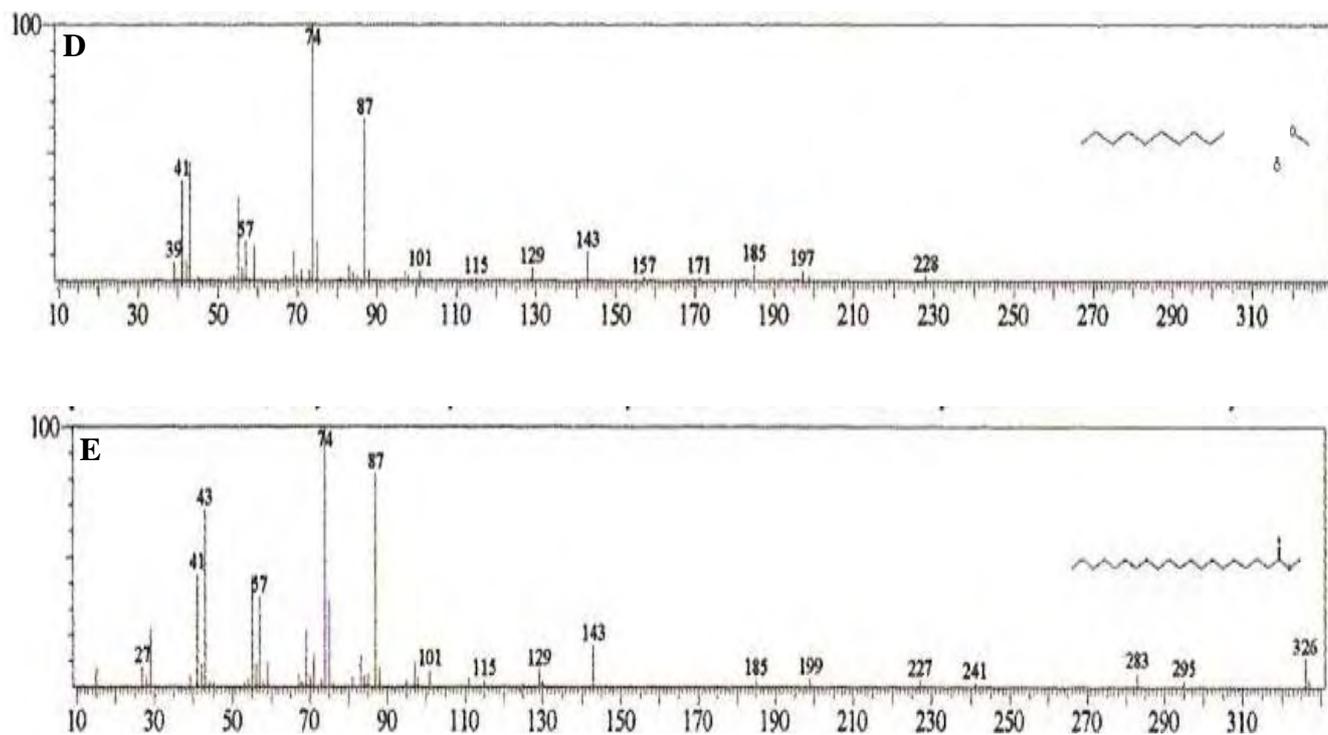


O banco de dados do espectrômetro de massas apresenta as 25 moléculas com quebras mais similares a amostra que foi injetada e analisada no equipamento. Entretanto, neste trabalho só estão sendo citadas as moléculas mais semelhantes quanto às fragmentações.

No caso da molécula 2, a mesma apresentou similaridade de 92% com o ácido hexadecanóico, também conhecido como palmítico, e com o ácido pentadecanóico. Enquanto que apresentou 91% de semelhança com o ácido 15-metil-hexadecanóico, que é o isoheptadecanoato, assim como com o ácido tridecanóico e com o ácido araquidônico (Figura 33).

**Figura 33-** Similaridades das fragmentações do pico 2 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS

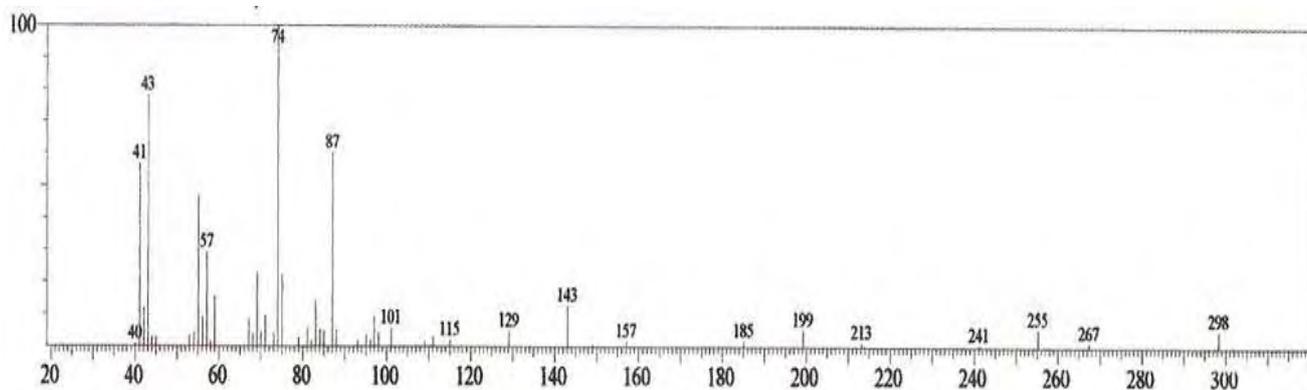




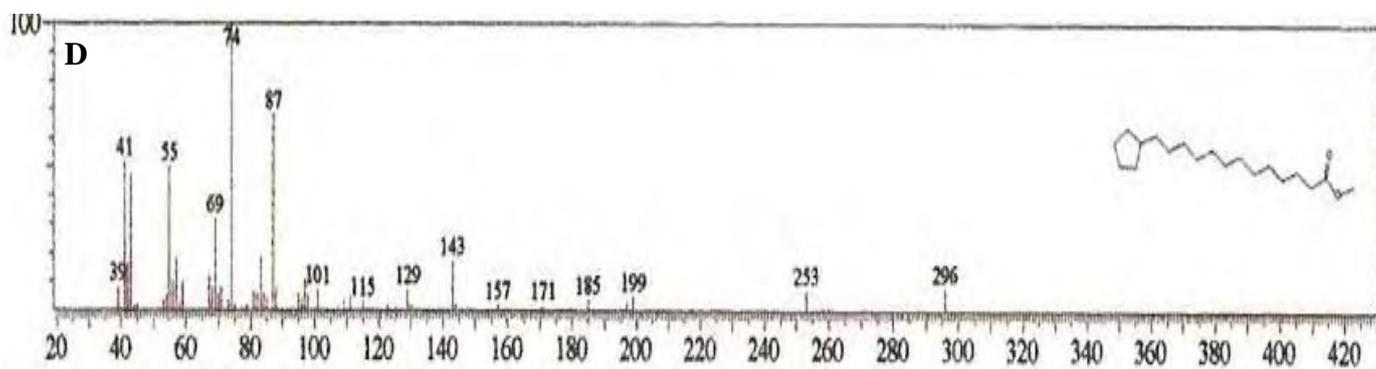
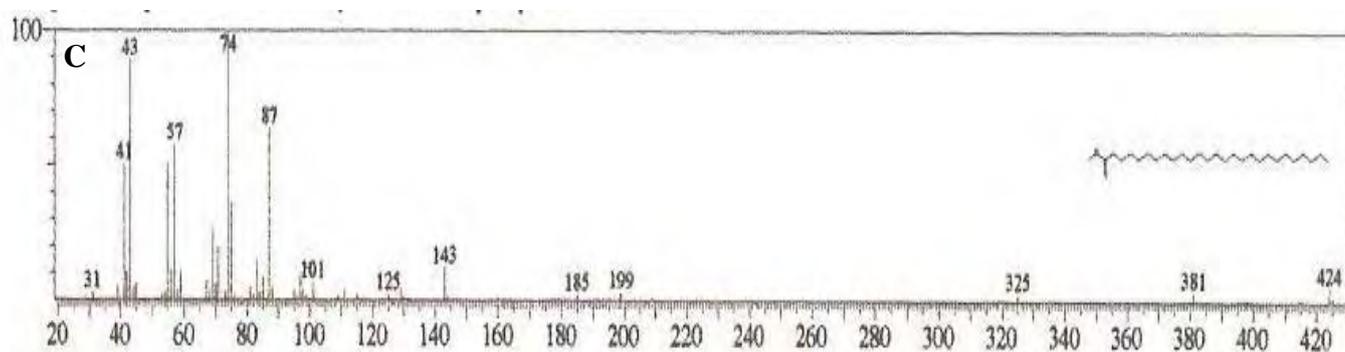
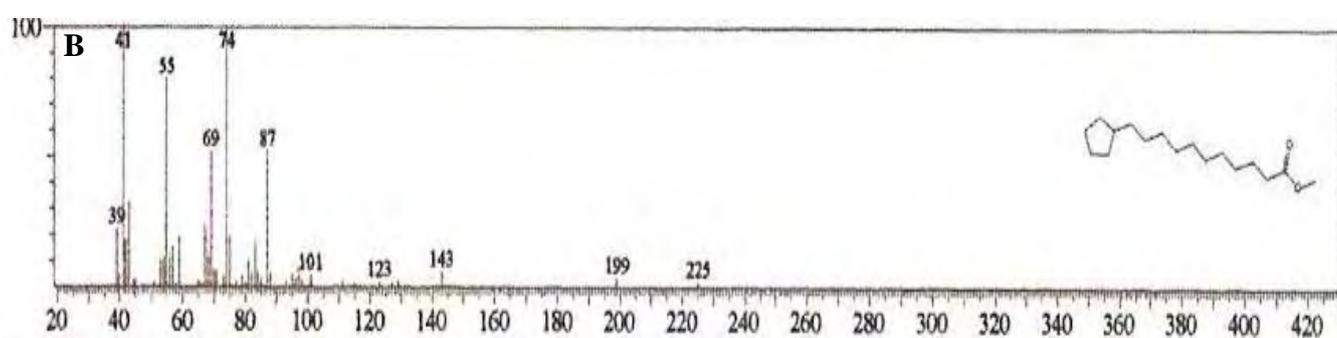
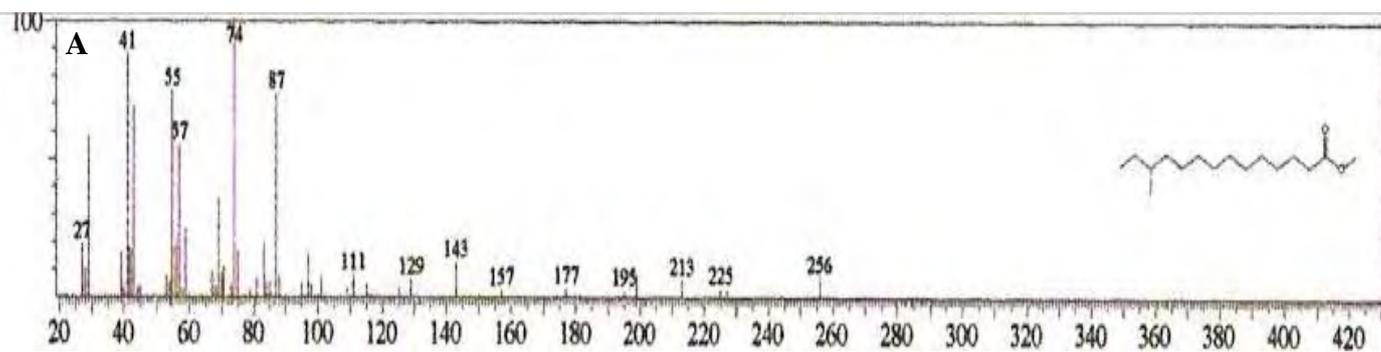
Em A, observa-se as quebras do ácido hexadecanóico, em B as quebras do ácido graxo conhecido como pentadecanóico, em C a fragmentação do ácido iso-heptadecanoato, em D n-ácido tridecanóico e em E, ácido araquidônico.

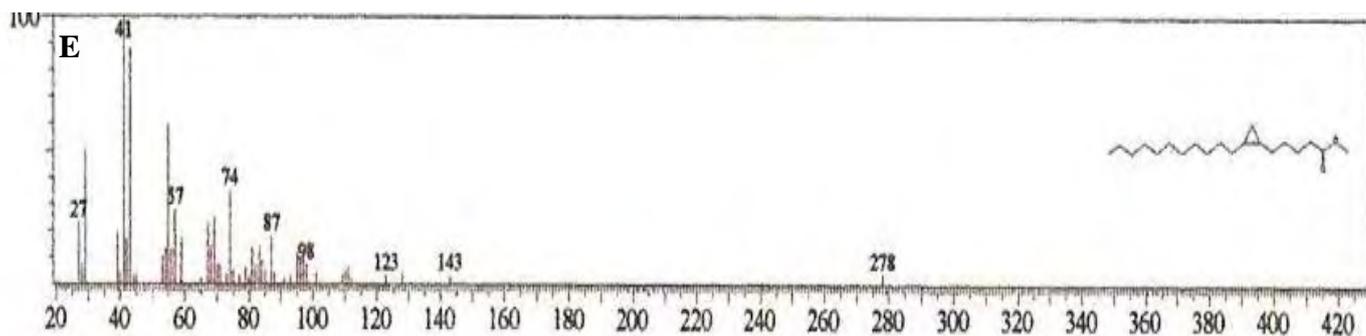
A terceira molécula do cromatograma do Extrato 1, demonstrou ter uma razão de massa/carga de 298, este que apresentou 44,43% da amostra integrada nesta análise (Figura 34). O banco de dados mostrou que a molécula 3 apresentava 91; 90; 89; 88 e 87% de similaridade com os seguintes ácidos graxos: 12-metil-ácido tetradecanóico, ácido ciclopentanoundecanóico, ácido heptacosanóico, ácido ciclopentanotridecanóico e 5-(2-undecil-ciclopropil)pentanoato, respectivamente (Figura 35).

**Figura 34** - Quebras moleculares relativas a Molécula 3 da Amostra 1



**Figura 35** - Similaridades das fragmentações do pico 3 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS

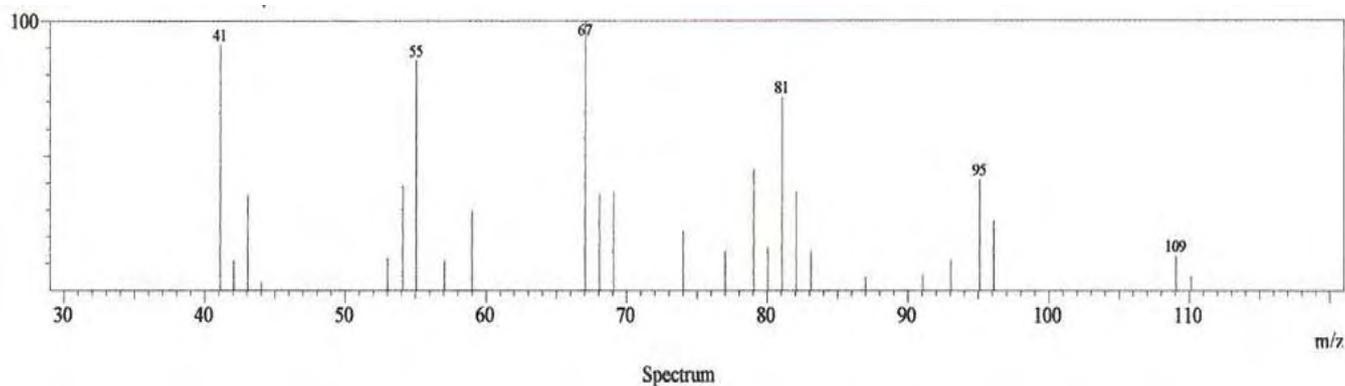




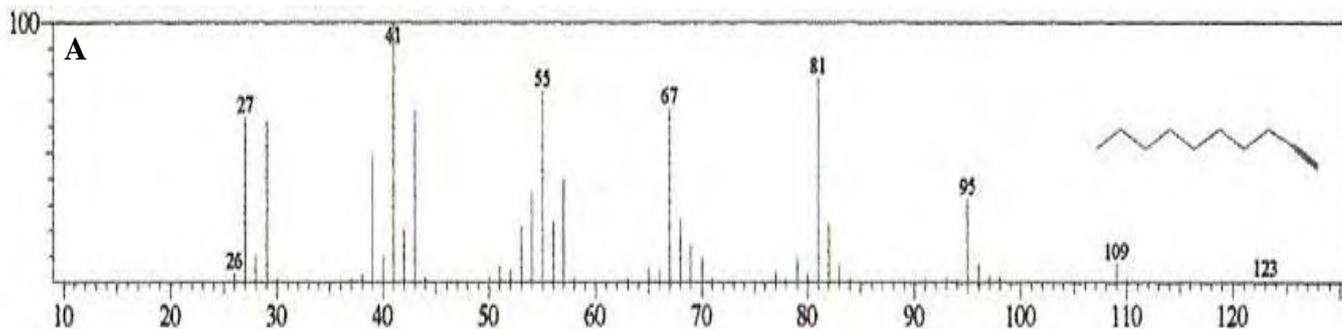
Em A observa-se o padrão de quebras características do 12-metil- ácido tetradecanóico, em B visualiza-se o padrão do ácido ciclopentanoundecanóico, em C são os fragmentos do ácido heptacosanóico, enquanto que em D é a do ácido ciclopentanotridecanóico e em E a do 5-(2-undecil-ciclopropil)pentanoato, respectivamente.

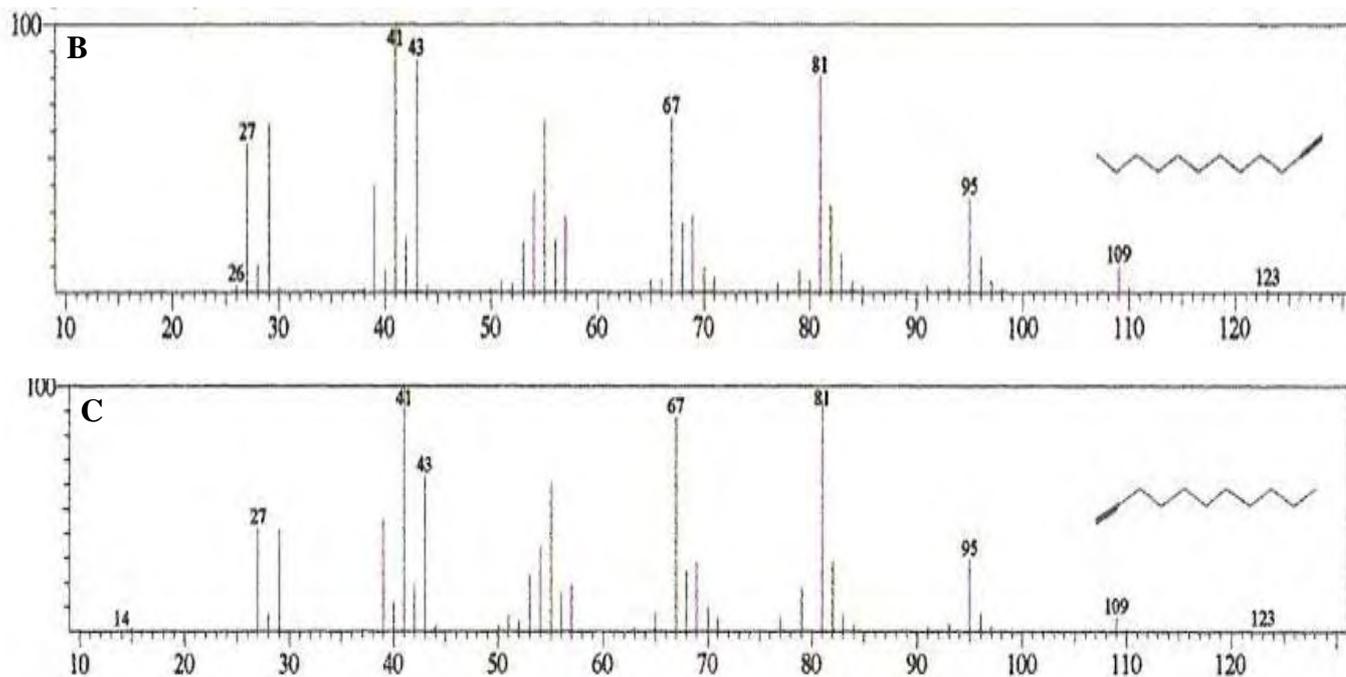
O penúltimo pico da primeira amostra apresentou um tempo de retenção de 17,164 minutos e um valor para a razão massa/carga de 110, como mostrado na Figura 36. As quebras apresentadas por essa molécula e comparadas com a de outras presentes no banco de dados demonstrou apresentar cerca de 86% de homologia com octil-acetileno, dodecino e decino e de 85% com undecino (Figura 37).

**Figura 36** - Quebras moleculares relativas à Molécula 4 da Amostra 1



**Figura 37** - Similaridades das fragmentações do pico 4 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS

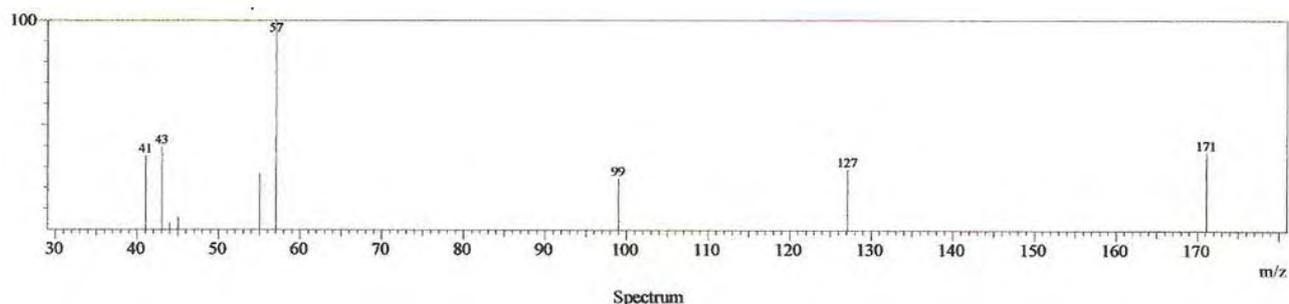




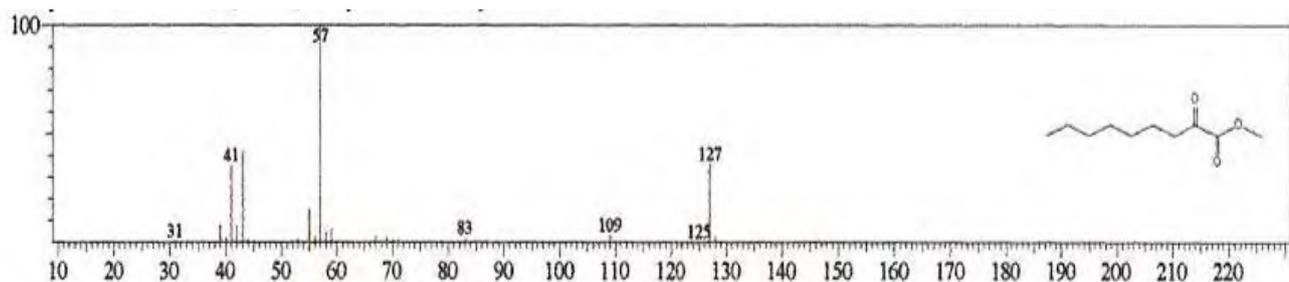
Em A observa-se o padrão de fragmentações do decino; em B a do dodecino; em C a do undecino.

Seguindo as análises da Amostra 1, observou-se que o quinto pico integrado apresentou uma razão massa/carga de 171 ( Figura 38). As fragmentações dessa molécula apresentaram semelhança com as quebras características do 2-oxo-ácido nonanóico (Figura 39).

**Figura 38** – Quebras moleculares relativas à Molécula 5 da Amostra 1

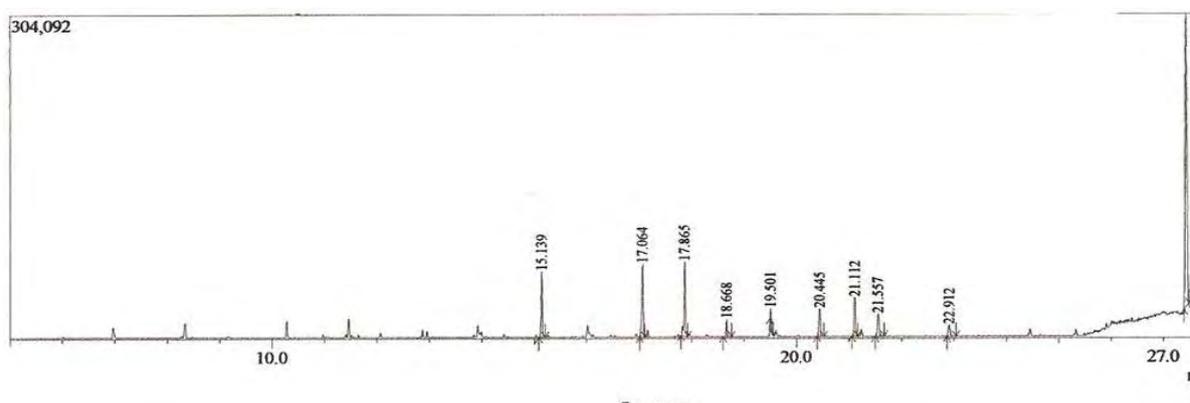


**Figura 39**- Similaridade das fragmentações do pico 4 com a do 2-oxo-ácido nonanóico



A análise da segunda amostra esterificada e injetada no CG-MS identificou a existência de dez picos principais, estes que foram captadas em tempos diferentes e que, conseqüentemente, geraram valores de tempo de retenção diferentes (Figura 40 e Tabela 6).

**Figura 40** – Cromatograma do Extrato 2 de *Halococcus morrhuae*



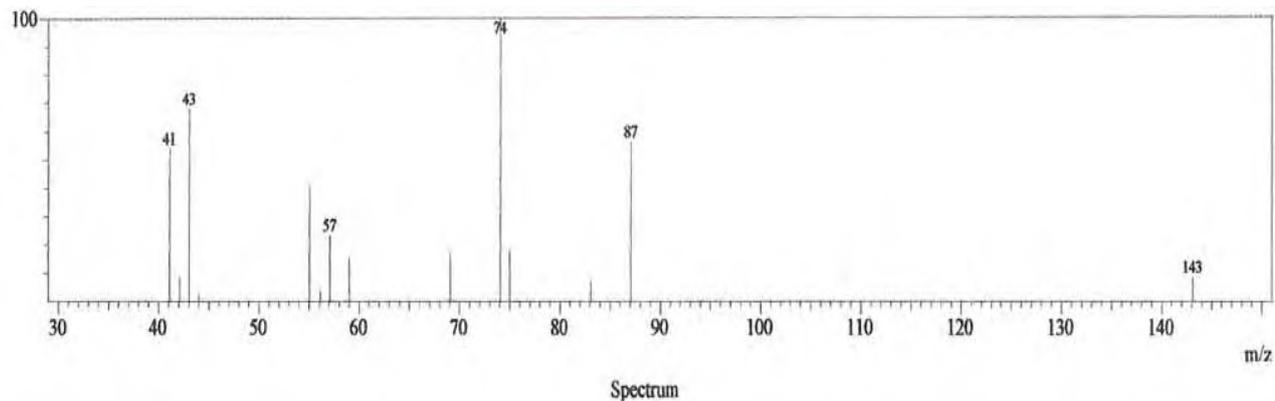
**Tabela 6** -Tempo de retenção e porcentagem na amostra de cada molécula detectada pelo CG-MS

Número do pico	Tempo de Retenção (minutos)	Porcentagem na amostra
1	15,139	7,82
2	17,064	10,83
3	17,865	10,34
4	18,668	1,93
5	19,501	0,17
6	20,445	4,16
7	21,112	5,96
8	21,557	4,10
9	22,912	2,10
10	27,437	52,59

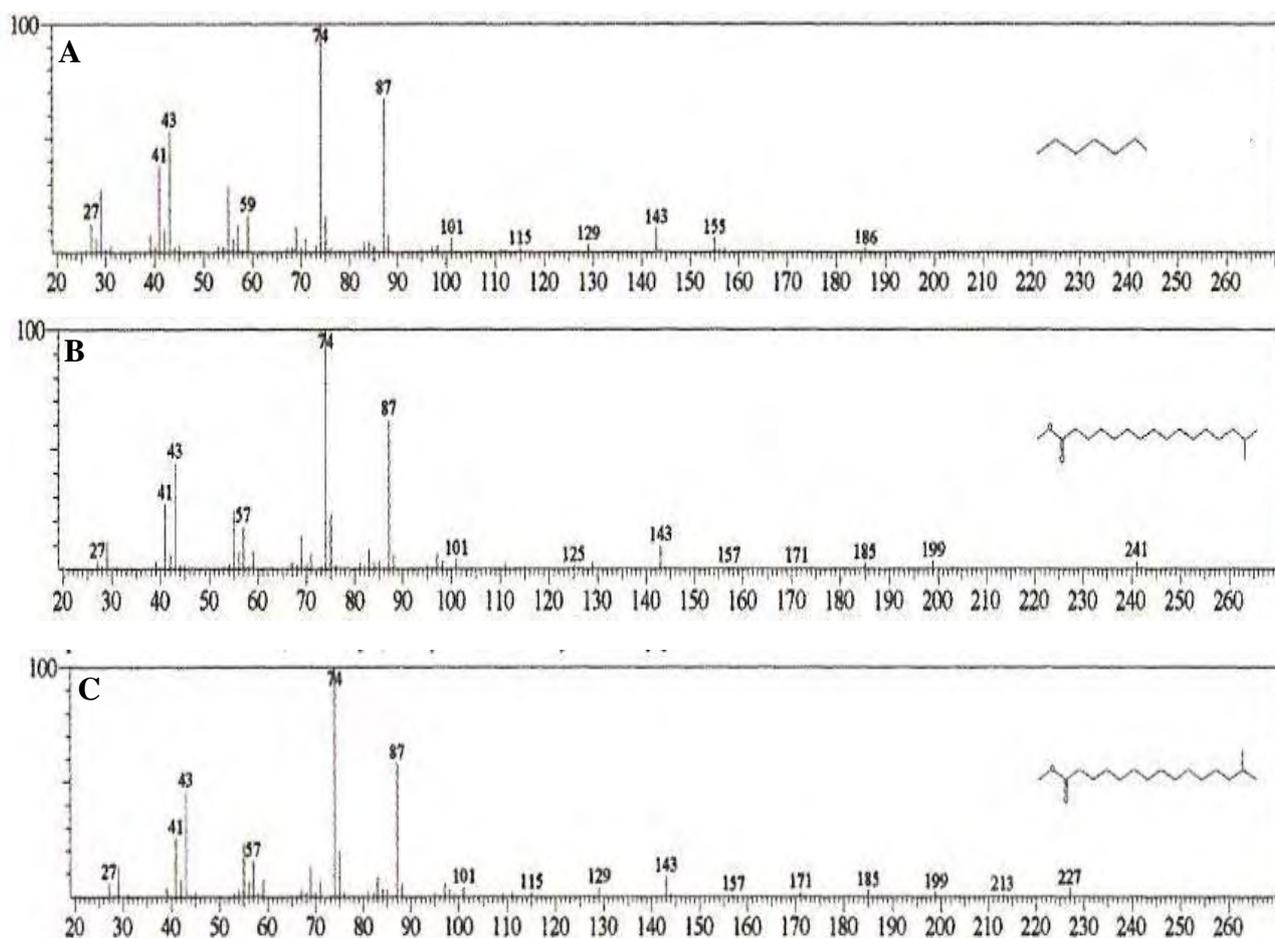
O primeiro pico apresentou um tempo de retenção de 15,139 minutos e a sua porcentagem em área foi de 7,82% (Figura 41). Esse composto apresentou similaridade de 84% com as quebras características do ácido cáprico, também conhecido como ácido decanóico (Figura 42A). Em seguida, o mesmo composto demonstrou que seu padrão de fragmentação foi 83% similar ao do ácido

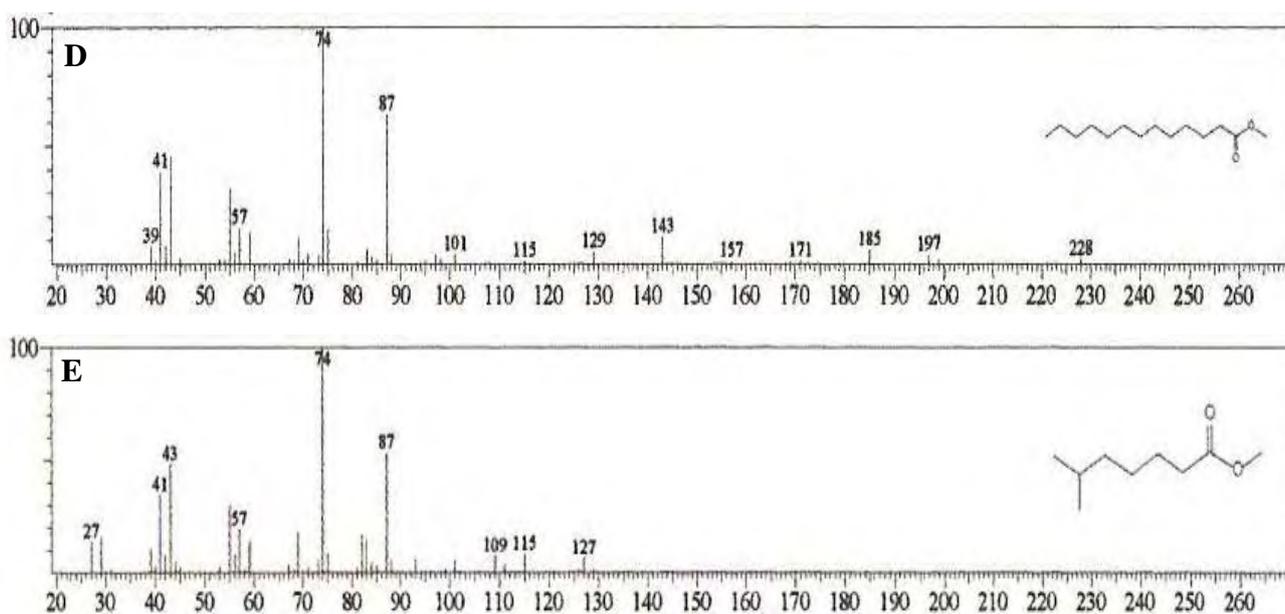
hexadecanóico (Figura 42B) e de 82% para o 14-metil- ácido pentadecanóico, ao ácido tridecanóico e ao 6-metil- heptanoato, respectivamente (Figura 42C, D e E).

**Figura 41** - Quebras moleculares relativas do Pico 1 da Amostra 2



**Figura 42** – Similaridades das fragmentações do pico 1 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS





Observa-se o padrão de quebras do ácido hexadecanóico em A; em B, a do ácido hexadecanóico; em C, as fragmentações do 14-metil- ácido pentadecanóico; e em D e E a do ácido tetradecanóico e 6-metil- heptanoato, respectivamente.

O segundo pico desta amostra, correspondendo a uma segunda molécula detectada no extrato esterificado, correspondeu a 10,83% do total da amostra integrada e o seu tempo de retenção na coluna cromatográfica foi de 17,064 minutos. A sua massa molecular foi de 143g/mol (Figura 43)

As similaridades apresentadas pelo composto quanto ao padrão de fragmentos moleculares foram de 85% para o heptacosanoato, de 83% para o 12-metil-tetradecanóico, ácido araquidônico e para o ácido cáprico, enquanto foi de 82% para o ácido docosanóico com fórmula de  $C_{23}H_{46}O_2$  (Figura 44).

**Figura 43** - Quebras moleculares relativas do Pico 2 da Amostra 2

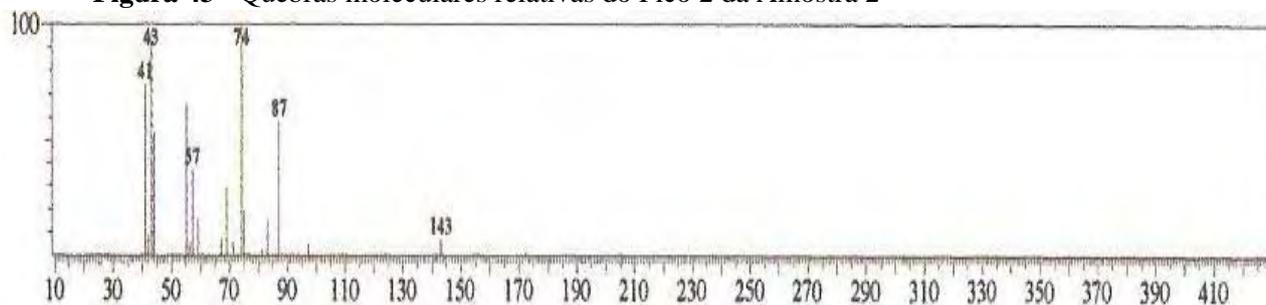
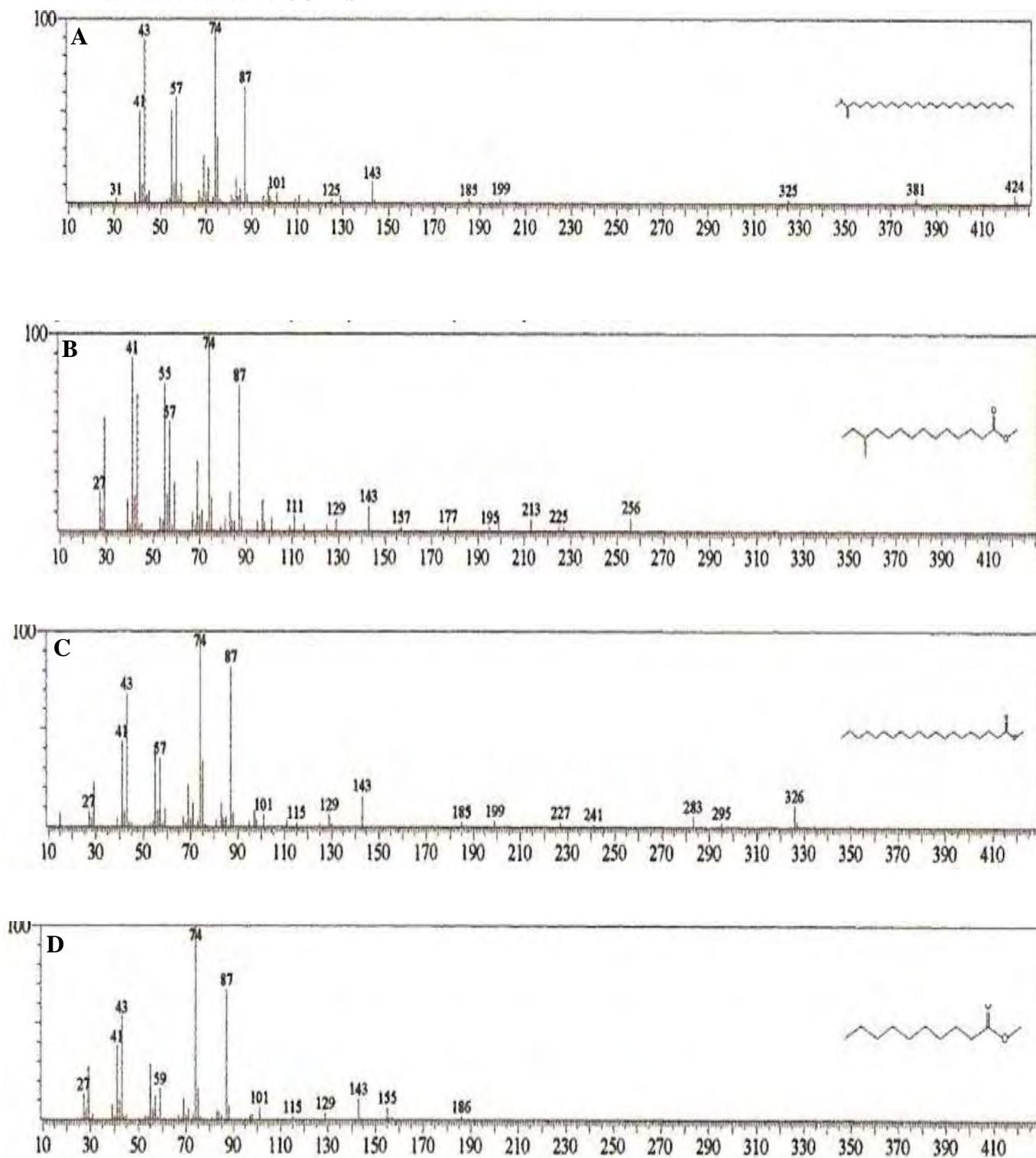
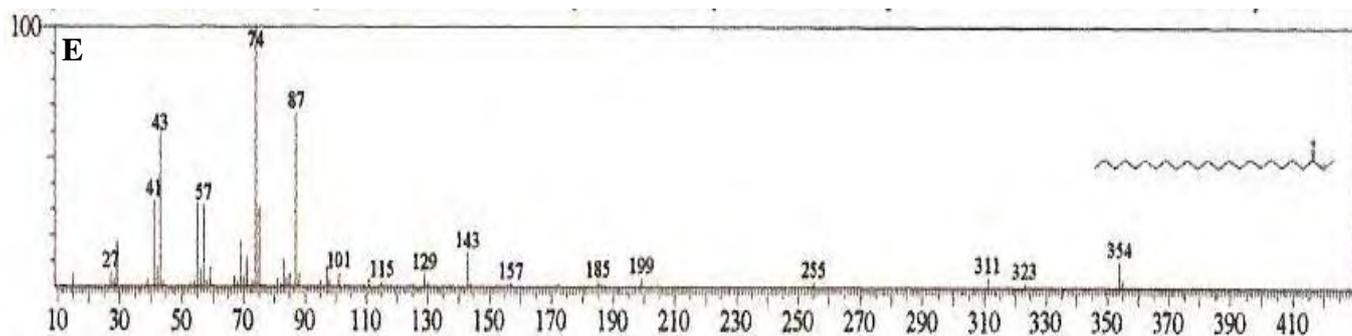


Figura 44 – Similaridades das fragmentações do pico 2 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS



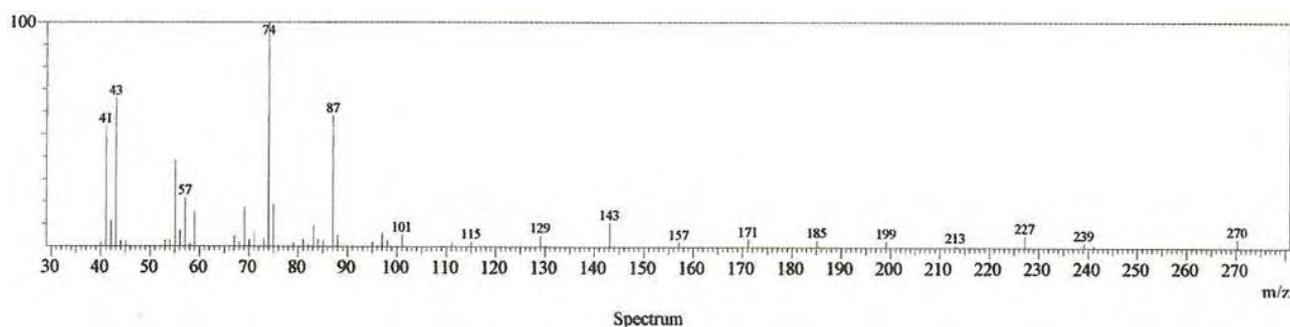


O padrão de fragmentos observados em A é a do heptacosanoato, em B, visualiza-se a do 12-metil-tetradecanóico; enquanto que em C e D a do ácido araquidônico e do ácido cáprico, respectivamente; e em E os fragmentos moleculares do ácido docosanoico.

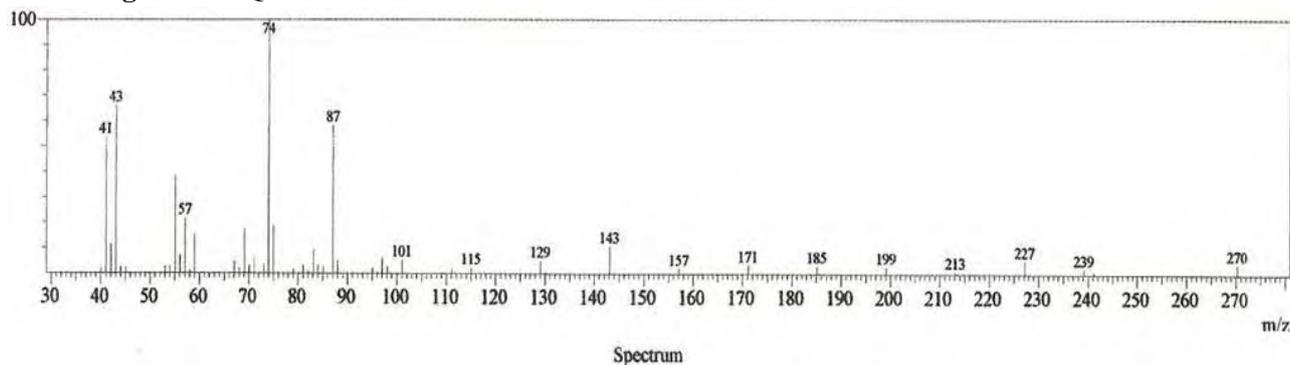
O pico 2 do segundo extrato demonstrou ter uma razão massa/carga de 143. Entretanto, faz-se necessário observar que os fragmentos apresentados pela mesma são semelhantes aos apresentados por moléculas bem maiores. Isso sugere que o composto detectado como sendo a do pico 2 apresenta quebras semelhantes a lipídios de cadeias longas.

Dando continuidade as análises das moléculas detectadas no CG-MS, a molécula detectada no cromatograma como sendo a do pico 3 (Figura 45) não apresentou similaridades com nenhum ácido graxo presente no banco de dados do espectrômetro de massas.

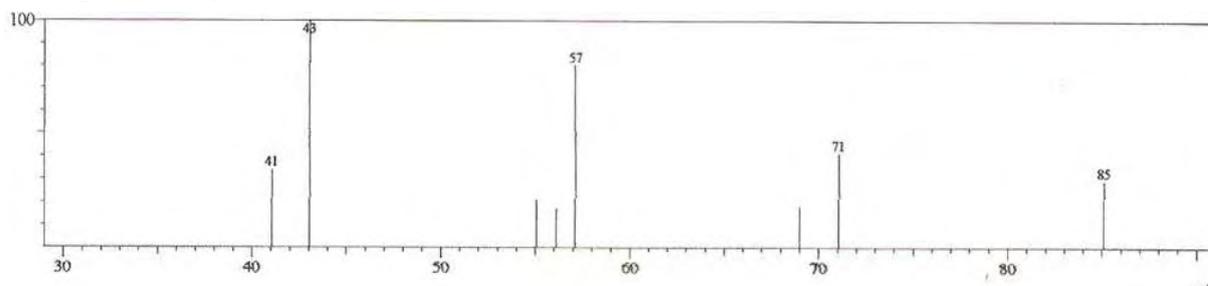
**Figura 45 -** Quebras moleculares relativas da Molécula 3 da Amostra 2



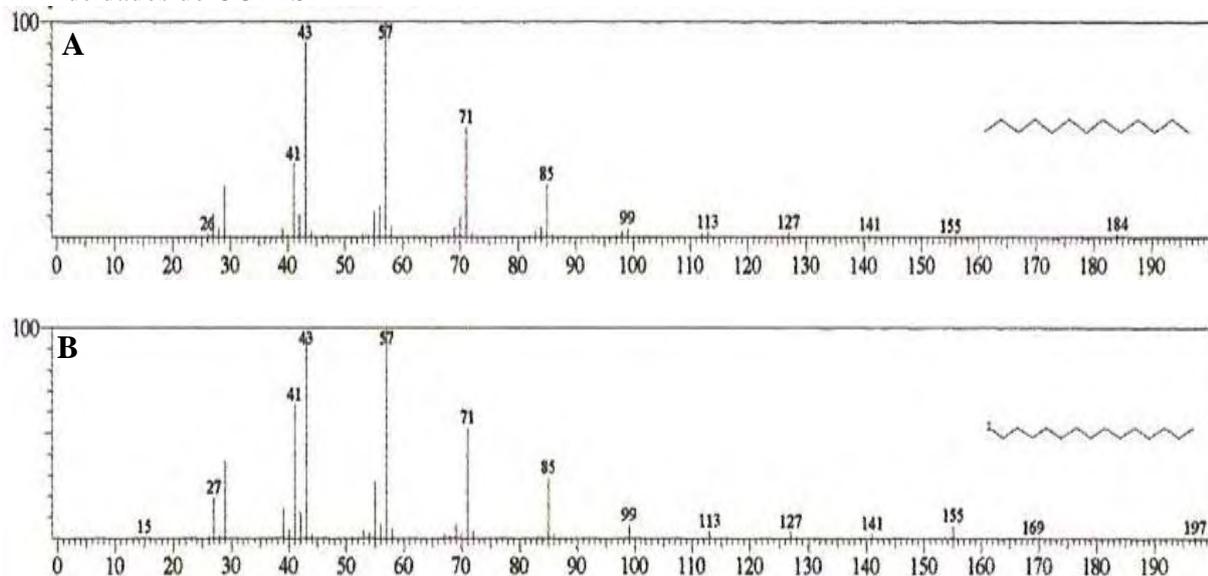
Semelhantemente ao observado com a molécula 3 da segunda amostra, a molécula 4 também não apresentou um grau de similaridade significativo com padrões de ácidos graxos presentes no banco de dados do equipamento (Figura 46).

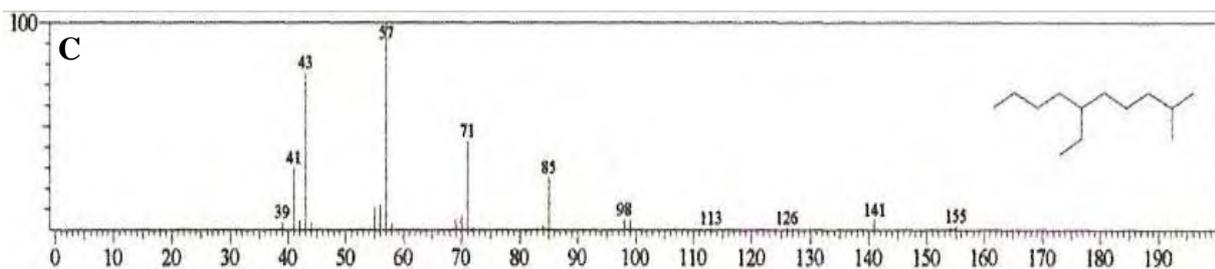
**Figura 46** - Quebras moleculares relativas da Molécula 4 da Amostra 2

A molécula 5 representou o composto em menor proporção na amostra total integrada para análise (0,17%), seu tempo de retenção foi de 19,501 minutos e a sua razão massa/carga foi de 85 (Figura 47).

**Figura 47** - Quebras moleculares relativas da Molécula 5 da Amostra 2

A similaridade apresentada entre o padrão de quebras da molécula 5 com a de substâncias presentes no banco de dados foi de 87% para o tridecano, tetradecano e 6-etil-2metil-decano (Figura 48)

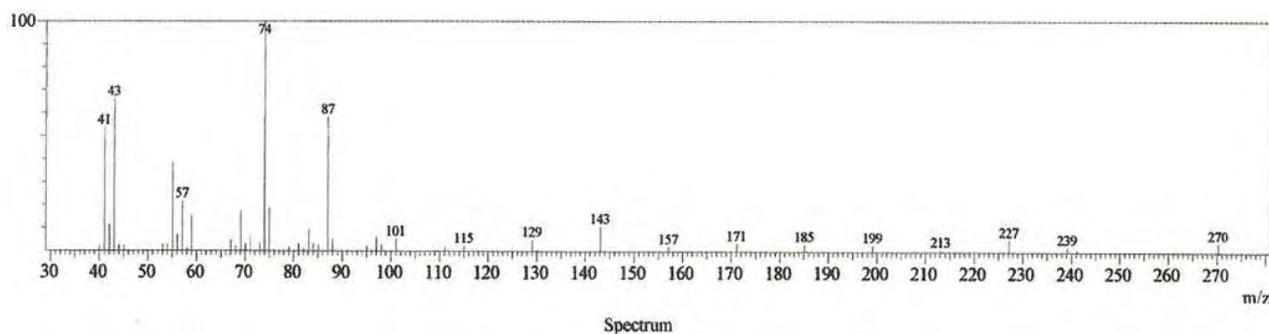
**Figura 48** - Similaridades das fragmentações do pico 5 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS



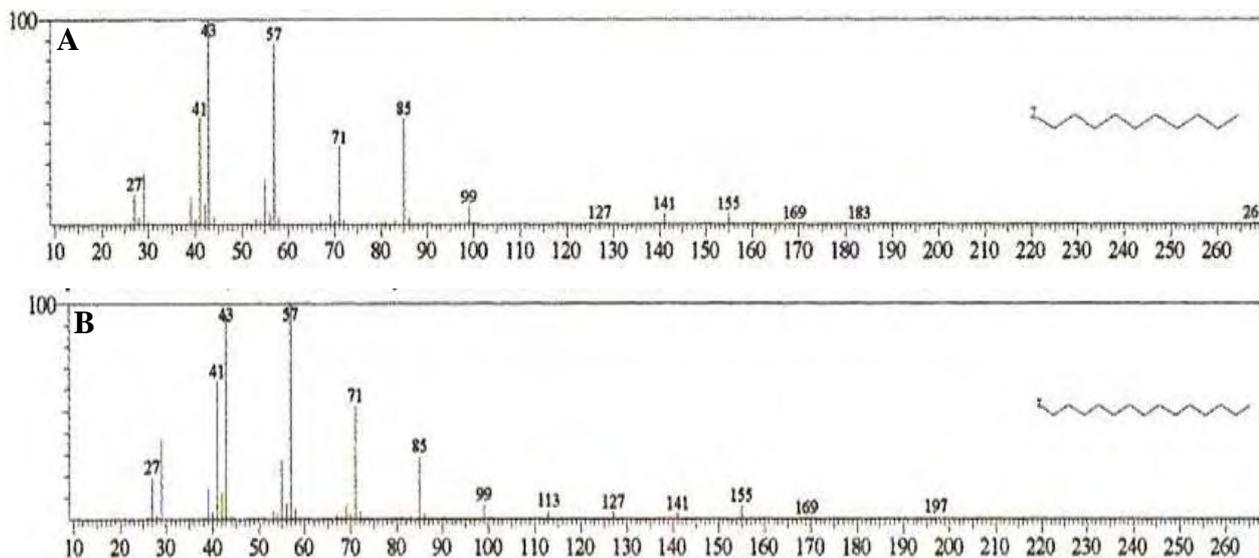
Em A observa-se as quebras do tridecano; em B, a do tetradecano e em C, a do 6-etil-2-metil-decano.

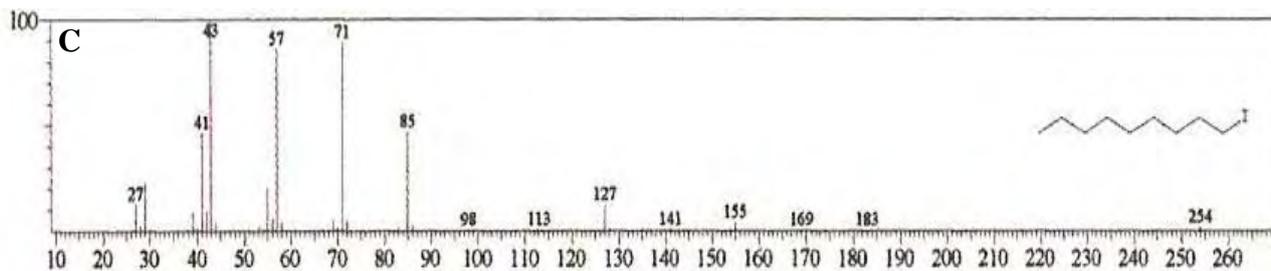
O pico 6 apresentou um tempo de retenção de 20,445 minutos, uma razão massa/carga de 270 e representou 4,16% da amostra total integrada. O padrão de quebras dessa molécula está mostrado na Figura 49 e as similaridades de suas fragmentações estão mostradas na Figura 50, na qual observa-se as quebras do 1-iodo-decano, do 1-tetradecano e do 1-nonano, todos com 85% de similaridade com a molécula 6.

**Figura 49** - Quebras moleculares relativas da Molécula 6 da Amostra 2



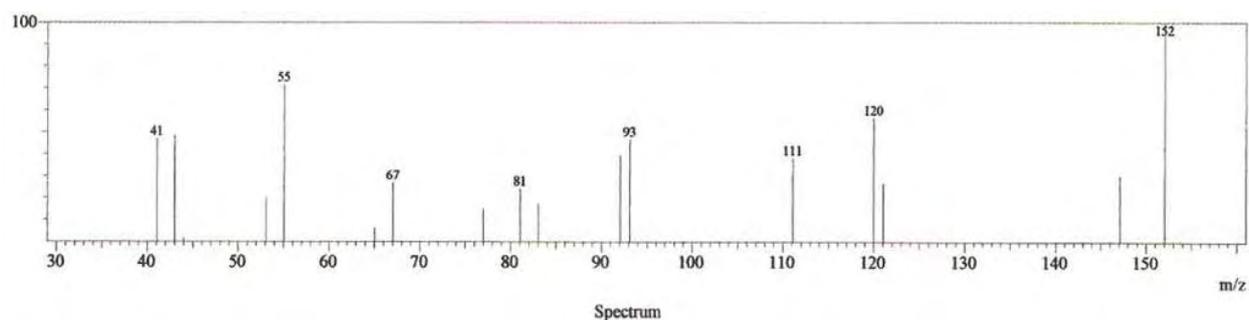
**Figura 50** - Similaridades das fragmentações do pico 6 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS



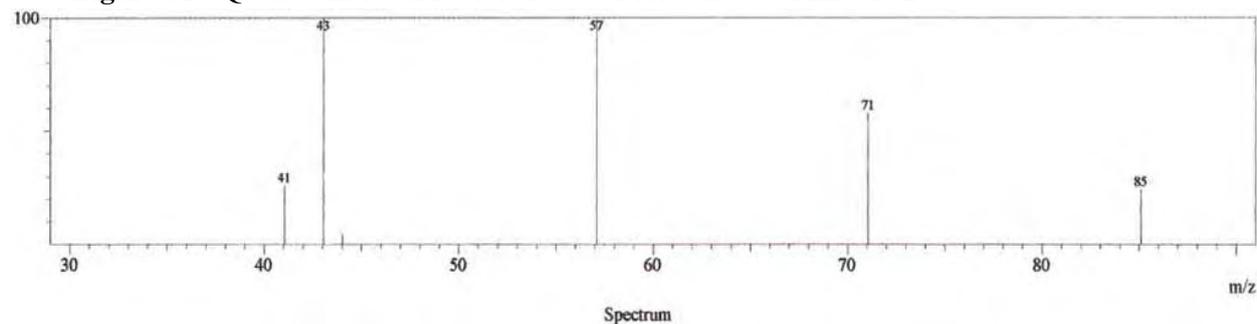


As moléculas detectadas como sendo a dos picos 7, 9 e 10 apresentaram tempo de retenção de 21,112; 22,912 e de 27,437 minutos, respectivamente, estes representaram 5,96; 2,10 e 52,59% do total da amostra integrada. Além disso, os mesmos demonstraram ter as razões de massa/carga de 152 para o pico 7 (Figura 51) ; 85 para o pico 9 (Figura 52) e de 331 para a molécula 10 (Figura 53).

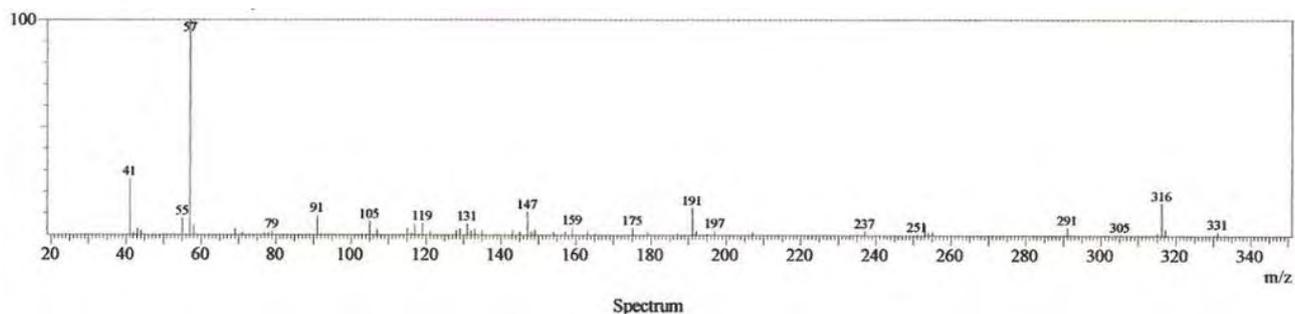
**Figura 51-** Quebras moleculares relativas da Molécula 7 da Amostra 2.



**Figura 52 -** Quebras moleculares relativas da Molécula 9 da Amostra 2

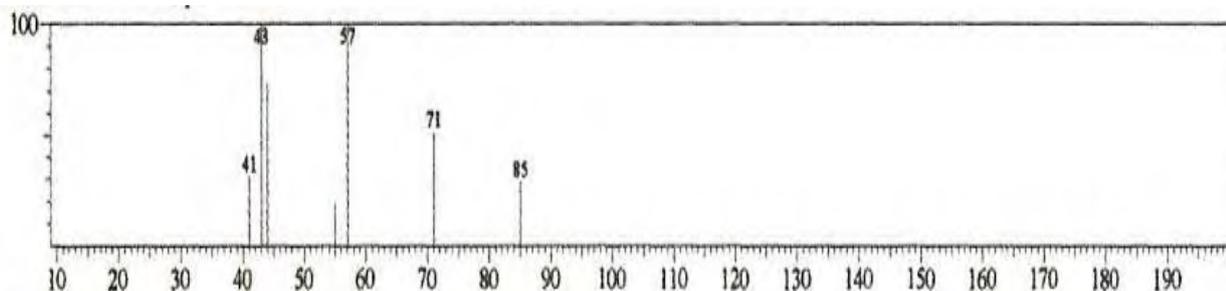


**Figura 53 -** Quebras moleculares relativas da Molécula 10 da Amostra 2

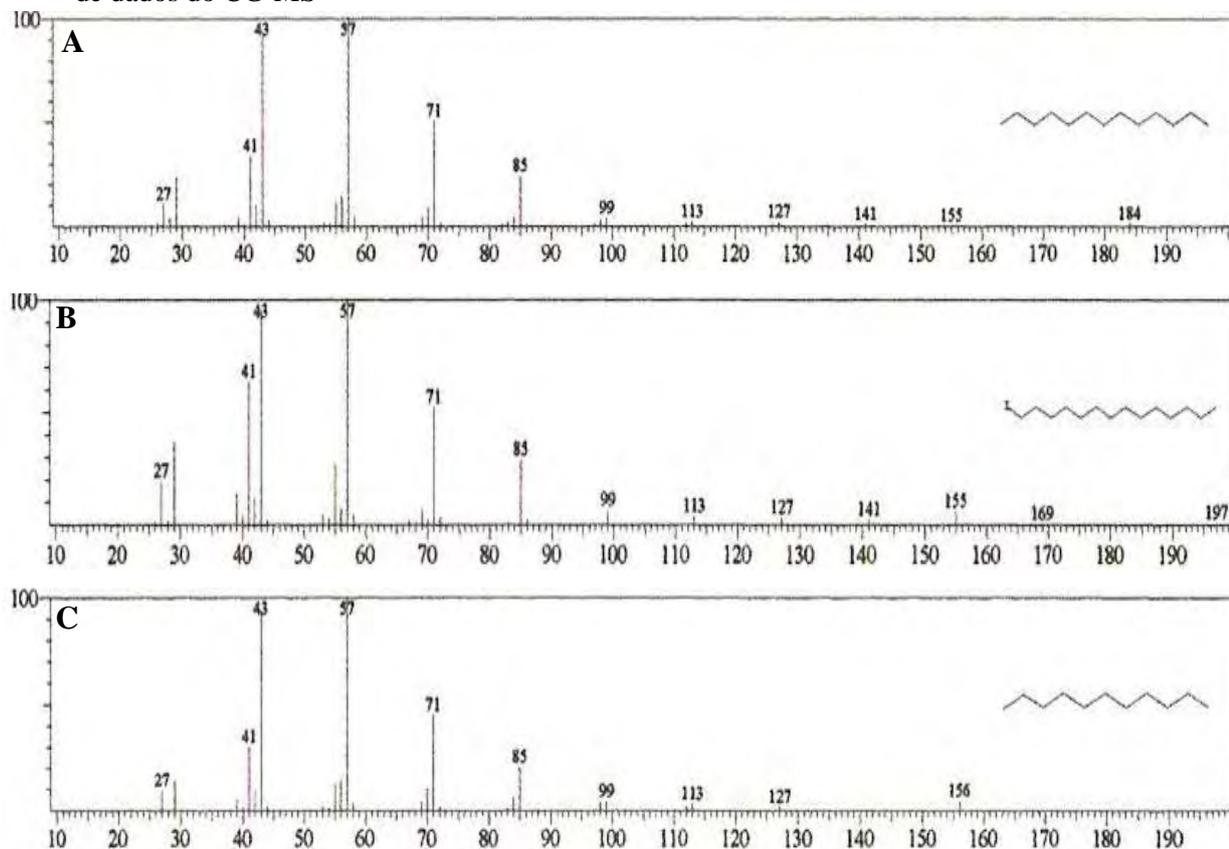


As moléculas detectadas como sendo a dos picos 7, 9 e 10 não apresentaram semelhanças nos fragmentos gerados com moléculas com cadeias carbônicas grandes, visualizadas em ácidos graxos. Entretanto, a molécula 8 que apareceu após 21,557 minutos da injeção da amostra, a qual representa 4,10% da amostra total e que possui uma razão massa/carga de 85 (Figura 54), apresentou 84% semelhança das fragmentações observadas no tridecano, no 1-iodo-tetradecanóico e no undecano (Figura 55).

**Figura 54** - Quebras moleculares relativas da Molécula 8 da Amostra 2



**Figura 55** - Similaridades das fragmentações do pico 8 com a de substâncias presentes no banco de dados do CG-MS



Em A, observa-se o padrão de quebras moleculares do composto tridecano, em B a do 1-iodo-tetradecanóico e em C a do undecano.

A utilização de um equipamento de baixa resolução para a caracterização desses ácidos graxos não foi suficiente para a elucidação de sua estrutura química, apesar do equipamento ter um banco de dados de mais de 20 mil moléculas.

Essa situação foi dificultada pelo banco de dados só possuir ácidos graxos típicos de organismos do domínio *Eucarya* e *Bacteria* e não ter em seus arquivos os encontrados em organismos do terceiro domínio da vida. Se os ácidos graxos da amostra analisada neste estudo fossem originadas de um organismo pertencente a um desses domínios, com certeza, a elucidação estrutural dos mesmos seria obtida pela comparação dos padrões de quebra já estarem no banco de dados do equipamento.

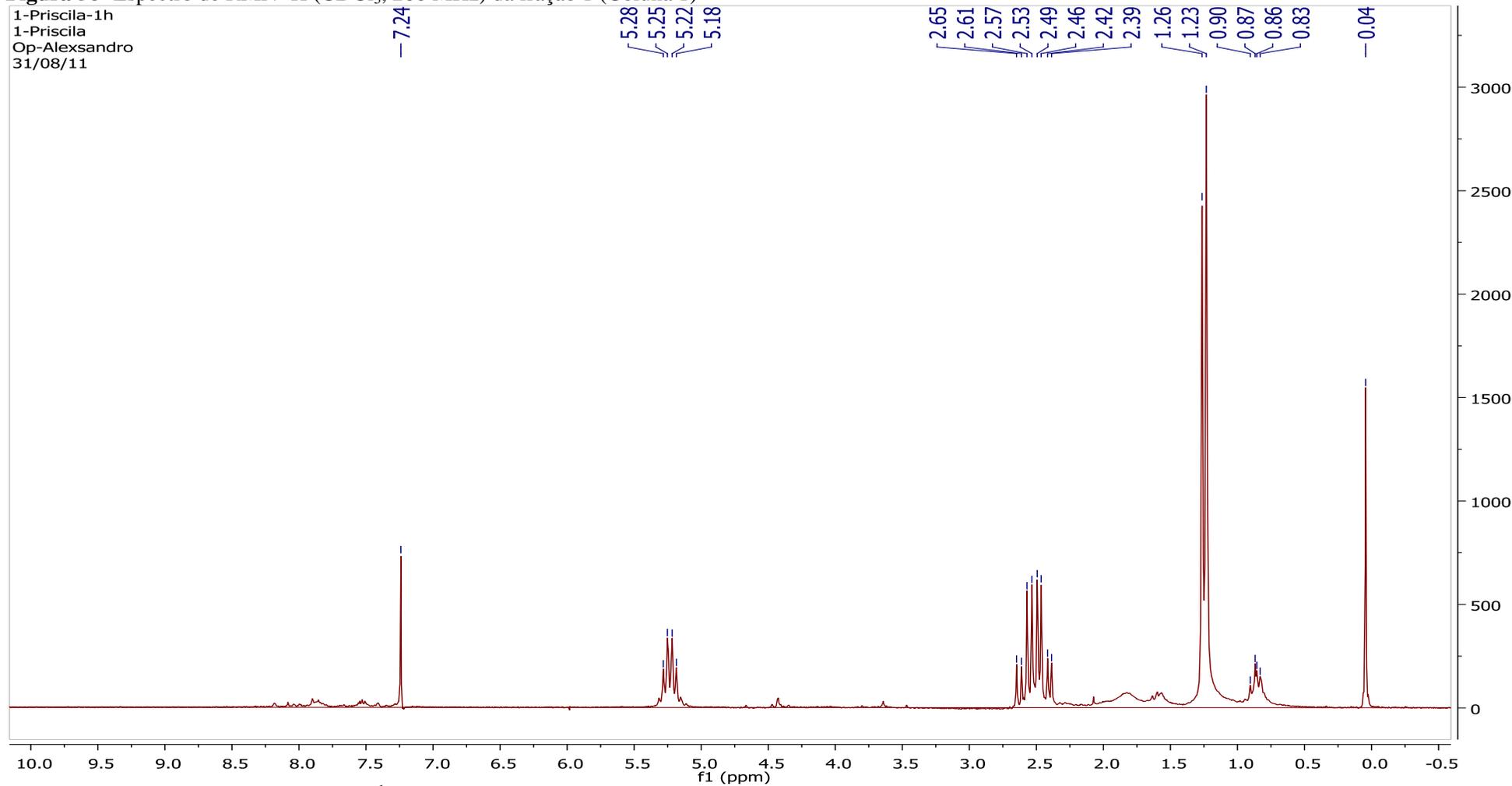
Adicionalmente, os lipídios de uma maneira geral apresentam cadeias carbônicas extensas e apesar de em arqueias essas cadeias serem ramificadas (polisoprenóides), a cadeia principal é semelhante a encontrada em *Eucarya* e *Bacteria*, não sendo possível diferenciá-las por este equipamento. Desta forma, justifica-se a comparação com moléculas presentes em bactérias e eucariontes. Além disso, é importante lembrar que as cadeias de ácidos graxos apresentam uma razão massa/carga maior que 1.000 (LOBASSO, 2007) e o equipamento utilizado apresentava uma capacidade de detectar moléculas com uma razão massa/carga de 350, no máximo.

Entretanto, esse resultado parcial retrata que o método utilizado para a extração dos ácidos graxos se deu de maneira adequada, porque o equipamento captou fragmentos moleculares típicos destas moléculas, nos quais foram observadas cadeias carbônicas extensas. Além disso, esses resultados também demonstram que o protocolo utilizado para a esterificação das amostras foi eficiente, pois as moléculas captadas pelo CG-MS se apresentavam na forma de éster.

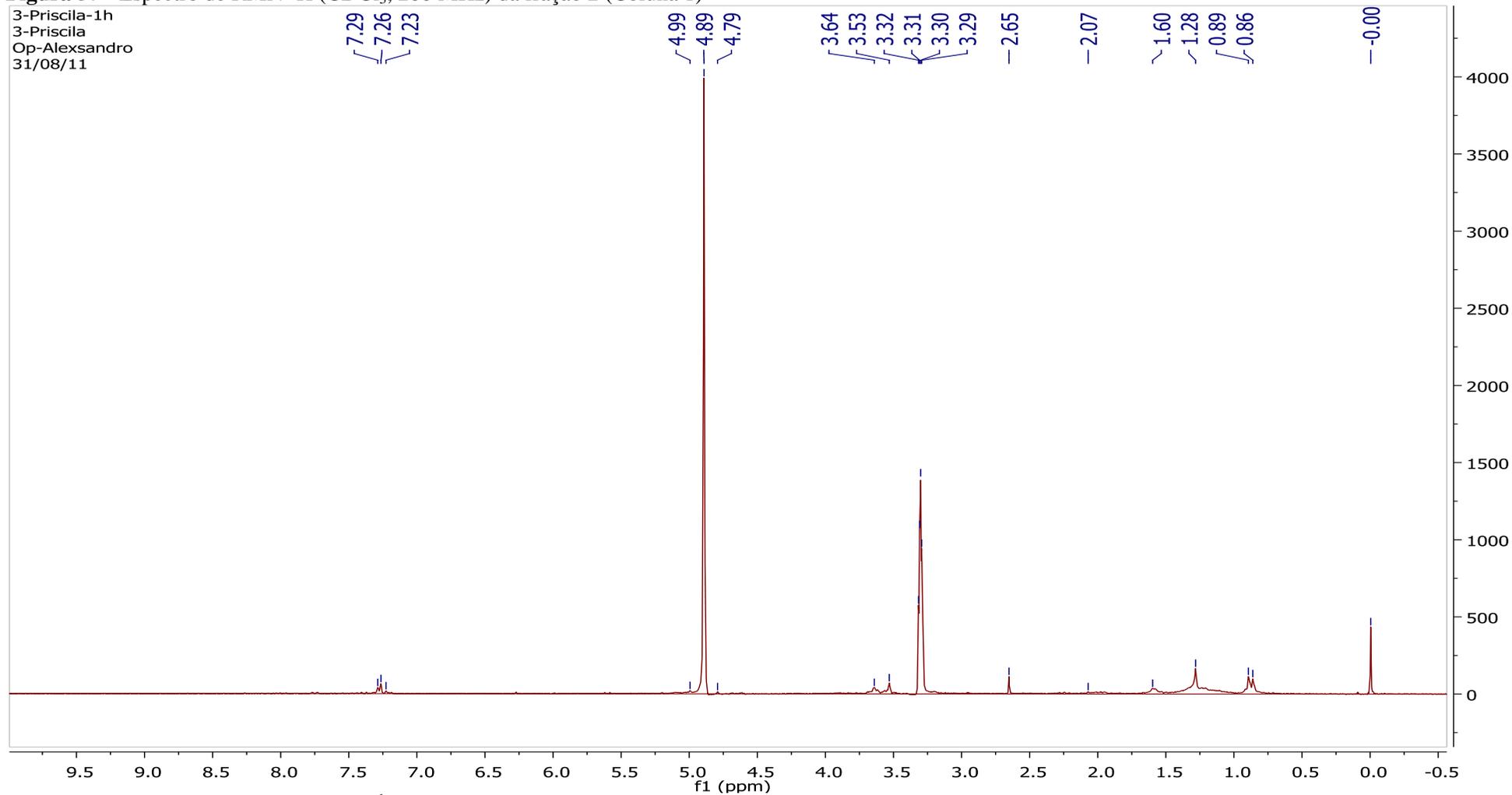
Adicionalmente, esses resultados demonstraram o grau de semelhança entre as estruturas encontradas nos diferentes domínios, estando de acordo com a proposta evolutiva a qual retrata que os organismos do domínio *Archaea* tiveram um ancestral comum com os eucariotos, justificando a semelhança estrutural, mas ao mesmo tempo mostra que os organismos desse terceiro domínio possuem características diferenciadas o suficientes para serem distinguidas em um terceiro domínio.

## 5.6 FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LIPÍDIOS DE *Halococcus morrhuae* POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

O fracionamento do extrato bruto de ácidos graxos de *H. morrhuae* resultou em um total de cinquenta e duas frações. As três primeiras delas apresentaram coloração alaranjada, sugerindo a presença de pigmentos nas mesmas. Foram realizadas as análises das amostras pela técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 56 e 57), mas os espectros não foram suficientes para a caracterização das estruturas dos ácidos graxos presentes. Entretanto, foi possível observar que a maioria dos picos presentes no espectro estão localizados em uma faixa inferior a 5 ppm (deslocamento químico), confirmando a ausência de compostos aromáticos na amostra analisada e fortalecendo a proposta de compostos com carbonos alifáticos.

**Figura 56-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da fração 1 (Coluna 1)

As multiplicidades no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (dupleto), dd (duplo dupleto), dl (dupleto largo), t (triplete), q (quadrupeto), m (multipeto).

**Figura 57** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) da fração 2 (Coluna 1)

As multiplicidades no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), dl (duplete largo), t (triplete), q (quadruplete), m (multiplete).

## 5.7 CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LINHAGEM MC1061, XL1-BLUE E DH5 $\alpha$ DE *Escherichia coli* NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO

*Escherichia coli* é tida como um dos modelos clássicos para estudos em biologia molecular e foi escolhida, neste trabalho, por apresentar inúmeras vantagens, como por exemplo, o crescimento rápido, por ser passível de transformação e por não ter um grande desempenho quando cultivada em meios com altas concentrações de sal. Podendo esta variar de 0 a 0,5% para ter um crescimento ótimo, como presente na maioria dos meios de cultura utilizados para bactérias.

Para se ter a certeza de que um determinado gene tornaria *E. coli* mais resistente, seria necessário que ela conseguisse apresentar um crescimento significativo em uma concentração que antes, sem o gene, era letal e que, por isso, a mesma não conseguia crescer. Portanto, o primeiro passo para esse estudo foi analisar o crescimento dessa bactéria em concentrações crescentes do sal cloreto de sódio para que se soubesse a partir de qual concentração a mesma é tóxica para o seu crescimento e desenvolvimento.

As concentrações testadas de cloreto de sódio para avaliar a sensibilidade a esse sal, foram: 0; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5% de NaCl em meio nutriente ágar. Iniciando a avaliação do crescimento pela linhagem MC1061, nas placas do controle obtiveram-se cerca de 4.500 colônias, quando o inóculo foi de 10 $\mu$ L da cultura que havia sido diluída 10<sup>-8</sup> vezes. Este dado mostra que existiam cerca de 4,5 x 10<sup>14</sup> unidades formadoras de colônias (UFC).

Nas placas contendo 4% ; 4,5 e 5% de NaCl foi possível observar a presença de algumas colônias, ao passo que nas placas contendo 6% de NaCl a frequência de sobrevivência foi de 5,5 x 10<sup>-13</sup>, mostrando que o crescimento de *E. coli* nesta concentração de sal foi não significante. Nas concentrações de 6,5%; 7% e 7,5% NaCl foram visualizadas apenas microcolônias. Desta forma, a concentração escolhida para se construir a biblioteca com MC1061 foi de 6% NaCl.

Paralelamente, as placas do controle cultivadas com a linhagem XL1-Blue e que tiveram um inóculo de 10  $\mu$ L, apresentaram cerca de 5.000 colônias, o que significa que existiam 5 x 10<sup>14</sup> unidades formadoras de colônias (UFC), aproximadamente. Iniciando as análises do crescimento desta linhagem, pode-se observar o crescimento de várias colônias nas concentrações de 4 e 4,5% de NaCl, enquanto que nas placas com a concentração de 5%, o número de unidades formadoras de colônia foi de 150 UFC/mL e

a frequência de sobrevivência foi de  $1,2 \times 10^{-12}$ . Nas demais concentrações o crescimento foi ausente. Com estes dados, a concentração escolhida para a triagem de clones recombinantes da linhagem XL1-Blue foi de 5% de NaCl no meio de crescimento.

Por fim, a linhagem de *Escherichia coli* utilizada para transformação por choque térmico e quimiocompetência foi DH5 $\alpha$ . O crescimento observado nos cultivos do controle foi de  $4,53 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colônias. Semelhante ao crescimento observado nas outras linhagens, no meio de cultura contendo 4%; 4,5% e 5% de NaCl houveram várias colônias da bactéria. Já na concentração de 5,5% de NaCl foi observado uma redução no número de colônias, estas que se resumiram a apenas uma única colônia quando cultivadas em meio contendo 6% de NaCl. Nas concentrações mais altas, o crescimento foi ausente e com estes dados, a concentração escolhida para se trabalhar com os clones de DH5 $\alpha$  foi de 6% de NaCl.

Os resultados acima demonstram um padrão de crescimento semelhante entre as diferentes linhagens de *Escherichia coli*. Entretanto, a linhagem XL1-Blue se mostrou mais sensível, quando comparada com as linhagens MC1061 e DH5 $\alpha$ . A redução do crescimento observado nas concentrações de 4; 4,5; 5 e 5,5% de NaCl para MC1061 e XL1-Blue, assim como nas concentrações de 4 e 4,5% de DH5 $\alpha$ , pode ser resultado do grande gasto energético para se apresentar uma resposta osmoreguladora ( CSONKA, 1989; GOULD, 1989; KNOCH & GOULD, 1995).

Enquanto que a ausência do crescimento de *E. coli* nas demais concentrações demonstra que as mesmas são letais para o seu desenvolvimento, uma vez que a perda da culturabilidade de alguns microrganismos é dependente da concentração de NaCl (CHEVILLE *et al.*, 1996; MATTICK *et al.*, 2000; ASAKURA *et al.*, 2002; BESNARD *et al.*, 2002; ARMANDA *et al.*, 2003; WONG & WANG, 2004; ASAKURA *et al.*, 2005)

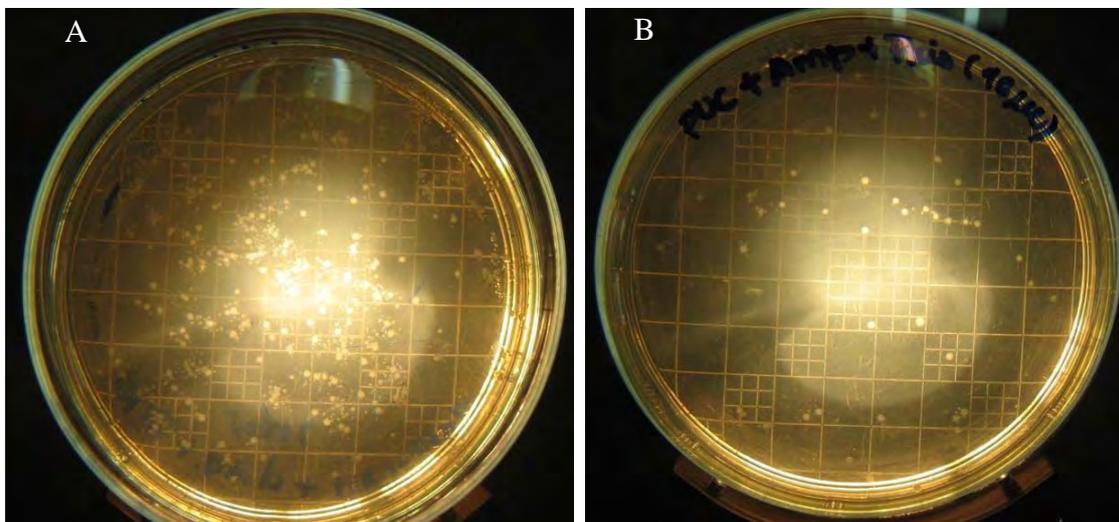
Adicionalmente, Othomo & Saito (2001) mostraram a perda da capacidade de formar colônias pela linhagem O157:H7 de *E. coli* quando cultivada com teor final de 5% de NaCl e este resultado assemelha-se com o encontrado no presente estudo.

## 5.8 BIBLIOTECAS GENÔMICAS CONSTRUÍDAS COM O VETOR BLUESCRIPT

As células eletrocompetentes de MC1061 preparadas neste estudo apresentaram uma eficiência de  $1,03 \times 10^7$  transformantes/ $\mu$ g do plasmídeo (Figura 58A), enquanto

que a linhagem de XL1-Blue (Figura 58B) apresentou uma taxa de eficiência de 175,21 colônias/ng, isto é,  $1,75 \times 10^5$  colônias/ $\mu\text{g}$  de DNA.

**Figura 58-** Crescimento de linhagens de *E. coli* transformadas por eletroporação



Em A, observa-se o crescimento de uma das placas transformadas da linhagem de MC1061 e em B, visualiza-se colônias de XL1-Blue. Fotos: PRISCILLA ANNE (2010)

Neste estudo foram utilizadas essas duas linhagens para eletrotransformação, pois a pesquisa foi iniciada com a linhagem MC1061, mas foi conseguida a XL1-Blue, posteriormente, que segundo Tu e colaboradores (2005), apresenta uma eficiência significativa na transformação, sendo a linhagem mais utilizada na atualidade e por isso, decidiu-se utilizá-la neste trabalho. O passo seguinte foi a extração do DNA total de *H. morrhuae* (Figura 59), que apresenta um genoma contendo 4.300.000pb ( $4,3 \times 10^6$ pb), segundo Morris e colaboradores (1993).

**Figura 59** – DNA de *Halococcus morrhuae* extraído pelo método CTAB.

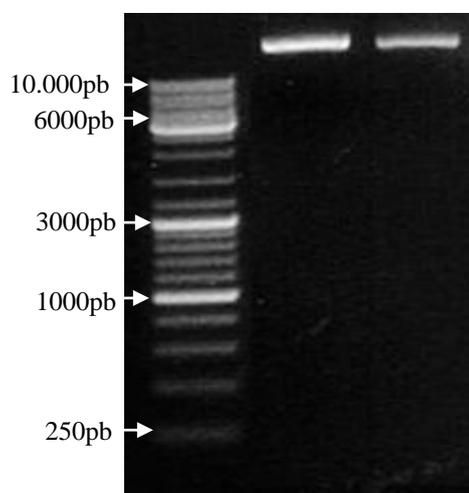


Foto: PRISCILLA ANNE (2010)

Em seguida, foi realizada a digestão tanto do DNA total extraído de *Halococcus morrhuae*, assim como a do plasmídeo a ser utilizado como vetor de expressão do inserto. Foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose para observar a fragmentação do material genético assim como a purificação de duas faixas do DNA de *Halococcus morrhuae*.

A primeira faixa, denominada aqui de faixa pesada, é constituída por fragmentos de DNA com tamanhos que variavam entre 2 e 4Kb, tamanho aproximado de um operon, enquanto que a faixa leve contém fragmentos de 1 a 2Kb, tamanho aproximado de um gene. O gel de agarose (1%) com as duas faixas de peso molecular retiradas está mostrado na Figura 60.

**Figura 60** – Excisão da faixa leve e pesada do DNA digerido de *H. morrhuae*.

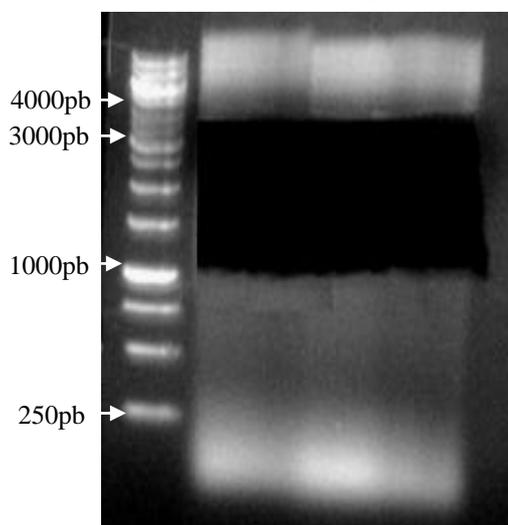


Foto: PRISCILLA ANNE (2010)

Semelhantemente ao protocolo feito com o DNA de *H. morrhuae*, analisou-se a eficiência da digestão do plasmídeo pBLuescript através de eletroforese unidimensional (Figura 61), pois se a digestão tivesse ocorrido de maneira adequada, o vetor estaria linearizado e conseguiria ser deslocado com maior facilidade pela diferença de potencial criada pela fonte.

**Figura 61** – Digestão do plasmídio pBluescript com EcoRI.

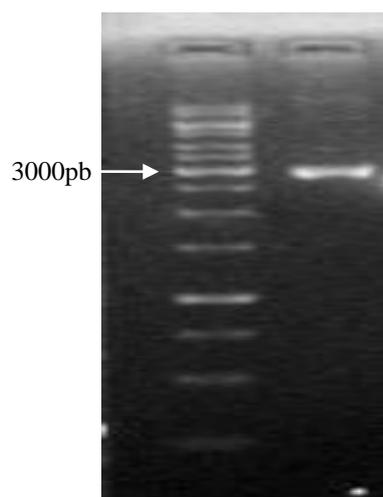
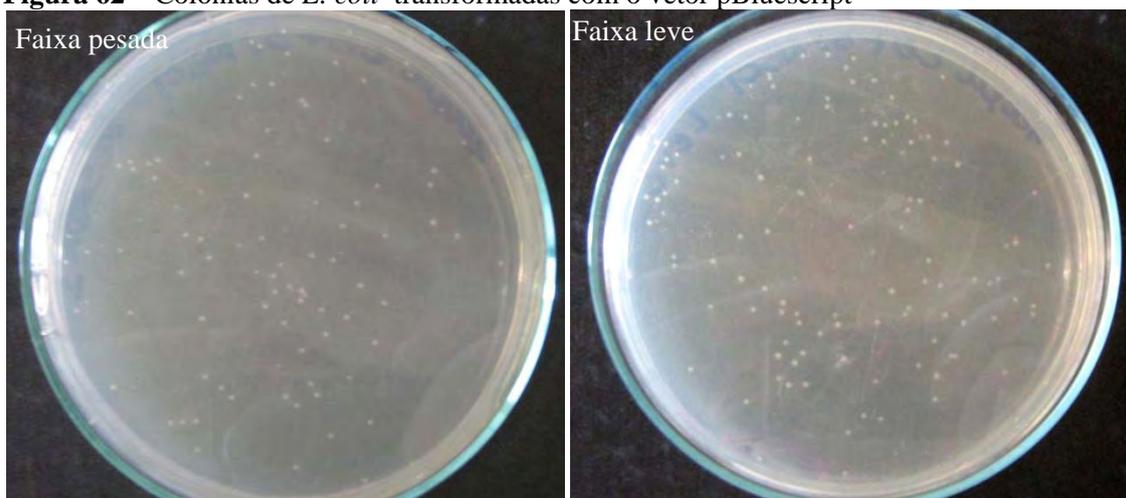


Foto: PRISCILLA ANNE( 2010)

Como mostrado na Figura 61, o vetor linearizado apresentava uma banda correspondente ao valor de 3 Kb e esta banda foi retirada do gel. Após a purificação e a dosagem de sua concentração, foi realizado o tratamento do plasmídio com a fosfatase alcalina. Além disso, também foram realizados testes para avaliar a recircularização do vetor, uma vez que este fenômeno acontece de maneira rápida pela presença de extremidades coesivas em seu DNA.

Ao longo deste trabalho foram feitas diversas digestões do plasmídio pBluescript, assim como transformações de *E. coli* com estes vetores para se avaliar se os mesmos estavam linearizados, mas apenas duas digestões apresentaram colônias quando cultivadas após a transformação com plasmídio digerido. Nestes casos, a média foi de sete colônias quando inoculados 800  $\mu$ L, isto é, 8,75 colônias/mL e mesmo com esse pequeno crescimento o vetor foi digerido novamente.

Com o vetor totalmente linearizado e com as suas extremidades desfosforiladas, foram realizadas avaliações se o vetor estaria linearizado através de eletroporações e quando apareceram colônias contendo o pBluescript, o vetor foi tratado novamente com EcoRI e a fosfatase alcalina. Em seguida aos tratamentos e avaliações realizados com o plasmídio pBluescript, foi feita a ligação do DNA, da faixa leve e pesada, de *H. morrhuae* ao vetor. Posteriormente, alíquotas das reações de ligação para a transformação de *E. coli* (Figura 62).

**Figura 62** – Colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pBluescript

Fotos: PRISCILLA ANNE (2010)

Inicialmente, as transformações foram feitas através da eletroporação de células de *E. coli* MC1061, mas nenhuma colônia foi capaz de crescer em meio de cultura com uma concentração de 6% de NaCl. Desta forma, iniciaram-se as transformações utilizando XL1-Blue e assim, pode-se observar as primeiras colônias em placa com sal, estas que foram cultivadas em meio líquido e, posteriormente, repassada para meio sólido contendo de 5 a 7% de NaCl, na presença e na ausência do IPTG.

Entretanto, dos doze clones (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11 e C12) que cresceram em concentrações elevadas de sal, cinco deles (C2, C3, C4, C6, C10) não conseguiram mais crescer em placas com sal após ter sido cultivado em meio LB com ampicilina e posteriormente ter sido colocado sob estresse abiótico, crescendo apenas nas placas do controle (Figura 63).

Por outro lado, C1, C5, C6, C7, C8, C9, C11 e C12 cresceram nas placas com sal, mas não apresentaram diferenças nos padrões de crescimento quando cultivados com IPTG e sem IPTG, demonstrando que a presença e a transcrição do gene não era o responsável pelo seu desempenho, sendo este de natureza intrínseca.

**Figura 63** – Placa do controle mostrando o crescimento de transformantes

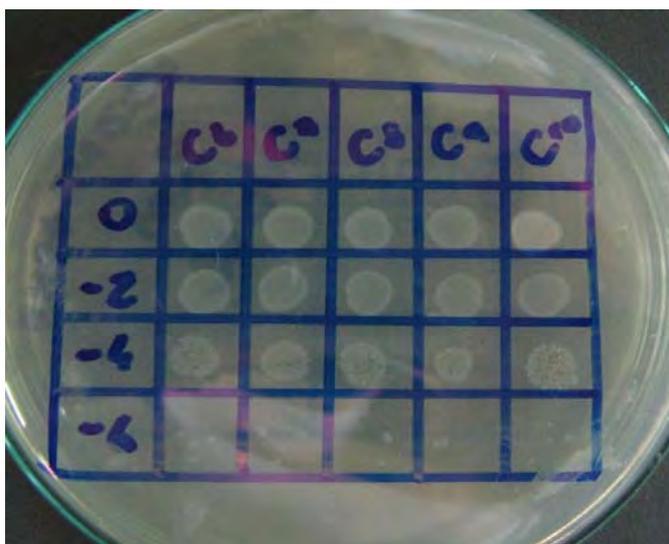


Foto: PRISCILLA ANNE (2010)

O crescimento das colônias de *E. coli* transformadas em meio com um teor elevado de sal ocorre de maneira lenta, por isso, a avaliação de seu crescimento foi feita ao longo de quinze dias. Paralelamente a esse estudo foi realizada a extração dos plasmídios das colônias que haviam crescido em placas com sal e, em seguida, foi feita uma corrida eletroforética com o material genético extraído. Como mostrado na Figura 64, pode-se perceber a presença apenas de plasmídios fechados, corroborando com os resultados encontrados quando o crescimento dessas colônias foi feito na presença e na ausência do IPTG.

**Figura 64** – Gel com plasmídios extraídos por Miniprep

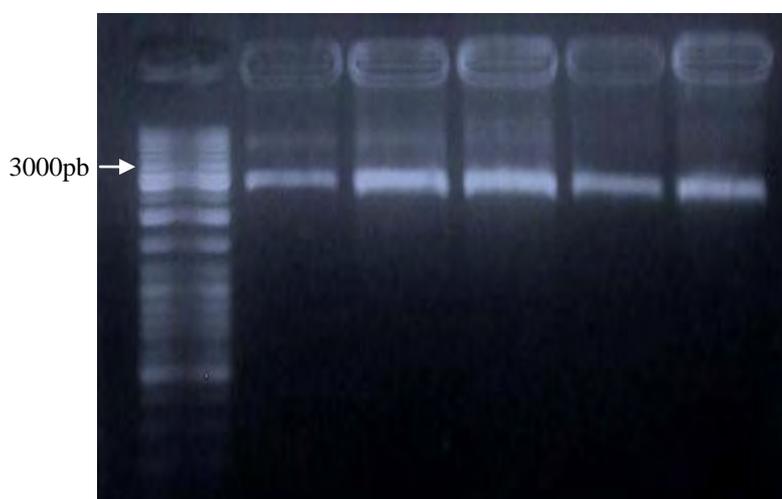


Foto: PRISCILLA ANNE (2010)

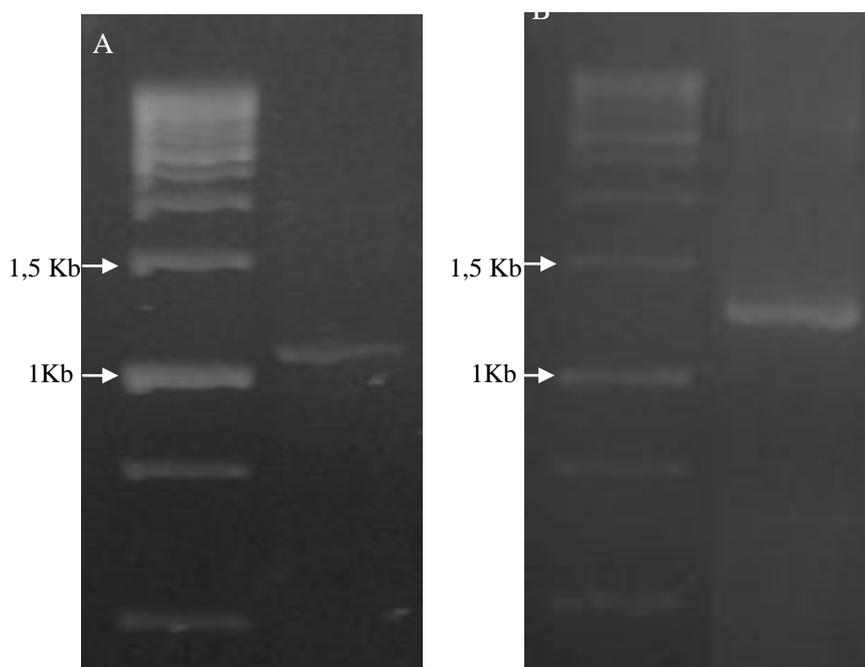
### 5.9 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE GENES DE *Halococcus morrhuae* EM *Escherichia coli*

Células quimiocompetentes da linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli* foram preparadas para a sua transformação, pelo método do choque térmico. As células quimiocompetentes preparadas apresentaram uma eficiência de  $2,37 \times 10^6$  colônias de transformantes/ $\mu\text{g}$  do vetor.

Posteriormente, foi realizada a padronização do protocolo e das temperaturas de anelamento dos primers para amplificação dos genes utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), através da qual se conseguiu amplificar dois genes.

A primeira ORF (*Open Read Frame*) é de um contra-transportador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , nomeado aqui de Anti  $\text{Na}^1$ , este que apresentou um tamanho de aproximadamente 1,1 Kb e a segunda ORF é de um antiporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que apresentou um tamanho de 1,3 Kb (Figura 65).

**Figura 65** - Bandas de DNA após amplificação com primers de *Haloferax volcanii*



Em A observa-se a banda de DNA correspondente ao antiporte Anti  $\text{Na}^1$ , enquanto que em B visualiza-se a amplificação para o gene do antiporte Anti 5. Fotos: PRISCILLA ANNE (2011)

Após a amplificação das ORF's com os oligonucleotídios de *Haloferax volcanii* ter sido realizada, foi feita a purificação desses produtos para retirada de fragmentos pequenos de DNA e dímeros de primers, assim como de sais e enzimas que ainda poderiam estar na amostra.

Com o produto purificado, fez-se o corte das extremidades tanto dos produtos de PCR quanto do vetor pJET em extremidades abruptas. Em seguida, fez-se a ligação dos produtos de PCR (insertos) com o plasmídeo de forma separada e transformou-se as células de DH5 $\alpha$  pela técnica do choque-térmico (Figura 66).

**Figura 66** – Transformantes contendo o inserto ligado ao vetor pJET



Foto: PRISCILLA ANNE (2011)

O vetor pJET 1.2 foi o vetor escolhido para a construção dos plasmídeos recombinantes por possuir em sua estrutura a sequência do gene que codifica para a endonuclease de restrição *Eco471*, que é letal para as células hospedeiras de *Escherichia coli*. Desta forma, as colônias que crescerem, obrigatoriamente, possuem o inserto, pois se o mesmo não estivesse presente, as colônias não sobreviveriam devido ao produto do gene letal. Adicionalmente, as colônias também têm que conter o plasmídeo, por ser ele que confere a resistência ao antibiótico presente no meio de cultura.

As transformações por choque térmico realizadas, apresentaram uma média de crescimento de 720 colônias/mL e 580 colônias/mL para Anti Na<sup>1</sup>(Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) e Anti 5 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), respectivamente, e os valores para eficiência da transformação foi 1,44x10<sup>4</sup>colônias/ $\mu$ g para Anti Na<sup>1</sup> e de 1,16 x 10<sup>4</sup> colônias/  $\mu$ g para Anti 5.

### 5.9.1 Análises da funcionalidade em meio sólido de cultura

As células transformadas foram plaqueadas em meio sem sal e após 24 horas de transformação foram cultivadas em meio líquido acrescido de Ampicilina para manter a pressão seletiva e, posteriormente, os clones foram repassados para meio nutriente ágar acrescido de Ampicilina e contendo 0; 5%; 6% ou 7% de NaCl, sem IPTG ou com IPTG. Os clones foram diluídos até  $10^{-6}$  e foi observada diferença no crescimento das clones cultivados com o gene estando expresso e com o gene inativo (Tabela 7). Esse protocolo foi repetido 10 vezes e todos foram realizados com 96 clones em duplicata.

**Tabela 7-** Padrão de crescimento dos recombinantes

<b>Antiporte Anti Na<sup>1</sup></b>	<b>0</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>
Placas do controle	+++	+++	+++	++
5% NaCl+Amp+IPTG	+++	+++	++	-
5% NaCl+Amp-IPTG	++	+	-	-
6% NaCl+Amp+IPTG	++	+	-	-
6% NaCl+Amp-IPTG	-	-	-	-
7% NaCl+Amp+IPTG	-	-	-	-
7% NaCl+Amp-IPTG	-	-	-	-
<b>Antiporte Anti 5</b>	<b>0</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>
Placas do controle	+++	+++	+++	++
5% NaCl+Amp+IPTG	+++	+++	+++	++
5% NaCl+Amp-IPTG	++	++	-	-
6% NaCl+Amp+IPTG	++	++	+	-
6% NaCl+Amp-IPTG	-	-	-	-
7% NaCl+Amp+IPTG	-	-	-	-
7% NaCl+Amp-IPTG	-	-	-	-

Analisando o crescimento dos transformantes contendo o gene do antiporte Anti Na<sup>1</sup>, observa-se que os mesmos apresentaram crescimento em todas as diluições das cultivos do controle, assim como nas cultivos contendo 5% de sal suplementado com IPTG. Entretanto, essas mesmas células só cresceram até a diluição de  $10^{-2}$  quanto o

IPTG não esteve presente, mostrando que a presença da expressão Genética fazia diferença.

Na presença do IPTG em meio de cultura contendo 6% de NaCl, as células de *E. coli* com o antiporte Anti Na<sup>1</sup>, cresceram até a diluição de 100 vezes, mas não cresceram na placa sem IPTG em nenhuma das diluições, o que reforça o resultado encontrado na concentração anterior de sal. Por fim, não foi observado crescimento de nenhuma colônia em placas com 7% de sal, independentemente da ausência ou da presença do IPTG.

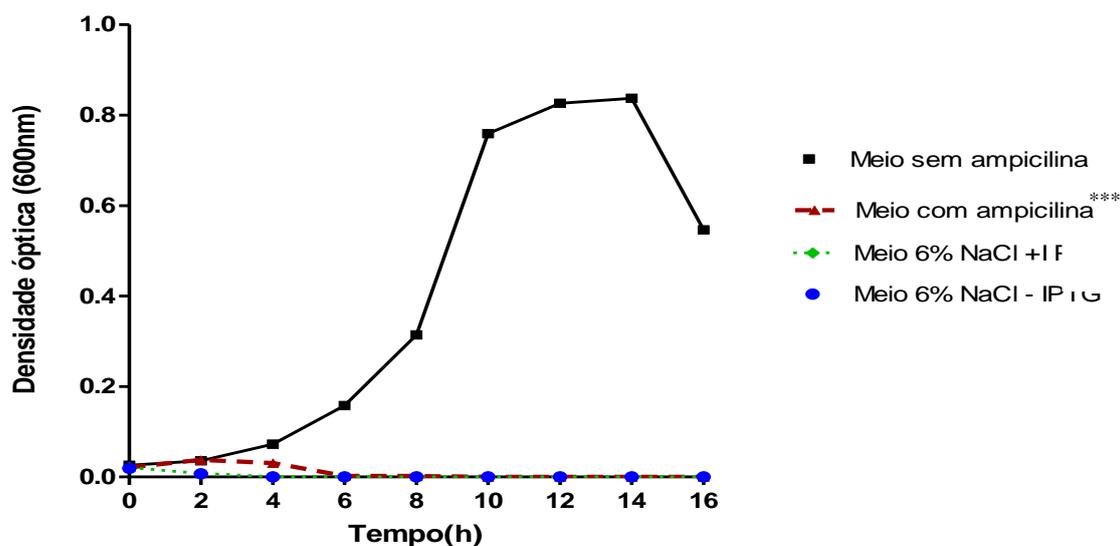
Avaliando agora o crescimento dos recombinantes contendo o gene do antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Anti 5) em diferentes concentrações de NaCl, observa-se que no cultivo do controle e nos cultivos contendo 5% de sal e IPTG, os mesmos cresceram em todas as diluições, mas não cresceram nas diluições de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> quando o IPTG estava ausente. Nas placas contendo 6% de NaCl, acrescido de IPTG, esse crescimento chegou até a diluição de 10.000 vezes, enquanto que nos cultivos sem o IPTG não houve crescimento, semelhante ao observado nas placas com 7% de sal.

### **5.9.2 Análise da funcionalidade em meio líquido de cultura**

Após a avaliação do crescimento dos recombinantes em meio sólido com diferentes concentrações de sal, acrescido de Ampicilina e na presença e na ausência de IPTG, foram realizados testes para analisar o crescimento desses recombinantes também em meio líquido.

O Gráfico 4 apresenta curvas de crescimento de *E. coli* não - transformada em diferentes condições de crescimento, objetivando avaliar como se comportaria na presença do sal e do IPTG. A bactéria foi cultivada em meio caldo nutriente, na ausência (controle positivo) e na presença (controle negativo) de Ampicilina. Paralelamente, a mesma foi colocada em meio contendo 6% de NaCl com (linha verde) e sem (bolas azuis) IPTG para avaliar se o indutor de alguma forma poderia afetar o seu crescimento.

**Gráfico 4** – Curvas de crescimento de DH5 $\alpha$  não-transformada em diferentes condições de cultivo



Legenda: \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo

O gráfico demonstra que *E. coli* não – transformada cresce muito bem no meio de cultura sem cloreto de sódio e sem Ampicilina, chegando a uma densidade ótica de 0,8. Por outro lado, no meio com Ampicilina, a bactéria consegue manter o crescimento por cerca de duas horas, mas a morte de suas células começa pela sensibilidade ao antibiótico presente no meio. Em seguida, observando a linha verde e os pontos azuis, pode-se perceber que a bactéria não conseguiu crescer quando cultivada em meio contendo 6% de cloreto de sódio, nem mesmo na presença do IPTG, demonstrando que ele, isoladamente, não afeta o crescimento em meio salino.

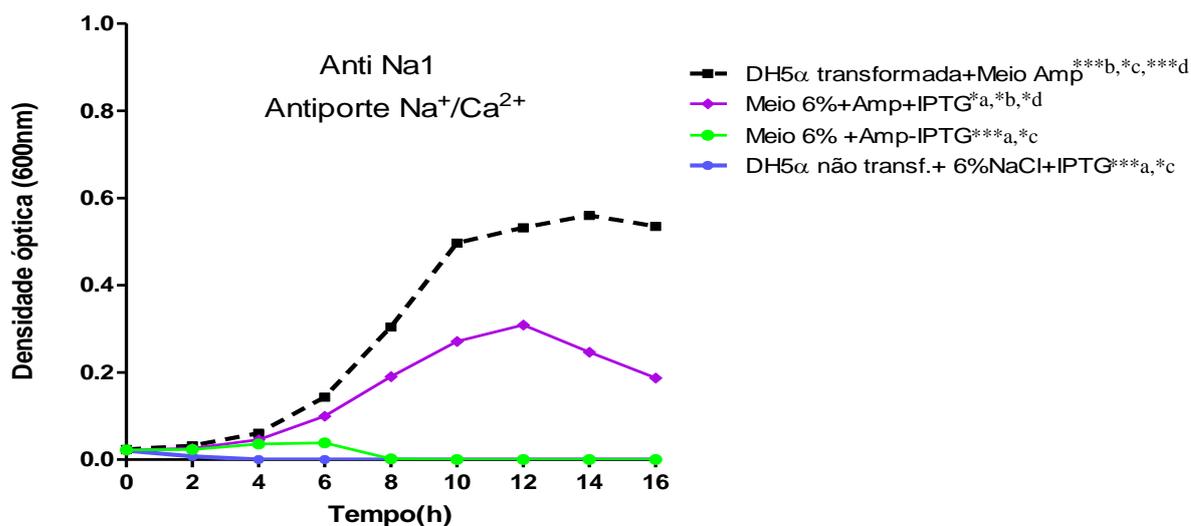
As análises estatísticas mostrando as médias dos valores apresentados no Gráfico 4, assim como os desvios padrão e o número de repetições, estão apresentadas na Tabela gerada pelo programa GraphPad Prism (Tabela 8). Como se pode observar, os valores de desvio padrão foram bastante pequenos.

**Tabela 8** - Análises estatísticas do crescimento da linhagem DH5 $\alpha$ 

Tempo (h)	Meio sem Ampicilina		Meio com Ampicilina		Meio 6% +IPTG		Meio 6%-IPTG	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0,00	0,026	5,773e-005	0,021	0,001	0,021	0,0006	0,019	0,0005
2,00	0,036	0,000	0,037	1,155e-004	0,008	0,0002	0,007	0,0002
4,00	0,073	1,528e-004	0,031	0,000	2,667e-004	3,3333e-005	1,000e-004	0,0001
6,00	0,158	1,453e-004	0,002	3,283e-004	0,000	0,000	0,000	0,000
8,00	0,314	2,646e-004	0,002	5,774e-0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
10,00	0,759	0,001	3,667e-004	3,333e-005	0,000	0,000	0,000	0,000
12,00	0,826	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14,00	0,837	3,334e-005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
16,00	0,546	1,155e-004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Fonte: GraphPad Prism.

As análises do crescimento das *E. coli* transformadas com o vetor pJET contendo o antiporte Anti Na<sup>1</sup> estão mostradas no Gráfico 5. Observando o controle positivo (linha preta) pode-se perceber que seu crescimento atingiu uma densidade ótica de 0,6, aproximadamente, o que mostra uma redução do crescimento na cultura quando comparada as células não-transformada cultivadas sob as mesmas condições (Gráfico 4). Esse resultado pode estar relacionado com a presença do plasmídio na bactéria, o qual interfere no crescimento bacteriano devido ao gasto energético para a sua replicação e transcrição (DAHLBERG & CHAO, 2003).

**Gráfico 5** – Curvas de crescimento dos recombinantes contendo o antiporte Anti Na<sup>1</sup>

Legenda: a significa ter diferença em relação ao controle positivo; b significa em relação ao controle negativo; c significa em relação ao cultivo feito em meio 6% NaCl+Ampicilina+IPTG; D significa em relação ao Meio 6% NaCl+Ampicilina-IPTG. \*p<0,05 e \*\*\* p<0,0001.

Observando o controle negativo (linha azul), percebe-se que as células não-transformadas quando cultivadas na presença de 6% de NaCl, suplementado com IPTG, não apresentaram crescimento, demonstrando que o IPTG não interfere no seu crescimento na presença de sal. Comparando os resultados obtidos com os cultivos de *E. coli* transformada em meio contendo sal, observa-se que a presença do IPTG foi imprescindível para que houvesse o seu crescimento. Entretanto, é possível notar que há uma redução da sua densidade ótica em relação ao controle positivo, uma vez que uma concentração de 6% de NaCl, mesmo com o plasmídeo, causa um estresse osmótico para a mesma.

Por outro lado, os recombinantes cultivados na presença de 6% de NaCl sem o ativador do gene, até as quatro horas após o inóculo ainda apresentavam um crescimento próximo da apresentado pelo controle, mas, logo em seguida, as células começaram a morrer e a densidade ótica reduziu.

As análises estatísticas dos dados apresentados no Gráfico 5 foram geradas pelo programa GraphPad Prism, na qual mostra as médias dos valores apresentados no gráfico, assim como o desvio padrão e o número de repetições (Tabela 9). Como se pode observar, os valores de desvio padrão foram bastante pequenos, semelhante ao observado para o Gráfico 4.

**Tabela 9** - Análises estatísticas do Antiporte Anti Na<sup>+</sup>

Tempo (h)	Meio sem Ampicilina		Meio com Ampicilina		Meio 6% +IPTG		Meio 6%-IPTG	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0,00	0,021	0,0006	0,023	0,0001	0,022	0,00006	0,022	5,773e-005
2,00	0,008	0,0002	0,032	0,0001	0,026	0,00015	0,023	8,819e-005
4,00	2,667e-004	3,3333e-005	0,060	0,0001	0,046	0,00015	0,036	0,000
6,00	0,000	0,000	0,143	0,0001	0,0100	0,00006	0,39	1,445e-004
8,00	0,000	0,000	0,304	0,0001	0,191	0,00449	0,002	5,774e-005
10,00	0,000	0,000	0,496	0,0004	0,271	0,00398	0,000	0,000
12,00	0,000	0,000	0,532	0,0006	0,309	0,00501	0,000	0,000
14,00	0,000	0,000	0,560	0,0001	0,246	0,00502	0,000	0,000
16,00	0,000	0,000	0,535	0,0001	0,188	0,00114	0,000	0,000

Fonte: GraphPad Prism

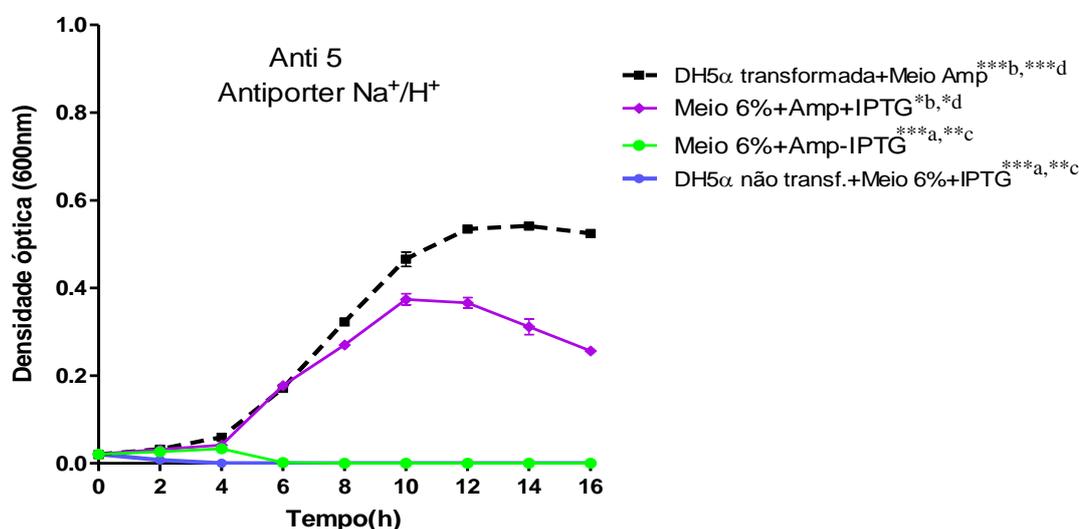
Os dados estatísticos apontam que existe uma diferença significativa entre o crescimento das bactérias com expressão heteróloga em relação ao controle positivo, ao controle negativo e as culturas crescidas em meio com 6% de NaCl sem expressão heteróloga ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, os dados estatísticos demonstram que as bactérias recombinantes com a expressão gênica reprimido apresentaram o mesmo comportamento observado no controle negativo, sendo estatisticamente semelhante ( $P \geq 0,05$ ).

O gene heterólogo expresso nestas bactérias foi de um antiporte de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, este que é uma proteína de membrana que utiliza o gradiente eletroquímico do sódio para remover um íon de cálcio pelo influxo de três íons de sódio. O transportador é encontrado em diferentes espécies de organismos, sendo considerando como um dos mais importantes mecanismos celulares para remoção de cálcio intracelular (DIPOLLO, 2006). Já foi reportado que a concentração elevada de sódio no citoplasma de uma célula leva à substituição do cálcio pelo sódio na membrana plasmática afetando a permeabilidade das mesmas (RENGEL, 1992).

O Gráfico 6 apresenta a curva de crescimento de *E. coli* transformada com o inserto do antiporte Anti 5, cultivada na presença de 6% de sal com ou sem o ativador do gene. Uma visão geral do gráfico abaixo mostra que o controle positivo (linha preta) e as bactérias contendo o inserto ativado (linha rosa), demonstram um comportamento

parecido, enquanto que o controle negativo (linha azul) e as bactérias com o gene do antiporte inativo (linha verde), praticamente não apresentaram crescimento.

**Gráfico 6** – Curvas de crescimento dos recombinantes contendo o antiporte Anti 5



Legenda: a significa ter diferença em relação ao controle positivo; b significa em relação ao controle negativo; c significa em relação ao cultivo feito em meio 6% NaCl+Ampicilina+IPTG; D significa em relação ao Meio 6% NaCl+Ampicilina-IPTG. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Analisando com mais detalhes o gráfico acima e os dados apresentados na Tabela 10, pode-se notar uma diferença no crescimento dos organismos do controle e das bactérias crescidas em 6% de sal com o gene ativo. Isso pode ser resultado da concentração de cloreto de sódio não ser a ótima para seu crescimento, assim como um maior gasto energético dessas bactérias devido a replicação e transcrição do plasmídeo.

Contudo, a diferença entre as duas curvas de crescimento em nenhum momento apresenta ser estatisticamente significativa ( $P \geq 0,05$ ). Dados semelhantes foram encontrados quando comparados os valores da curva do controle negativo e das bactérias sem indução da expressão gênica

**Tabela 10** - Análises estatísticas do Antiporte Anti 5

Tempo (h)	Meio sem Ampicilina		Meio com Ampicilina		Meio 6% +IPTG		Meio 6%-IPTG	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0,00	0,021	0,0006	0,023	0,0001	0,022	0,00006	0,022	5,773e-005
2,00	0,008	0,0002	0,032	0,0001	0,026	0,00015	0,023	8,819e-005
4,00	2,667e-004	3,3333e-005	0,060	0,0001	0,046	0,00015	0,036	0,000
6,00	0,000	0,000	0,143	0,0001	0,100	0,00006	0,039	1,445e-004
8,00	0,000	0,000	0,304	0,0001	0,191	0,0049	0,002	5,774e-005
10,00	0,000	0,000	0,496	0,0004	0,271	0,00398	0,000	0,000
12,00	0,000	0,000	0,532	0,0006	0,309	0,00501	0,000	0,000
14,00	0,000	0,000	0,560	0,0001	0,246	0,00502	0,000	0,000
16,00	0,000	0,000	0,535	0,0001	0,188	0,00114	0,000	0,000

Fonte: GraphPad Prism

Algo que pode ser observado com estes dados é que esse antiporte foi mais eficiente para o crescimento de *E. coli* quando comparada ao outro transportador, uma vez que não houve diferença estatística entre o crescimento das bactérias crescendo em 6% de sal, na presença do IPTG, em relação ao crescimento do controle positivo.

Ao término do experimento de funcionalidade dos genes inseridos em meio líquido, foi realizado protocolos de extração plasmidiana, os quais confirmaram a presença dos plasmídios e seus respectivos insertos.

O gene presente nesses transformantes codificava uma proteína pertencente a família protéica conhecida como Nha ( $Na^+/H^+$  Antiporter). Nesta família encontram-se os antiportes responsáveis por estabelecer o gradiente de sódio nas células, além de desempenharem um papel essencial na homeostase do pH intracelular (PADAN, 1993; PADAN, 1999). A atividade de tais antiportes já foi documentada em arqueias halófilas (LANYI, 1979), bactérias halófilas (HAMAIDE, 1983) e em eucariontes (KATZ, 1989; KATZ, 1992).

Esses antiportes podem ser agrupados em subfamílias de acordo com a estequiometria dos íons utilizada no transporte. Por exemplo, os membros pertencentes a família NhaA, apresentam a extrusão de um íon  $Na^+$  para um de  $H^+$  que é interiorizado; enquanto que na família NhaB, há o transporte de  $3H^+$  para  $2Na^+$ . Para os constituintes da família NhaC, a qual pertence o antiporte utilizado neste trabalho

sido sugerido uma estequiometria de  $2\text{H}^+$  interiorizado para cada  $\text{Na}^+$  exportado, como relatado para *Halobacterium salinarum* (LANYI, 1979; KRULWICH, 1983). Esses antiportes são relativamente poucos, com membros encontrados no domínio *Bacteria* e *Archaea* (WEI *et al.*, 2000)

O mecanismo desse antiporte é o efluxo de sódio, sendo este um dos principais mecanismos adaptativos em microrganismos halófilos e halotolerantes (OREN, 1999), uma vez que o excesso de sódio confere o estresse osmótico para qualquer organismo, seja ele um microrganismo ou mesmo uma planta (MUNNS, 2005).

Mecanismos de adaptação à salinidade observados em arqueias são bastante semelhantes aos relatados em plantas, nas quais também há a existência desses antiportes de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Desta forma, esses resultados contribuem para o entendimento de mecanismos de extrema importância para a adaptação à halofilia, assim como abre novas possibilidades para a construção de plantas geneticamente modificadas.

## 6 CONCLUSÕES

*Halococcus morrhuae* apresentou crescimento significativo no meio para halobactérias ;

Os resultados alcançados nas tentativas de caracterização de lipídios da membrana da halobactéria não foram suficientes para elucidação de estruturas químicas, mas os valores de tempo de retenção encontrados correspondem aos dos fosfolipídios conhecidos como Ácido Fosfatídico (PA) e Fosfatidilglicerol ( $\text{C}_{20}\text{-C}_{20}$ )(PG), e ao glicolipídio conhecido como Diglicosilarqueol (DGA-1).

Adicionalmente, os padrões de quebras dos ácidos graxos extraídos de *Halococcus morrhuae* apresentam uma similaridade significativa quando comparada com a dos ácidos graxos encontrados em organismos do domínio *Eucarya* e *Bacteria*, estando de acordo com a proposta evolutiva de Carl Woese (1990);

Utilizando primers de *Haloferax volcanii* conseguiu-se amplificar as ORF's dos contra-transportadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , os quais se mostraram funcionais após clonagem em *E. coli* DH5 $\alpha$  em meio sólido e em meio líquido. O antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apresentou uma atividade estatisticamente mais significativa quando comparada ao crescimento dos clones contendo o antiporte  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , tornando-o interessante para a construção de plantas geneticamente modificadas tolerantes a salinidade.

## 7 PERSPECTIVAS

O estudo apresentado nesta dissertação possui diversas perspectivas futuras. Dentre elas, pode-se destacar a necessidade de pesquisas adicionais sobre a genômica da halobactéria visando contribuir para um maior entendimento de sua fisiologia e bioquímica, como, por exemplo, o funcionamento e o seqüenciamento dos genes dos antiportes Anti  $\text{Na}^+$  e Anti 5. Outra perspectiva desse trabalho é a avaliação da funcionalidade desses genes nas plantas, objetivando a construção de plantas geneticamente modificadas capazes de crescerem em níveis tóxicos de sal. Adicionalmente, será realizada as análises em cromatógrafos gasoso de alta resolução para a caracterização estrutural dos ácidos graxos presentes nas frações isoladas de *H. morrhuae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISCOTT, T.M. Entropy and sustainability. **European Journal of. Soil Science**, v.46,p.161-168, 1992.
- ALLERS, T & MEVARECH, M. Archaeal genetics - the third way. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 58-73, 2005.
- ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.224-233, 1997.
- AMORIM, J. R. A. D. Salinidade em áreas irrigadas: origem do problema, consequências e possíveis soluções. **Agrosoft**, Brasil, 2009.
- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v.13, p.146-150, 2002.
- APSE, M. P., AARÓN, G.S., SNEDDEN, W.S., AND BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in *Arabidopsis*. **Science**, v.285, p. 1256-1258, 1999.
- ARMANDA, S.P.; FARTO, R.; PEREZ, M.J. NIETO, T.P. Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. **Microbiology**, v.149, p.369-375, 2003.
- ASAKURA, H.; MAKINO, S.; TAKAGI, T.; KURI, A.; KURAZONO, T.; WATARI, M.; SHIRAHATA, T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enteric* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. **FEMS Microbiology Letters**, v.212, p.87-93, 2002.
- ASAKURA, H.; IGIMI, S. KAWAMOTO, K.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Role of *in vivo* passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stress. **FEMS Microbiology Letters**, v.253, n.2, p.243-249, 2005.
- ASHRAF, M. Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. **Biologia Plantarum**, Praga, v.36, p.255-259, 1994.
- BARNS, S.M. *et al.* perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.93, p.9188-9193, 1996.
- BASINGER, W. & OLIVEJR. D. Inhibition of *Halobacterium cutirubrum* lipid biosynthesis by bacitracin. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p.423- 427, 1979.
- BERTALANFFY, L. Von. *Untersuchungen über die Gesetzlichkeit des Wachstums*. I. Allgemeine Grundlagen der Theorie; mathematische und physiologische

Gesetzlichkeiten des Wachstums bei Wassertieren. **Arch. Entwicklungsmech**, v. 131, p. 613-652, 1934.

BERTALANFFY, L. Von. **Teoria geral dos sistemas**. Trad. de Francisco M. Guimarães. Petrópolis: Vozes, p.351, 1973.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; DECLERQ, E.; JUGIAU, F.; CAPPELIER, J. Environmental and physico-chemical factors induced VBNC state in *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Research**, v.33, p.359-370, 2002.

BOHACEK, J.; KOCUR, M. MARTINEC, T. Deoxyribonucleic acid base composition of some marine and halophilic micrococci. **Journal Applied bacteriology**, v.31, p.215-219, 1968.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, Rockville, v.7, n.6, p.1099-1111, 1995.

BOSCO, M. R. D. O.; OLIVEIRA, A. B. D.; HERNANDEZ, F. F. F. E LACERDA, C. F. D. Influência do estresse salino na composição mineral da berinjela. **Revista Ciência Agrônômica**, v.40, n.2, p.157-164, 2009.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. JONES, R.L. (eds). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville. **American Society of Plant Physiologists**, 2000. cap.22, p.1158-1203.

BROCHIER-ARMANET, C. *et al.* Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. **Nature Reviews: Microbiology**, v.6, p.245-262, 2008.

BROCHIER, C.; FORTERRE, P. GRIBALDO, S. An emerging phylogenetic core of Archaea: phylogenies of transcription and translation machineries converge following addition of new genome sequences. **BMC Evolutionary Biology**, v.5, p.36-43, 2005.

BROWN, J. R., AND W. F. DOOLITTLE. Archaea and the prokaryote to eukaryotes transition. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p.456-502, 1997.

CAPRA, F. **A teia da Vida: uma nova compreensão científica dos sistemas vivos**. São Paulo: Cultrix, 1996. 256p.

CHEVILLE, A.M. ARNOLD, K.W.; BUCHRIESER, C.; CHENG, C.M.; KASPAR, C.W. *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1822-1824, 1996.

CONSKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, v.53, p.121-147, 1989.

DAHLBERG, C.; CHAO, L. Amelioration of the Cost of Conjugative Plasmid Carriage in *Escherichia coli* K12. **Genetics**, v.165, p.1641-1649, 2003.

DAMSTÉ, J.S.; SCHOUTEN, S.; HOPMANS, E.C.; VAN DUIN, A.C.; GEENEVASEN, J.A. "Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota". **Journal Lipid Research**. v. 43,n.10, 2002.

DasSARMA,S. FLEISCHMANN,E.M. Archaea: a laboratory manual.Halophiles. **Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, 1995.

DasSARMA,S.; ARORA,P. in: S. Pidgeon (Eds.), Encyclopedia of Life Sciences, **Nature Publishing Group**, 2001, p. 1.

De BLOCK, M.; HERRERA-ESTRELLA,L.; MONTAGU, M.V., SCHELL,J.AND ZAMBRYSKI, P. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny, **EMBO Journal**, v. 3, n.8, p.1681–1689,1984.

DeLONG, E. F.; PACE, N. A. Enviromental diversity of bacteria and archaea. **BMC Systems. Biology**, v. 50, n 4, p. 470-478, 2001.

DIPOLO, R; BEAUGÉ, L. "Sodium/calcium exchanger: Influence of metabolic regulation on ion carrier interactions". **Physiological Reviews**, v. 86, n.1, 2006.

DITTMER, L. C.; LESTER, R. L. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. **Journal Lipid Research.**, v. 15, p. 126-127, 1964.

DUNDASI, C.The normal *Halobacteriaceae*: the general physiology and taxonomy of a well adapted and highly successful group of microorganisms. In **Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms**, pp. 641-651. Edited by S. R. Caplan & M. Ginzburg. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biochemical Press, 1978.

EBERT, K., GOEBEL, W. & PFEIFER, F. Homologies among heterogeneous extrachromosomal DNA populations in *Halobacterium halobium* and four new halobacterial isolates. **Molecular and General Genetics** 194, 91-97, 1984.

EMBRAPA. **Sistemas de produção**, Embrapa Semiárido, 2010. Disponível em <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/manejo\\_do\\_solo.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melao/SistemaProducaoMelao/manejo_do_solo.html)> Acesso em: 13 de julho de 2011.

FAGERIA, N. K. E GHEYI, H. R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: Gheyi, H. R., Queiroz, J. E., *et al* (Ed.). Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada. Campina Grande: UFPB-SBEA, 1997. **Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares.**, p.363-383

FAHY, E. SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H. A.; GLASS, C. K.; MERRILL JR, A. H.;MURPHY, R. C.; RAETZ, C. R. H.; RUSSELL, SEYAMA, D. W.; Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, ,T.; SPENER F.; van MEER G.; VanNIEUWENHZE, M. S.; WHITE, S. H.; WITZTUM, J. L.;DENNIS, E. A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal Lipid Research.**, v. 46, p. 839- 861, 2005.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations. **Guidelines for the control of soil degradation**. Rome, 38 p, 1983.

FAO. Food and agriculture organization of the united nations .**Water in agriculture: opportunity untapped**. **Rome:** Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.

FAO. Food and agriculturre organization of the united nations  
[http://www.fao.org/corp/google\\_result/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=land+salinization&x=0&y=0&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2F#982](http://www.fao.org/corp/google_result/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=land+salinization&x=0&y=0&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2F#982)  
 Acessado em 15/03/10.

FORTERRE, P. CELINE BROCHIER C.; PHILIPPE, H. Evolution of the Archaea, **Theoretical Population Biology**, v.61, p. 409- 422, 2002.

GAXIOLA, R.; LI, J.; UNDURRAGA, S., DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S.; FINK, G. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H+ pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington**, v.98, p.11444-11449, 2001.

GHEYI, H.R. Problemas de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T.S.; ASSIS JÚNIOR., R.N.; ROMERO, R.E.; SILVA, J.R.C. (Eds.). **Agricultura, sustentabilidade e o semiárido**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.329-46, 2000.

GIBSON, J. A. E.; MILLER, M. R.; DAVIES, N. W.; NEILL, G. P.; NICHOLS, D. S.; VOLKMAN, J. K. Unsaturated diether lipids in the psychrotrophic archaeon *Halorubrum lacusprofundi*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p.19-26, 2005.

GOODMAN & GILMAN, **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 a. Ed. Mc Graw Hill, Rio de Janeiro, 2003.

GOULD, G.W. Drying, raised osmotic pressure and low water activity. *In* **Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures**. Gould, G.W. (ed). Elsevier Science Publishers Ltd., p.97-117, 1989.

GRANT, W.D.; LARSEN, L. in: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 3, Williams and Wilkins, Baltimore, 1989, p. 2216.

GRIBALDO, S.; BROCHIER, C. Phylogeny of prokaryotes: does it exist and why should we care? **Research in Microbiology**, v.160, p.513-521, 2009.

GRIFFITTS, J. S.; HASLAM, S. M., YANG, T.; GARCZYNSKI, S. F.; MULLOY, B.; MORRIS, H.; CREMER P. S.; DELL, A.; ADANG, M. J.; AROIAN, R. V. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, v. 307. p. 922-925, 2005.

GUPTA,R.S. What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. **Molecular microbiology**, v.29, p.695-707, 1998.

GUTIERREZM, C., GARCIA, M. T., VENTOSA, A.NIETO, J. J. & RUIZ BERRAQUERFO. Occurrence of megaplasmids in halobacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61,p. 67-71, 1986.

HAKOMORI, S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulator for transmembrans signalling and mediators for cellular interactions. **Journal of Biological Chemmistry**, v. 265, p. 18713 18716, 1990.

HAMAIDE, F., D. J. KUSHNER, AND G. D. SPROTT.Proton motive force and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in a moderate halophile. **Journal Bacteriology**, v. 156, p.537–544, 1983.

HAMMES, W. P.; WINTER, J, . & KANDLER, O. The sensitivity of the pseudomurein-containing genus *Methanobacteriirm* to inhibitors of murein synthesis. **Archives of Microbiology**, v. 123, p. 275-279, 1979.

HANFORD, M.J., PEEPLES, T.L. "Archaeal tetraether lipids: unique structures and applications". **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.97,n.1, p. 45–62, 2002.

HOLMBERG,N. an BULOW,L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer.**Trends Plant Science**. v.3, p. 61-66, 1998.

HUAZHONG SHI AND JIAN-KANG ZHU. Regulation of expression of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 3, p. 543-550, 2002.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Tibtech**, v. 14, p. 190- 197,1996.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal Bacteriology**, v. 180, n 18, p. 4765-4774, 1998.

HUGER,H. *et al.* A new phylum of Arcaeha represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**,v.417,p.63-67,2002.

HUNTER, M. I. S. & MILLAR, S. J. W. Effect of Wall Antibiotics on the Growth of the Extremely Halophilic Coccus, *Sarcina marina* NCMB 778. **Journal of General Microbiology**, v.120, p.255-258, 1980.

HURKMAN, W.J. Effect of salt stress on plant gene expression: a review. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.146, n.12, p.145-151, 1992.

IYENGAR, E. R. R.; REDDY, M. P. Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In:PESSERKALI, M. (Ed.). **Handbook of Photosynthesis**. Marshal Dekar, Baten Rose. p.897-909, 1996.

- JAIN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAIN, R.K.; CHOWDHURY, J.B. Salt tolerance in *Brassica juncea* L> II: salt-stress induced changes in polypeptide pattern of *in vitro* selected NaCl tolerance plants. **Euphytica**, Wageningen, v.65, n.2, p.107- 112, 1993.
- KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 548-556, 2001.
- KATZ, A., U. PICK, AND M. AVRON. Characterization and reconstitution of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from the plasma membrane of the halophilic alga *Dunaliella*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.983, p.1–14,1989.
- KATZ, A., U. PICK, AND M. AVRON. Modulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. **Plant Physiology**. 100:1224–1229,1992.
- KNOCHEL,S.;GOULD,G. Preservation microbiology and safety: Quo vadis? **Trends Foods Science & Technology**.,v.6,p.127-131,1995.
- KOCHETKOV, N. K.; SMIRNOVA, G. P. Glycolipids of marine invertebrates. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**., v. 44, p. 387-438, 1986.
- KOCUR, M.; BOHACEK,J. DNA base composition of extremely halophilic cocci. **Archives Microbiology**,v.82,p.280-282, 1972.
- KOCUR, M.,& W. HODGKISS.Taxonomic status of the genus *Halococcus* Schoop. **International Journal Systematic. Bacterial**, v.23,p. 151-156, 1973.
- KREBS, M.P. & KHORANA,H.G. Mechanism of light-dependent próton translocation by bacteriorhodopsin. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.1555-1560, 1993.
- KRIEG, N. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. US: Springer. pp. 216, 2005.
- KRULWICH, T. A. AND GUFFANTI, A. A. Physiology of Acidophilic and Alkalophilic Bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v.24, p.173-21,1983.
- KUSHNER, D. J. **The Halobacteriaceae**, p. 171-214. In C. R. Woese and R. S. Wolfe, The bacteria, vol. VIII. Academic Press, Inc., New York, 1985.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; RUIZ, H. A. Osmotic adjustment in roots and leaves of two sorghum genotypes under NaCl stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 113-118, 2003.
- LAJOLO, F.M.; NUTTI, M.R. **Transgênicos: bases científicas da sua segurança**. São Paulo: SBAN, 2003, 112p.
- LAL, R. Soil degradation in relation to climate. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Climate and food security**. Los Baños, p. 257- 276,1989.

LANGE, A.; MARTINES, A. M.; SILVA, M. A. C. D.; SORREANO, M. C. M.; CABRAL, C. P. E MALAVOLTA, E. Efeito de deficiência de micronutrientes no estado nutricional da mamoneira cultivar Iris. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.1, p.61-67,2005.

LANYI, J.K. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. **Bacteriology Reviews**.38:272-290,1974.

LANYI, J. K., AND M. P. SILVERMAN. Gating effects in *Halobacterium halobium* membrane transport. **Journal of Biological Chemistry**. 254:4750-4755, 1979.

LANYI, J. K., AND R. E. McDONALD. Existence of electrogenic hydrogen/ sodium antiport in *Halobacterium* cell envelope vesicles. **Biochemistry**, v.15,p.4608-4614, 1976.

LANYI, J.K. Pathways of proton transfer in the light-driven pump bacteriorhodopsin. **Experientia**, v.49, p.514-517, 1993.

LANYI, J.K. "Bacteriorhodopsin". **Annual Review of Physiology**, v.66,p. 665-88, 2004.

LIANG, Y.C., SHEN, Q.R., SHEN, Z.G., MA, T.S. Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. **Journal of Plant Nutrition**. 19, 173-183, 1996.

LOBASSO, S. LOPALCO, P.; MASCOLO, G.; CORCELLI, A. Lipids of ultra-thin square halophilic archaeon *haloquadratum walsbyi*. **Archaea**, v.2,p. 177-183, 2007.

MABBUTT, J. A. The impact of desertification as revealed by mapping. **Environmental Conservation**, Lausanne, v. 5, n. 1, p. 45-56, 1978.

MACALADY, J. L.; VESTLING, M. M.; BAUMLER, D.; BOEKELHEIDE, N.; KASPAR, C. W.; BANFIELD, J. F. Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. **Extremophiles**, v. 8, p. 411-419, 2004.

MADON, J. LESER, U.; ZILLIG, W. DNA-dependent RNA polymerase from the extremely halophilic archaeobacterium *Halococcus morrhuae*. **European Journal Biochemistry**, v.135, p.279-283, 1983.

MANCUSO, C. A.; ODHAM, G.; WESTERDAHL, G.; REEVE, J. N.; WHITE, D. C. C15, C20, and C25 isoprenoid homologues in glycerol diether phospholipids of methanogenic archaeobacteria. **Journal Lipid Research**., v. 26, p. 1120-1125, 1985.

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v.52, n.2, p.113-122, 2004.

MARGESIN, R., AND SCHINNER, F. **Extremophiles**, v.5, p.73-83, 2001.

MATSUBARA, T.; TANAKA, N. I.; KAMEKURA, M.; MOLDOVEANU, N.; ISHIZUKA, I.; ONISHI, H.; HAYASHI, A.; KATES, M. Polar lipids of a non-

- alkaliphilic extremely halophilic archaeobacterium strain 172: a novel bis-sulfated glycolipid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1214, p. 97-108, 1994.
- MATTICK, K.L.; JORGENSEN, F.; LEGAN, J.D.; COLE, M.B.; POSTER, J.; LAPPINSCO T.T, H.M.; HUMPHREY, T.J. Survival and filamentation of *Salmonella enteriva* serover Enteritidis PT4 and *Salmonella enteric* serover Typhimurium DT104 at low water activity. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.66, p.1274-1279, 2000.
- McKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishes, 1994. 256p.
- MESCHERM, .F . & STROMINOEJR. ,L . Bacitracin induces sphere formation in Halobat terium species which lack a wall peptidoglycan. **Journal of General Microbiology**, v.9, p. 375-378, 1975.
- MOLDOVEANU, N.; KATES, M.; MONTERO, C.G. & VENTOSA, A. Polar lipids of non-alkaliphilic *Halococci*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.18; n.2, p.127-35, 1990.
- MONIZ, A.C. **Elementos de Pedologia**. São Paulo, Polígono, Ed. Univ. São Paulo, 459p, 1972.
- MONTERO, C. G .; VENTOSA, A.; JOAQUIN J . NIETO, J.J.; RUIZ BERRAQUERO, F. Isolation and Partial Characterization of a Plasmid in the Extremely Halophilic Archaeobacterium *Halococcus morrhuae* CCM 537. **Journal of General Microbiology** , v.134, p.2959-2963, 1988.
- MORRIS, K. **Glycolipids, phosphoglycolipids and sulfoglycolipids**. Handbook of Lipid Research. 6ed. Plenum press. 1990.
- MORRIS, K. *et al.* **The Biochemistry of Archaea**. Elsevier, 1993
- MUNNIK, T.; IRVINE, R. F.; MUSGRAVE, A. Phospholipid signalling in plants. **Biochemical et Biophysical. Acta**., v. 1389, p. 222-272, 1998
- MUNNIK, T. Phosphatidic acid: and emerging plant lipid second messenger. **Trends Plant Science**., v. 6, p. 227-233, 2001.
- MUNNS, R. PASSIOURA, J.B. Effects of prolonged exposure to NaCl on the osmotic pressure of leaf xylem sap from intact, transpiring barley plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.11, p.497-507, 1984.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**., v. 167, p. 645-663, 2005.
- NAMWONG, S.; TANASUPAWAT, S.; VISESSANGUAN, W.; KUDO, T. & ITOH, T. *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2199-2203, 2007.
- NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G. D.; OLIVEIRA, E. V. D. E NEVES, V. B. F. Crescimento, nutrição mineral e nível crítico foliar de p em mudas de umbuzeiro, em

função da adubação fosfatada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.801-805, 2008.

NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology, Lancaster**, v.109, n.2, p.735-742, 1995.

NOCTOR, G. E FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.249-279, 1998.

OERTLI, J.J. Extracellular salt accumulation, a possible mechanism of salt injury in plants. **Agrochimica**, v. 12, p.461-469, 1968.

OESTERHELT, D. & TITOR, J. Two pumps, one principle: light-driven ion transport in Halobacteria. **Trends Biochemical Sciences**, v.14, p. 57-61, 1989.

OHTOMO, R.; SAITO, M. Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: possible implication for resuscitation from the VBNC state. **Microbial Ecology**, v.42, p.208-214, 2001.

OLDERMAN, L.R. the global extent of soil degradation. In: Greenland, D.J.: Szabolcs, I. (eds.) **Soil resilience and sustainable land use**. Wallingford: CAB International, 1994. p.99-118.

OLIVEIRA, M. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais. In: Gheyi, H.R., Queiroz, J.E., *et al* (Ed.). **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB-SBEA, 1997. Gênese, classificação e extensão de solos afetados por sais.

OREN, A. Sensitivity of selected members of the family *Halobacteriaceae* to quinolone antimicrobial compounds. **Archives Microbiology**, v.165, p.354-358, 1996.

OREN, A. Bioenergetic Aspects of Halophilism. **Microbiology and molecular biology reviews**. 1999, p. 334-348.

OREN, A. **Halophilic microorganisms and their environments**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 2002, p.211.

OW, D.W., WOOD, K.V.; DeLUCA, M.; deWET, J.R.; HELINSKI, D.R. ;HOWELL, S.H. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. **Science**, v. 234, p. 856-859, 1986.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PADAN, E., AND S. SCHULDINER. Na<sup>+</sup> transport systems in prokaryotes, p. 3-24. In E. P. Bakker (ed.), **Alkali transport systems in prokaryotes**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1993.

PADAN, E. The molecular mechanism of regulation of the NhaA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Escherichia coli*, a paradigm for an adaptation to Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>, p. 163–175. In A. Oren (ed.), **Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1999.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, n. 3, p. 324-349, 2005.

PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I.; HORNICK, S. B.; MEYER, R. E. Soil quality: attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. **American Journal of Alternate Agriculture**, Greenbelt, v. 7, n. 1/2, p. 5-11, 1992.

PATONE, B.; KHODKOVEA, M.; GURIEVAN, M. & SVERDLOVE, D. (1981). Plasmid from various strains of *Halobacterium halobium*. **Bioorganiches**, v.7 , p.1532-1537, 1981.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., & KRIS, G.S. **Introduction of Spectroscopy**, 3<sup>a</sup> Ed., Thomson Learning Inc., 2001.

PFEIFER, F.; WEIDINGER, G. & GOEBEL, W. Characterization of plasmids in halobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.145, p.369-374, 1981.

POSAS, F.; CHAMBERS, J. R.; HEYMAN, J. A.; HOEFFLEN, J. P.; de NADAL, E.; ARINO, J. The transcriptional response of yeast to saline stress. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 17249-17255, 2000.

PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do etresse salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 85-94, 1987.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANONNI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 369-394, 2003.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V. E VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in high plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

RENGEL, Z. The role of calcium in salt toxicity. **Plant Cell Environment**, v. 15, p.625-632, 1992.

RICH, A., NORDHEIM, A. WANG, A. H. J. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. **Annual Review of Biochemistry**, v.53, p.791-846, 1984.

RICHTER, C. E SCHWEIZER, M. Oxidative stress in mitochondria. In: Scandalios, J. G. (Ed.). **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Oxidative stress in mitochondria, p.169-200

RHOADES, J.P.; KANDIAH, A.; MASHALI, A.M. **The use saline waters for crop production**. Roma: FAO, 1992. 133 p. (Irrigation and Drainage Paper, 48).

ROBINSON, J.L.; PYZYNA, B.; ATRASZ, R.G.; HENDERSON, C.A.; MORRILL, K.L.; BURD, A.M.; DESOUCY, E.; FOGLEMAN III, R.E.; NAYLOR, J.B.; STEELE, S.M.; ELLIOTT, D.R.; LEYVA, K.J. AND SHAND, F.S. Growth kinetics of extremely halophilic *Archaea* (Family *Halobacteriaceae*) as revealed by Arrhenius plots. **Journal of Bacteriology**, 187:923-929, 2004.

RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E. E BORRÁS-HIDALGO, O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. **Biocología Aplicada**, v.29, p.1-10, 2005.

ROSS, H.N.M.; COLLINS, M.D. ; TINDALL, B.J.; GRANT, W.D. A rapid procedure for the detection of archaeobacterial lipids in halophilic bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.123, p.75-80, 1981.

ROSS, H. N. M. & GRANT, W. D. Nucleic acid studies on halophilic archaeobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 165-173, 1985.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001

SAIRAM, R.K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v.86, p.407-421, 2004.

SANTOS, R.V. E TERTULIANO, S. S. X..CRESCIMENTO DE ESPÉCIES ARBÓREAS EM SOLOSALINO-SÓDICO TRATADO COM ÁCIDO SULFÚRICO. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.2, p.239-242, 1998.

SECKBACH, J. **Enigmatic microorganisms and life in extreme environments**. Springer, 1999.

SIOUD, M.; POSSOT, O.; ELIE, C.; SIBOLD, L.; FORTERRE, P. Coumarin and quinolone action in archaeobacteria: evidence for the presence of a DNA gyrase-like enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p.946-953, 1988.

SHALATA, A.; MITTOVA, V.; VOLOKITA, M.; GUY, M.; TAL, M. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.112, n.3, p.487-494, 2001.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; ZHU, J.K. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p. 465-477, 2002.

SKARSTAD, K.; STEEN, H.B.; BOYE, E. "Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry". **Journal of Bacteriology**, v.154, n.2, p. 656-662, 1983.

SOCO: Agricultura sustentável e conservação dos solos. **Salinização e sodificação**, 2009.

SOHAN, D.; JASONI, R.; ZAJICEK, J. Plant–water relations of NaCl and calcium treated sunflower plants. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v.42, n.1, p.105-111, 1999.

Soil Science Society of America . **The Science of Soil** . Disponível em <<https://www.soils.org/about-soils/>>. Acesso em 27 de julho de 2011.

SOUZA, L.M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. Tese de doutorado.Curitiba.2008.

SPUDICH,J.L. **Journal of Bacteriology**, 175, n. 24, p.7755-7761, 1993.

STEBER, J.& SCHLEIFER,K.H. *Halococcus morrhuae*: a sulfated heteropolysaccharide as the structural component of the bacterial cell wall. **Archives of Microbiology**, v.105,p.173-177, 1975.

STIEHL, T.; RULLKÖTTER J.; NISSENBAUM, A. Molecular and isotopic characterization of lipids in cultured halophilic microorganisms from the Dead Sea and comparison with the sediment record of this hypersaline lake. **Organization in Geochemistry**., v. 36, p. 1242–1251, 2005.

SZABOLCS,I.Review of research on salt-affected soil. **Nature Resource Res.**,v.15, p.137, 1979.

SZABOLCS,I.**Salt-affected soil as world problem**.In 1 st Symposium on reclamation of salt-affected soil, China, v.1985:p.30-47, 1985.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 2004. 719p.

TENCHOV, B.; VESCIO,E.M.;SPROTT,G.D.; ZEIDEL,M.L.; MATHAI.J.C. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. **The journal of biological chemistry**,v. 281, n. 15, p. 10016–10023, 2006.

TINDALLB, . J., ROSS, H. N. M. & GRANT, W. D. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaebacteria. **Systematic and Applied Microbiology** 5, 41-57., 1984.

TORSVIK, V.; VREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion In Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TU, Z.;HE, G.; LI, K. X.; CHEN, M. J.; CHEN, L.; YAO, Q.; LIU, D.P.; YE, H.; SHI, J.; WU, X.An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, 2005.

TUNÇTURK, M.; TUNÇTURK, R. E YASAR, F. 2008. Changes in micronutrients, dry weight and plant growth of soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars under salt stress. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.11, p.1650-1654

VALENTINE, D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the *Archaea*. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.316-323, 2007.

van de VOSSENBERG, J. L., DRIESSEN, A. J., GRANT, W. D., AND KONINGS, W. N. **Extremophiles**, v.3, p.253–257, 1999.

VENTOSA, A., QUESASADA, E., RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZBERRAQUERO, F. & RAMOS-CORMANZANA, A. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. **Journal of general Microbiology**. 128: 1959-1968, 1988.

VENTOSA, A., NIETO, J. J. & OREN, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiological and. Molecular Biology Reviews.**, v.62, n.2, p.504-544, 1998.

VIEIRA, D.S., 2003. **Avaliação da biodegradação anaeróbia no tratamento de água de produção**, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro – RJ (Dissertação de Mestrado).

VINOCUR, B. E. ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, n.2, p.123-132, 2005.

VREELAND, R. H. Mechanisms of halotolerance in microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v.14, p.311–356, 1987.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S. E CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v.24, n.14, p.2369-2375, 2003.

WEI Y., GUFFANTI A.A., ITO M. AND KRULWICH T.A. *Bacillus subtilis* YqkI is a novel malic /Na -lactate antiporter that enhances growth on malate at low protonmotive force. **Journal of Biological Chemistry.**, v.275, p. 30287–30292, 2000.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBES, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of. Sciences**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v.163, p. 150-160, 1969.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. **Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas**. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds). Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife. MXM Gráfica e Editora. 2005, p. 118-126.

WILLADINO, L. CAMARA, T.R. **Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos**. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, n.11, 2010, p.12.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U. S. A. v.74, p. 5088–5090, 1977.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbial Reviews**., v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria e Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WONG, H. WANG, P. CHEN, S. CHIU, S. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. **FEMS Microbiology Letters**, v.233, p.269-275, 2004.

XU, X.W.; LIU, S.L.; TOHTY, D.; OREN, A. WU, M. AND ZHOU, P.J. *Haloterrigena saccharevitans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Xin-Jiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2539–2542, 2005.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends in Plant Science**, Killington, v.10, n.12, p.615-620, 2005.

YEO, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.49, n.9, p.915-929, 1998.

ZHANG, H.X. and BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. **Nature Biotechnology**, v.19, p.765-768, 2001.

ZHU, J.K. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, n.3, p.941- 957, 2000.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Oxford, v.53, n.1, p.247-273, 2001.

ZIDAN, I.; AZAIZEH, H.; NEWMANN, P. M. Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification? **Plant Physiology**, Lancaster, v.93, n.1, p.7-11, 1990.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. "Modeling of the Bacterial Growth Curve". **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p. 1875–1881, 1990.

## ANEXO

- Artigo submetido para publicação -

----- Mensagem encaminhada -----

**De:** Editorial Office <amboffice@gmx.de>

**Para:** Savio Torres Farias <stfarias@yahoo.com.br>

**Enviadas:** Segunda-feira, 12 de Setembro de 2011 15:27

**Assunto:** AMAB: Submission Confirmation for Heterologous genes expression from Halococcus morrhuae in Escherichia coli improves salt tolerance

Dear Dr Farias,

Your submission entitled "Heterologous genes expression from Halococcus morrhuae in Escherichia coli improves salt tolerance" has been received by Applied Microbiology and Biotechnology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://amab.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office

Applied Microbiology and Biotechnology