



## REVISÃO

### A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico

Gigliola Rhayd Boechat Salloto<sup>1</sup>, Leonardo Henriques Pinto<sup>2\*</sup>, Joyce Lemos Lima<sup>2</sup>, Ricardo Pilz Vieira<sup>2</sup>, Alexander Machado Cardoso<sup>2</sup>, Orlando Bonifácio Martins<sup>2</sup> e Maysa Mandetta Clementino<sup>1</sup>

Recebido: 08 de junho de 2011    Recebido após revisão: 20 de março de 2012    Aceito: 02 de abril de 2012  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1929>

**RESUMO:** (A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico). Ambientes hipersalinos encontram-se distribuídos por todas as partes do mundo, onde podem ser observados organismos representantes dos domínios Archaea, Bacteria e Eukarya. Nesta revisão, são abordados os principais tópicos referentes, a taxonomia, filogenia e biotecnologia de arqueias halofílicas, como, por exemplo: a produção de biopolímeros ou enzimas e biodegradação de compostos tóxicos. O grupo de pesquisa vem trabalhando para descrever novas linhagens de arqueias halofílicas assim como determinar a comunidade desses micro-organismos em estudos de metagenômica das lagoas de Araruama, um dos maiores complexos naturais hipersalino do mundo, localizado no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

**Palavras-chave:** hipersalino, Archaea, biotecnologia.

**ABSTRACT:** (The halophilic archaeal biology and its biotechnology potential). Hypersaline environments are distributed worldwide and the microorganisms able to grow in these environments are found in all three domains of life: Archaea, Bacteria, and Eukarya. In this review, we addressed the major topics concerning the taxonomic, phylogenetic and biotechnological applications of halophilic Archaea, for example, the production of biopolymers, enzymes and the biodegradation of toxic compounds. Our research group has been working to describe new halophilic archaeal lineages and to determine the halophilic communities by metagenomic approach from one of largest hypersaline lagoon in the world, localized in Araruama, Rio de Janeiro State, Brazil.

**Key words:** hypersaline, Archaea, biotechnology.

#### OS MICRO-ORGANISMOS E OS AMBIENTES EXTREMOS

Os micro-organismos estão em praticamente todos os ambientes da biosfera e realizam papéis fundamentais nos ciclos biogeoquímicos (Gribaldo & Brochier-Armanet 2006). Comunidades microbianas representam mais da metade da biomassa global e estão não somente bem adaptadas em ambientes amenos, mas também em ambientes extremos tais como: profundidades abissais dos oceanos, fontes hidrotermais, ambientes hiper-salgados, geleiras entre outros. Os organismos encontrados nesses ambientes extremos são denominados extremofílicos e encontram-se distribuídos nos três domínios que compõem a atual árvore da vida: Archaea, Bacteria e Eukarya (Woese 1995). A adaptação dos organismos extremofílicos a esses ambientes obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas que podem ser empregados em condições drásticas, frequentemente presentes nos processos industriais e biotecnológicos (Champdoré *et al.* 2007).

Alguns modelos filogenéticos de evolução indicam que os primeiros organismos extremofílicos foram os hipertermofílicos, com crescimento ótimo em temperaturas acima de 75 °C, podendo atingir a 121 °C e to-

lerando temperaturas de até 130 °C (Kashefi & Lovley 2003). Evidências geológicas e geoquímicas sugerem que a Terra se manteve quente por vários milhões de anos, devido à frequentes impactos de meteoritos, que foram capazes de aquecer os oceanos e a atmosfera em até 100 °C (Kashefi & Lovley 2003). Assim, os micro-organismos hipertermofílicos poderiam ter sido os primeiros organismos vivos na terra primitiva (Rossi *et al.* 2003). Além desses organismos, outros exemplos aparecem descritos na literatura sobre extremofílicos: os psicrófilos possuem crescimento ótimo em temperaturas abaixo de 20 °C; os barófilos que apresentam um crescimento ótimo em pressão maior que uma atmosfera; os acidófilos e os alcalofílicos que têm crescimento ótimo em ambientes de pH menor que 3 e maior que 10 respectivamente; os halofílicos, necessitam de concentrações de sais acima de 2 M de NaCl para seu crescimento; e os metanogênicos, produtores do gás metano que vivem em ambientes anóxicos tais como: pântanos, estações de esgoto, manguezais, intestinos de animais e humanos (Cardoso *et al.* 2003). As arqueias halofílicas são aptas à colonizar ambientes salinos e algumas delas vêm sendo utilizadas como modelos de estudos sobre a origem da vida e mecanismos moleculares de adaptação às condições extremas de hipersalinidade (Cavalier-Smith 2006).

1. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ. Avenida Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

2. Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Avenida Carlos Chagas Filho 373, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: leonardohp@bioqmed.ufrj.br

### OS AMBIENTES HIPERSALINOS

Ambientes salinos resultam do acúmulo de água marinha em depressões com equilíbrio hídrico negativo, onde a evaporação excede a precipitação. Estes sistemas têm tipicamente a mesma composição de cátions e ânions da água marinha, embora muito mais concentrados (Clementino *et al.* 2008). Muitos ambientes salinos e hipersalinos encontram-se distribuídos pelo planeta Terra. A concentração de sais nesses ambientes pode variar de 3,5%, que é a concentração aproximada dos sais dissolvidos na água do mar, até concentrações próximas da saturação, 35% em tanques cristalizadores de sal (Dyall-Smith & Danson 2001).

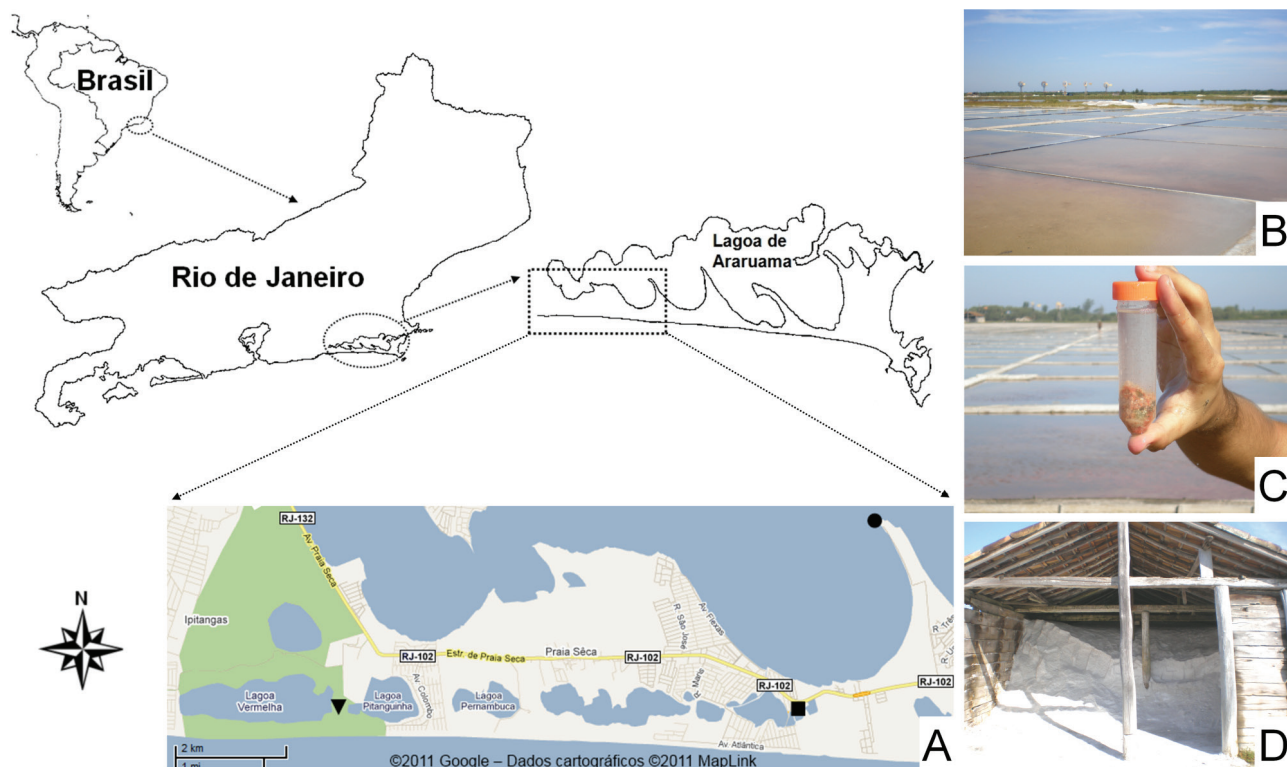
As salinas são ambientes artificiais onde a água do mar é evaporada e o sal comercial é obtido. O “Great Salt Lake” em Utah, o Mar Morto em Israel, o Mar Vermelho, o Deserto de Atacama no Chile e o complexo de lagoas em Araruama no Rio de Janeiro (Fig. 1), são exemplos de ambientes hipersalinos (Clementino *et al.* 2008). Estes habitats contém quantidades de cloreto de sódio (NaCl) próximo dos limites de tolerância biológica. Apesar de muito estudado, a composição da microbiota destes ambientes não foi plenamente identificada pelos métodos clássicos de isolamento e cultivo. O uso de técnicas de biologia molecular, como a construção de bibliotecas do gene RNA ribossomal 16S, tem proporcionado um melhor conhecimento da composição das comunidades microbianas que vivem em ambientes

com elevada concentração de sal (Sorensen *et al.* 2005, Clementino *et al.* 2008).

O habitat dos micro-organismos halofílicos extremos é hipersalino e as arqueias em cultivo laboratorial requerem para o crescimento, entre 1,5 a 4 M de NaCl, o que significa um ambiente com até 10 vezes a salinidade encontrada na água do mar (Cardoso *et al.* 2003). Esses organismos respondem bem às grandes variações ambientais, incluindo intensa radiação solar, temperaturas altas (entre 40-50 °C) durante o dia e baixas durante a noite, alta salinidade e estresse oxidativo (Shukla 2006). A prevalência de determinados íons em um ambiente hipersalino depende, em grande parte, da topografia e geologia local, além das condições climáticas gerais. O efeito de altas concentrações de sal pode ser danoso ou letal para muitos componentes da biota. Alguns eucariotos, principalmente o microcrustáceo *Artemia* sp. e a alga *Dunaliella* sp., se adaptaram à vida em ambientes com salinidade próxima da saturação (Tafreshi & Shariati 2009). Para sobreviver e prosperar em ambientes hipersalinos, os micro-organismos halofílicos e halotolerantes precisam desenvolver mecanismos de osmoatuação e tolerância ao sal (Oren 2002).

### O DOMÍNIO ARCHAEA

Em 1990, Carl Woese e colaboradores propuseram a substituição da visão bipartida da vida (procarioto/eucarioto) por um esquema baseado no sequenciamento do



**Figura 1.** A. Localização geográfica do Complexo Lagunar de Araruama no sudeste do estado do Rio de Janeiro. ●, ponto de coleta na Lagoa de Araruama; ■, ponto de coleta na Lagoa de Pernambuco; ▼, ponto de coleta na Lagoa Vermelha. B. Tabuleiros utilizados para extração de sal através da evaporação da água do mar – Lagoa Vermelha. C. Amostra de sedimento e água coletada no tabuleiro de sal. D. Armazém de estocagem do sal na salina.

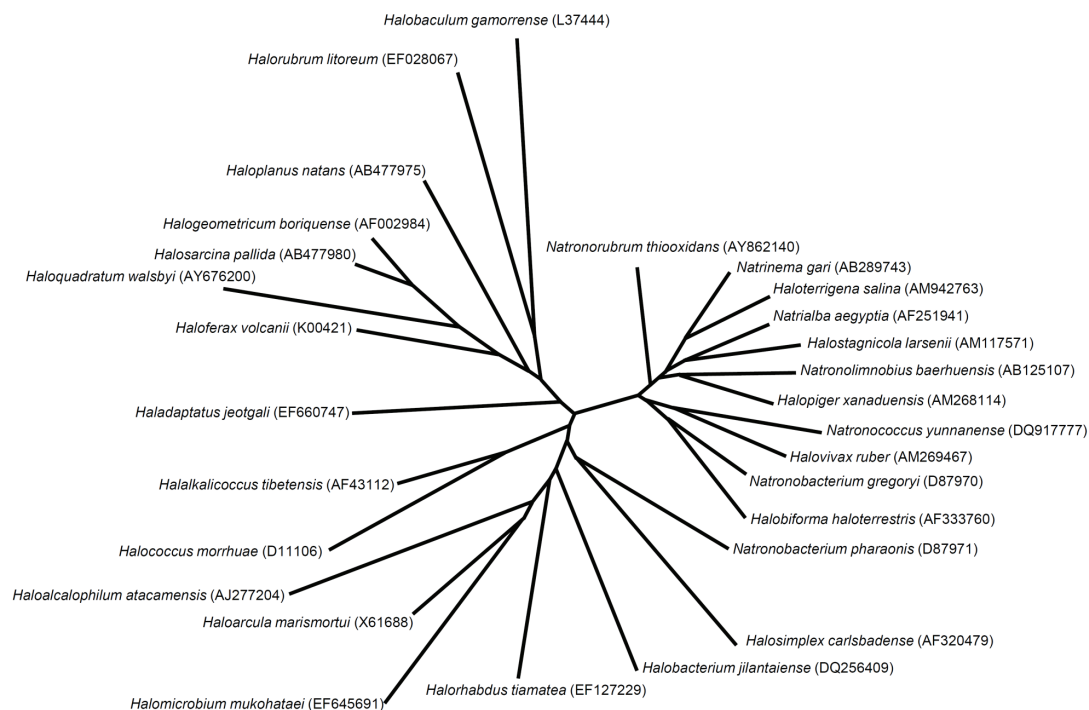
RNA ribossomal, denominado como os três domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya. O domínio Archaea apresenta um grande número de aspectos comuns aos domínios Bacteria e Eukarya, mas também possui características únicas (Beveridge 2001). No que diz respeito ao sistema de processamento de informações, a estrutura dos ribossomos e da cromatina, a presença de histonas, assim como a similaridade entre sequências das proteínas envolvidas na tradução, transcrição, replicação e reparo do DNA, apontam para uma maior proximidade entre Archaea e Eukarya. Por outro lado, algumas moléculas importantes da maquinaria de replicação de DNA, como as primases, envolvidas nos processos de alongação e iniciação, e as helicases replicativas, não são homólogas às dos eucariotos e, nem às das bactérias (Woese 1995, Woodman *et al.* 2011).

O domínio Archaea compreende, atualmente, cinco filos: Crenarchaeota, Thaumarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota e Nanoarchaeota (Gribaldo *et al.* 2006 e Pester *et al.* 2011). Crenarchaeota consiste de uma única classe, a *Thermoprotei*, que contém organismos capazes de crescer em altas temperaturas (70 a 113 °C). Todos os organismos cultivados deste filo são termofílicos (Könneke *et al.* 2005). O *Nitrosopumilus maritimus* é o único representante do filo Thaumarchaeota isolado em cultura pura (Könneke *et al.* 2005). Este organismo que oxida amônia como fonte de energia, foi recentemente isolado da água de aquário marinho. O *Cenarchaeum symbiosum* (simbionte de esponjas) também é um Thaumarchaeota que habita temperaturas mais ame-

nas, assim como outras Thaumarchaeotas mesofílicas dos ambientes marinhos (Preston *et al.* 1996).

O filo Euryarchaeota consiste de sete classes: Methanobacteria, Methanococci, Halobacteria, Thermoplasmata, Thermococci, Archaeoglobi e Methanopyri. Exceto para Methanococci, que é subdividido em três ordens, cada classe contém uma única ordem. O filo Korarchaeota engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos, identificados a partir de seqüências de DNA que codificam o gene ribossomal 16S, isoladas de fontes termais terrestres, porém somente são mantidas no laboratório na forma de culturas mista (Barns *et al.* 1996).

Pesquisas realizadas em uma fenda termal localizada no fundo do mar da Islândia, em 2002, levaram à identificação de uma nova espécie de arqueia apresentando características bastante distintas, quando comparados aos demais membros desse domínio, sendo proposta a criação do filo *Nanoarchaeota*. A espécie *Nanoarchaeum equitans* (Huber *et al.* 2002) se diferencia das demais arqueias por ser aparentemente muito primitiva, sendo encontrada em associação com outra arqueia (*Igniococcus* sp.). Este organismo de morfologia arredondada é bastante pequeno, apresentando cerca de 400 nm de diâmetro e possui um pequeno genoma, de 0,5 Megabases. De acordo com seus descobridores, as grandes diferenças apresentadas por *Nanoarchaeum* em relação à seqüência de RNA ribossomal, sugerem que tal organismo seja classificado em um novo filo (Huber *et al.* 2002). Alguns autores propõem sua raiz evolutiva



**Figura 2.** Árvore filogenética representando a família Halobacteriaceae. Árvore baseada no gene que codifica o RNAr 16S, mostrando uma espécie representativa de cada gênero da família Halobacteriaceae, construída pelo programa ARB utilizando algoritmo Neighbor-Joining.

no filo Euryarchaeota (Gao & Gupta 2007), enquanto outros propõem a alocação de *N. equitans* em um ramo que não emerge nem de Crenarchaeota e, nem de Euryarchaeota (Gribaldo & Brochier-Armanet 2006).

### ARQUEIA HALOFÍLICA

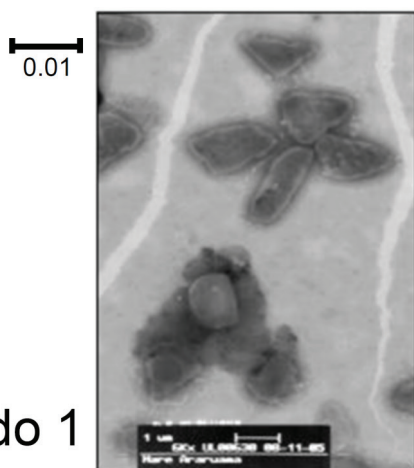
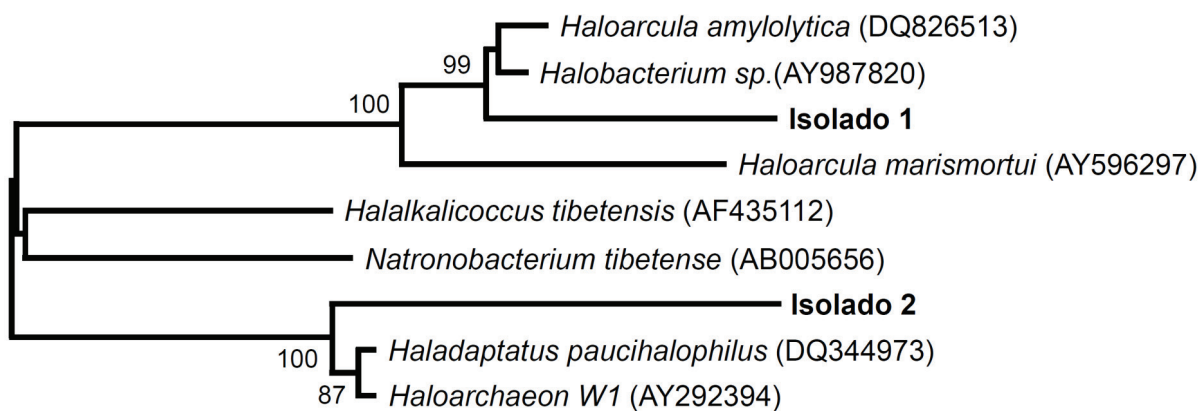
As arqueias halofílicas pertencem ao filo Euryarchaeota, classe Halobacteria e habitam ambientes extremamente salinos (Falb *et al.* 2008), podendo ser classificadas como: halofílicas moderadas, que crescem de 5 a 20% de NaCl, e halofílicas extremas, que crescem nas concentrações de 20 a 30% de NaCl (Olliver *et al.* 1994). As arqueias halofílicas são classificadas filogeneticamente em 29 gêneros contendo várias espécies, definidas com base na sequência do gene RNAr 16S e em características morfo-fisiológicas, (Oren *et al.* 2008) (Fig. 2). São descritos os gêneros: *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Haloalcalophilium*, *Haloarcula*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halopiger*, *Haloplanus*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosarcina*, *Halosimplex*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Halorubrum*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius* e *Natronorubrum* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além desses gêneros, ocorrem sequências de-

positadas no GenBank da família Halobacteriaceae não classificadas e de origem ambiental.

Estes organismos apresentam morfologias comuns, como de cocos e bacilos, e algumas formas inusitadas, como triângulos, quadrados e em formato de pinha (Fig. 3). Apesar do grupo das haloarchaea apresentar características comuns, como por exemplo, a capacidade de se adaptarem aos ambientes salinos extremos, seu metabolismo pode ser muito diferente. Algumas são heterotróficas e catabolizam aminoácidos e açúcares, outras são autotróficas e utilizam sais minerais, CO<sub>2</sub> e amônia como fonte de energia (Falb *et al.* 2008).

Espécies da família Halobacteriaceae e da ordem Haloanaerobiales têm despertado grandes interesses, uma vez que muitas arqueias anaeróbicas apresentam grande potencial biotecnológico para a produção de moléculas adaptadas aos processos industriais que operam com baixa tensão de oxigênio e com altas concentrações de sais (Horikoshi 1999). Esses organismos desenvolveram estratégias para se adaptar à salinidade, sendo uma delas o ajuste da concentração dos solutos intracelulares de maneira a compensar o aumento da salinidade externa. Íons inorgânicos como K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> são os mais utilizados no equilíbrio da osmolaridade (Grant 2004).

As arqueias halofílicas possuem uma característica marcante no equilíbrio da pressão osmótica em ambientes hiper-salinos, elas acumulam sais inorgânicos



Isolado 1

Isolado 2

**Figura 3.** Alocação filogenética e microscopia eletrônica de transmissão (Isolado 1) e microscopia óptica (Isolado 2) de micro-organismos do domínio Archaea. isolados do Complexo Lagunar de Araruama.

no interior da célula, enquanto as bactérias acumulam principalmente solutos orgânicos (Okamoto *et al.* 2008). Outra estratégia é o acúmulo de solutos compatíveis, pequenas moléculas orgânicas que não interferem no metabolismo celular e na maquinaria molecular. Solutos compatíveis são normalmente compostos não carregados ou eletricamente neutros (*zwitteriônicos*) quando submetidos às condições intracelulares (Grant 2004). Estudos mostram que o acúmulo de solutos tem outro papel, além do equilíbrio osmótico, o de aumentar a estabilidade das proteínas protegendo as enzimas da desnaturação (Roberts 2005).

Os solutos utilizados pelos micro-organismos halofílicos, podem ser classificados em: açúcares (trealose, sacarose, sulfotrehalose e glucosilglicerol) e polióis (glicerol, arabitol e manitol); aminoácidos e seus derivados (prolina, glutamato e glutamina), incluindo metilaminas (Saum & Muller 2007); além de betaínas (compostos de trimetilamônio), ectoínas e ocasionalmente peptídeos (Roberts 2005). Fazendo uma comparação da composição de aminoácidos das proteínas, foi observado que as halofílicas são muito ricas em aminoácidos ácidos (glutamato e aspartato), devido à presença de muitas cargas negativas sobre a sua superfície, permitindo uma maior hidratação e impedindo que a alta concentração salina cause o fenômeno de agregação das proteínas (Champdoré *et al.* 2007).

#### CULTIVO DE ARQUEIAS HALOFÍLICAS

O cultivo das haloarchaeas é realizado em meios de cultura específicos, contendo altas concentrações de sais, dificultando ou mesmo inibindo o crescimento de outros micro-organismos (Rodríguez-Valera *et al.* 1980). Os sais mais utilizados na preparação desses meios são cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cujas concentrações podem variar, chegando ao limite de saturação na água próximo dos 30% (Lanyi & Steveson 1969). Esses sais simulam o ambiente hipersalino, selecionando os micro-organismos que possuem mecanismos adaptativos requeridos para o crescimento nessas condições (Fig. 4).

Em sistemas salinos, como a lagoa de Araruama e as salinas adjacentes (Fig. 1A e B), a água do mar é bombeada com a utilização de energia eólica para cristalizadores onde o sal é progressivamente precipitado através da evaporação da água. Este processo resulta em um ambiente com gradiente salino, que permite a presença de muitos micro-organismos halofílicos, variando de água do mar até os leitos cristalizados onde o sal é precipitado (Baas Becking 1931).

O crescimento de micro-organismos halofílicos fototróficos ocorre em poucas espécies, sob baixa tensão de oxigênio e é extremamente lento e ineficiente, além de não apresentar nenhuma vantagem frente o cultivo quimioorganotrófico. Em relação às condições de temperatura, a margem de crescimento varia de 37-50 °C. Temperaturas mais baixas apresentam algumas vantagens uma vez que a solubilidade do oxigênio diminui com aumento da temperatura, o que pode ser um fator limitante em culturas em meios líquidos sem agitação (Rodríguez-Valera *et al.* 1980).

Em relação ao pH, os halofílicos se dividem em 2 grupos, os neutrófilos e os alcalifílicos, os quais apresentam crescimento favorável em pH 7,2 e 9,5 respectivamente. Meios de cultura contendo carboidratos merecem cuidados especiais em relação ao pH, pois ele cai bruscamente durante o cultivo tornando o meio ácido e induzindo uma fase estacionária prematura (Lanyi & Steveson 1969). Micro-organismos halofílicos são muito sensíveis à presença de sais biliares (Kamekura *et al.* 1988). Quando possível, as peptonas devem ser evitadas uma vez que elas são geralmente contaminadas com estes sais, embora alguns fabricantes ofereçam produtos livres desses compostos. Meio de cultura contendo extrato de levedura, carbono, nitrogênio e fonte de fósforo é considerado um dos mais eficientes no crescimento dos halofílicos (Rodríguez-Valera *et al.* 1980).

Hidrolisados de caseína, como casaminoácidos ou triptona, têm sido usados com sucesso por muitos pesquisadores, embora uma fonte adicional de fósforo possa ser requerida (Charlebois *et al.* 1987). A glicose é o melhor açúcar a ser utilizado como fonte de carbono e energia por espécies que utilizam carboidratos, já os dissacarídeos como a sacarose ou a lactose são substratos



**Figura 4.** Cultivo de micro-organismos provenientes da região de Araruama utilizando meios de cultura hipersalinos líquidos e sólidos.

tos pouco utilizados. Todas os halofílicos exigem NaCl em concentrações que variam entre 50-250g/litro. O magnésio é requerido por espécies não alcalifílicas, em concentrações de 20g/litro para a maioria das linhagens, assim como sulfato ou cloreto. Finalmente, o cálcio está sempre presente nas formulações para halofílicos, normalmente em baixas quantidades (Lanyi & Steveson 1969).

A preservação das linhagens halofílicas merece um cuidado especial, uma vez que algumas linhagens são conhecidas por possuir grande variabilidade devido a rearranjos genômicos (Pfeifer & Blaseio 1990). Culturas semeadas em ágar inclinado e mantidas na temperatura de 4 °C podem manter as células por meses e até um ano, sem apresentar significativo decréscimo da viabilidade celular (observação pessoal). O método mais indicado para uma manutenção por longo período é a estocagem a -70 °C após a adição de 15% de glicerol. Outro método que tem proporcionado boa manutenção da viabilidade celular é o que chamamos de *Liquid drying*, um método alternativo ao *Vacuum-drying* para a preservação de organismos particularmente sensíveis ao estágio inicial de congelamento durante o processo de liofilização. O fator intrínseco deste processo é que a cultura é preservada do congelamento e a secagem ocorre diretamente a partir da forma líquida.

Existem em torno de 803 espécies de arqueias halofílicas, além daquelas de origem ambientais não classificadas em bancos de dados como, por exemplo, o GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso em Junho de 2009). No Brasil, Clementino e colaboradores isolaram e identificaram as duas primeiras arqueias halofílicas (Figs. 3 e 4) de uma salina na região de Araruama, localizada no Rio de Janeiro. Os experimentos adicionais exigidos para a descrição de novas espécies pelo *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* (Oren *et al.* 2008), estão sendo realizados em colaboração com o professor Antonio Uceru Ventosa, da Universidade de Sevilla, Espanha, membro do *International Committee on Systematics of Prokaryotes*, visando à descrição das novas espécies de arqueias halofílicas isoladas em cultura pura pela primeira vez no Brasil.

### METAGENÔMICA DAS COMUNIDADES HALOFÍLICAS

O interesse em micro-organismos halofílicos produtores de compostos biologicamente ativos vem crescendo, mas a maior parte das espécies que compõem essas comunidades microbianas ainda não foi isolada em cultura pura. Como alternativa para a prospecção dessa biota, os metagenomas de ambientes halofílicos vem sendo utilizados com sucesso na identificação de genes alvos envolvidos na síntese de produtos naturais de interesse comercial (Cardoso *et al.* 2003). Esse método envolve a construção de bibliotecas genômicas através de extração e clonagem de DNA metagenômico, extraí-

do diretamente do ambiente, sem a necessidade do isolamento do organismo de interesse (Stein *et al.* 1996). Além da utilização do RNAr 16S, atualmente, com o avanço das técnicas de sequenciamento de DNA e bioinformática, é possível reconstruir e conhecer genomas, vias metabólicas e principalmente novas biomoléculas com interessantes propriedades biotecnológicas (Pašić *et al.* 2009).

Atualmente vários genomas completos e plasmídeos de micro-organismos halofílicos estão disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), como por exemplo, *Salinibacter ruber* DSM 13855 plasmídeo pSR35 - CP 000160, *Haloarcula* sp. AS7094 plasmídeo pSCM201 - NC 006426 e *Halobacterium* sp. NRC-1 plasmídeo pNRC100 - NC 001869. Estes e outros depósitos estão contribuindo para um melhor entendimento de estratégias adaptativas e evolutivas, mas também fornecendo um precioso banco de seqüências e de moléculas de interesse biotecnológico e industrial (Corcelli *et al.* 2004, La Duc *et al.* 2007).

Estudos feitos utilizando extração do DNA ambiental e técnicas de PCR, análises filogenéticas e cultivo em meios diferenciados demonstram que o percentual de arqueias cultivadas não condiz com a maioria das espécies encontradas nesses ambientes (Burns *et al.* 2004). As técnicas moleculares indicam que a diversidade das arqueias halofílicas é muito maior do que o previsto inicialmente, e muitas delas ainda não foram cultivadas (Clementino *et al.* 2008). Como exemplo, as haloarchaeas quadradas, *Haloquadratum walsbi*, representam 40% a 80% das arqueias presentes em muito lagos salinos, porém poucos membros deste grupo foram cultivados em laboratório com as técnicas de cultivo empregadas atualmente (Burns *et al.* 2004).

### APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

O aumento no número de arqueias isoladas, os recentes trabalhos utilizando metagenômica e as respectivas descobertas das extremozimas documentam enorme desenvolvimento no campo científico. Essas enzimas se tornaram modelos para estudar a evolução de sistemas enzimáticos, a estabilidade da estrutura das proteínas e os mecanismos da atividade catalítica em condições drásticas (Champdoré *et al.* 2007). O interesse científico pelas arqueias halofílicas vem crescendo nos últimos anos em função da necessidade de compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência a estas condições extremas que desencadearam adaptações necessárias para a sobrevivência em altas concentrações de sais (Champdoré *et al.* 2007, Cardoso *et al.* 2003). De fato, proteínas isoladas destas arqueias são consideradas úteis para uma variedade de aplicações, neste caso pelas suas extraordinárias propriedades em atuarem em condições hipersalinas (Tab. 1).

As extremozimas halofílicas desempenham funções semelhantes às outras não halofílicas, porém requerem a presença de grandes quantidades de sais (até 4 M de

**Tabela 1:** Produtos halofílicos com possíveis aplicações biotecnológicas

Produtos	Aplicações	Referências
Bacteriorodopsina	Aparelhos óticos para fins terapêuticos e clínicos, comutação e portas óticas, holografia, conversores fotoelétricos.	Topolancik & Vollmer 2007 Rao 2010, Trivedi <i>et al.</i> 2011
Solutos Compatíveis	Estabilizadores celulares e moleculares, resistência à salinidade, aplicações em indústrias farmacêuticas e de cosméticos.	Roberts 2005, Wood <i>et al.</i> 2001
Biopolímeros		
Exopolissacarídeos	Emulsificantes, estabilizantes, espessantes, agentes gelificantes e lubrificantes.	Souza & Garcia-Cruz 2004
Lipossomos	Carreadores de fármacos com aplicações médicas.	Batista <i>et al.</i> 2007
Ácido poli- $\gamma$ -glutâmico	Humectantes, refinadores.	Wei <i>et al.</i> 2009
Polihidroxialcanoatos	Plásticos biodegradáveis, próteses.	Pettinarim <i>et al.</i> 2001
Enzimas	Hidrolases e Isomerases.	Bhatnagar <i>et al.</i> 2005
Halocinas	Aplicações clínicas em cardiologia e em transplantes de órgãos.	O'Connor & Shand 2002 Lequerica <i>et al.</i> 2006
Vesículas de Gás	Apresentação de antígenos e desenvolvimento de vacinas.	Sremac & Stuart 2008
Pigmentos Carotenóides ( $\beta$ -caroteno)	Produzido como agente antioxidante, suplementação dietética, utilizado na indústria farmacêutica e em cosméticos.	Oren 2002 Tafreshi & Shariati 2009
Ectoina e Hidroxiectoina	Enzima responsável pelo equilíbrio hídrico celular. Recentemente iniciou-se sua produção em escala industrial.	Oren 2002

NaCl) para manterem as suas atividades, solubilidade e estabilidade (Champdoré *et al.* 2007). A repulsão eletrostática causada por uma abundância de cargas negativas na superfície das proteínas halofílicas é neutralizada por íons da fase aquosa resultando em uma estrutura mais estável. Como consequência, as enzimas halofílicas se equilibram entre a flexibilidade, que proporciona uma maior propriedade catalítica, e a rigidez, para evitar a desnaturação pelo excesso de sal (Oren 2002).

A propriedade físico-química das proteases em adaptação a ambientes extremos é um modelo útil para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas interações entre as proteínas e os solventes. Muitas proteases halofílicas identificadas apresentam aplicações industriais e biotecnológicas (Okamoto *et al.* 2008). Lanyi e Steveson em 1969 avaliaram a estabilidade da catalase de *Halobacterium cutirubrum* na presença de DMSO (dimetilsulfóxido) e observaram que concentrações de 2,5-5 M de NaCl foram capazes de ativar a enzima e manter 100% da sua atividade. Por outro lado, a protease de *Haloferax mediterranei* na presença de 10% (v/v) de n-propanol manteve apenas 1% de sua atividade, enquanto que com 10% (v/v) de DMF, 30% da atividade foi mantida (Stepanov *et al.* 1992). Ryu *et al.* (1994) avaliaram a atividade da protease de *Halobacterium halobium* na presença de 80% de DMF:água (v/v) e demonstraram que, além de manter a atividade, a enzima teve sua atividade esterásica aumentada cerca de 80 vezes em relação à atividade amidase.

A capacidade de produzir e acumular altas concentrações de compostos orgânicos de baixo peso molecular torna as arqueias halofílicas moderadas úteis para a produção destes osmólitos. Alguns solutos compatíveis, especialmente glicina, betaína e ectoinas ganharam uma atenção considerável nos últimos anos, devido as suas

propriedades como estabilizadoras de enzimas, ácidos nucléicos e membranas naturais e artificiais (Roberts 2005).

O uso industrial desses compostos pode ser realizado na produção farmacêutica e cosmética. Os carotenóides são utilizados na indústria alimentícia como corante de alimentos e como aditivos em produtos alimentares (Champdoré *et al.* 2007). Assim, as investigações da utilização de halofílicos moderados como produtores de carotenóides podem ser de grande interesse industrial (Ventosa *et al.* 1998). Além disso, arqueias halofílicas produzem vesículas de gás, que possuem potencial para uso clínico, como uma apresentação alternativa de antígeno, ou seja, como adjuvante para o desenvolvimento de vacinas (Sremac & Stuart 2008).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ambientes hipersalinos constituem um dos ecossistemas mais fascinantes no que se refere à relevância científica no estudo da ecologia e evolução das comunidades microbianas. As estratégias únicas adotadas pelos micro-organismos halofílicos para suportar as altas concentrações de sais, além das potenciais aplicações biotecnológicas de seus produtos, são hoje temas bastante explorados por pesquisadores de todo mundo.

Tais como todos os outros ecossistemas do nosso planeta, os ambientes salinos estão sujeitos à contaminação por metais pesados, esgotos e outros compostos tóxicos de origem antropogênica. Efluentes urbanos e industriais são muitas vezes descarregados em salinas desativadas, especialmente nos países em desenvolvimento (observação pessoal). Vários processos industriais empregados na produção de pesticidas, produtos químicos e fármacos, bem como extração de petróleo

e gás, geram bilhões de litros de água salgada para serem descartados no meio ambiente. Estima-se que 5% do total de efluentes do mundo são altamente salinos. A indústria do petróleo gera uma enorme quantidade de águas residuais (águas de produção) com alta salinidade além de contaminadas com óleo (Le Borgne *et al.* 2008). Devido à queda na disponibilidade de água doce, o uso de água salgada bem como sua reutilização, são estratégias que estão sendo usadas na indústria, aumentando o volume de efluentes hipersalinos a serem tratados.

O tratamento biológico desses resíduos industriais e a bioremediação de águas de produção não é possível com micro-organismos convencionais devido à alta salinidade que promove a perda da integridade da parede celular, desnaturando as proteínas e produzindo alterações na pressão osmótica que lisa as células. Assim, micro-organismos halofílicos são excelentes candidatos para a degradação de poluentes em ambientes com altas concentrações de sal (Le Borgne *et al.* 2008).

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), pelo suporte financeiro, e à Lucia Luiza Bastos Henriques, pela revisão ortográfica.

### REFERÊNCIAS

- BAAS BECKING, L.G.M. 1931. Historical notes on salt and salt-manufacture. *Scientific Monthly*, 32: 434-446
- BARNES, S. M., DELWICHE, C. F., ALMER, J. D. & PACE, N. R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *PNAS*, 93: 9188-9193.
- BATISTA, C. M., CARVALHO, C. M. B. & MAGALHAES, N. S. S. 2007. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 43: 167-179. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>>
- BEVERIDGE, T. J. 2001. Use of the gram stain in microbiology. *Biotech Histochem.*, 76: 111-118. <<http://dx.doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>>
- BHATNAGAR, T., BOUTAIBA, S., HACENE, H., CAYOL, J. L., FARDEAU, M. L., OLLIVER, B. & BARATTI, J. C. 2005. Lipolytic activity from Halobacteria: screening and hydrolase production. *FEMS Microbiol Lett.*, 248: 133.
- BURNS, D. G., CAMAKARIS, H. M., JANSSEN, P. H. & DYALL-SMITH, M. L. 2004. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian Crystallizer Pond are cultivable. *Appl and Environ. Microb.*, 9: 5258-5265. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.9.5258-5265.2004>>
- CARDOSO, A. M., CLEMENTINO, M. B. M., MARTINS, O. B., VIEIRA, R. P., ALMEIDA, R. V., ALQUERES, S. M. C. & ALMEIDA, W. I. 2003. Archaea: potencial biotecnológico. *Rev. Biotech. Ciência e Desenvol.*, 30: 71-77.
- CAVALIER-SMITH, T. 2006. Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 361: 969-1006. <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2006.1842>>
- CHAMPDORÉ, M., STAIANO, M., ROSSI, M. & D'AURIA, S. 2007. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *J. R. Soc. Interface*, 4: 183-191. <<http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2006.0174>>
- CHARLEBOIS, R. L., LAM, W. L., CLINE, S. W. & DOOLITTLE, W. F. 1987. Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaeobacterium. *PNAS*, 84: 8530-8534.
- CLEMENTINO, M. M., VIEIRA, R. P., CARDOSO, A. M., NASCIMENTO, A. P. A., SILVEIRA, C. B., RIVA, T. C., GONZALEZ, A. S. M., PARANHOS, R., ALBANO, R. M., VENTOSA, A. & MARTINS, O. B. 2008. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. *Extremop.*, 12: 595-604. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00792-008-0162-x>>
- CORCELLI, A., LATTANZIO, V. M. T., MASCOLO, G., BABUDRI, F., OREN, A. & KATES, M. 2004. Novel sulfonolipid in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter rubber*. *Appl. and Environ. Microb.*, 11: 6678-6685. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.11.6678-6685.2004>>
- DYALL-SMITH, M. & DANSON, M. 2001. The life of brine: halophiles in 2001. *Genome Biol.*, 2(12): reports 4033
- FALB, M., MULLER, K., KÖNIGSMAIER, L., OBERWINKLER, T., HORN, P., GRONAU, S. V., GONZALEZ, O., PFEIFFER, F., BORNBERG-BAUER, E. & OESTERHELT, D. 2008. Metabolism of halophilic archaea. *Extremop.*, 12: 177-196. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00792-008-0138-x>>
- GAO, B. & GUPTA, R. S. 2007. Phylogenomic analysis of proteins that are distinctive of Archaea and its main subgroups and the origin of methanogenesis. *BMC Genomics*, 8: 86 <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-86>>
- GRANT, W. D. 2004. Life at low water activity. *The Royal Soc.*, 359: 1249-1267. <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2004.1502>>
- GRIBALDO, S. & BROCHIER-ARMANET. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 361: 1007. <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2006.1841>>
- HORIKOSHI, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microb. and Molec. Biol. Rev.*, 63: 735-750.
- HUBER, H., HOHN, M. J., RACHEL, R., FUCHS, R. R., T, WIMMER, V. C. & STETTER, K. O. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417: 63-67. <<http://dx.doi.org/10.1038/417063a>>
- KAMEKURA, K., OESTERHELT, R. W., ANDERSON, P. & KUSHNER, D. J. 1988. Lysis of halobacteria in bactopectone by bile acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 990-995.
- KASHEFI, K. & LOVLEY, D. R. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301: 934. <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1086823>>
- KÖNNEKE, M., BERNHARD, A. E., DE LA TORRE, J. R., WALKER, C. B., WATERBURY, J. B. & STAHL, D. A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437: 543-546. <<http://dx.doi.org/10.1038/nature03911>>
- LA DUC, M. T., DEKAS, A., OSMAN, S., MOISSEL, C., NEWCOMBE, D. & VENKATESWARAN, K. 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl. and Environ. Microb.*, 82: 2600-2611. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03007-06>>
- LANYI, J. K. & STEVENSON, J. 1969. Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase. *Journ. of Bacteriol.*, 98: 611-616.
- LE BORGNE, S., PANIAGUA, D. & VAZQUEZ-DUHALT, R. 2008. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journ. of Molec. Microb. and Biotech.*, 15: 74-92. <<http://dx.doi.org/10.1159/000121323>>
- LEQUERICA, J. L., O'CONNOR, J. E., SUCH, L., ALBEROLA, A., MESEGUER, I., DOLZ, M., TORREBLANCA, M., MOYA, A., COLLOM, F. & SORIA, B. 2006. A halocin acting on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger of haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals. *J. Physiol. Biochem.*, 62: 253.
- O'CONNOR, E.M. & SHAND, R.F. 2002. Halocins and sulfobiocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 23-31.



- OKAMOTO, D. N., KONDO, M. Y., SANTOS, J. A. N., NAKAJIMA, S., HIRAGA, K., ODA, K., JULIANO, M. A., JULIANO, L. & GOUVEA, I. E. 2008. Kinetic analysis of salting activation of a subtilisin-like-halophilic protease. *Bioch. et Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 1794: 367-373. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.017>>
- OLLIVER, B., CAUMETTTE, P., GARCIA, J. & MAH, R. A. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environment. *Microb. Rev.*, 58: 27-38.
- OREN, A. 2002. *Halophilic Microorganisms and their environments*. Dordrecht: Kluwer Academic.
- OREN, A., VENTOSA, A. & GRANT, W. D. 2008. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order halobacteriales. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 47: 233-238. <<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-1-233>>
- PAŠIĆ, L., RODRIGUEZ-MUELLER, B., MARTIN-CUADRADO, A. B., MIRA, A., ROHWER, F. & RODRIGUEZ-VALERA, F. 2009. Metagenomic islands of hyperhalophiles: the case of *Salinibacter ruber*. *BMC Genomics*, 10. <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-570>>
- PETTINARIM, J., VAZQUEZ, J. G., SILBERSCHMIDT, D., REHM, B., STEINBUCHER, A. E & MENDEZ, S. B. 2001. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl Environ Microbiol.*, 67: 5331.
- PESTER, M., SCHLEPER, C. & WAGNER, M. 2011. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 1-7.
- PFEIFER, F. & BLASEIO, U. 1990. Transformation of *Halobacterium halobium*: Development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. *PNAS*, 87: 6772-6776.
- PRESTON, C. M., WU, K. Y., MOLNSKI, T. F. & DELONG, E. F. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov. sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 6241-6246.
- RAO, D. V. 2010. Photonic Applications of Bacteriorhodopsin. In: LATIN AMERICA OPTICS AND PHOTONICS CONFERENCE, OSA Technical Digest (CD).
- ROBERTS, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1: 5. <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>>
- RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRRAQUERO, F. & RAMOS-CORMENZANA, A. 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *J. Gen. Microbiol.*, 119: 535-538.
- ROSSI, M., CIARAMELLA, M., CANNIO, R., PISANI, F. M., MORACCI, M. & BARTOLUCCI, S. 2003. Meeting Review: Extremophiles 2002. *Journ. of Bacteriol.*, 13: 3683.
- RYU, K., KIM, J. & DORDICK, J. S. 1994. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme and Microbial Techn.*, 16: 266-275. <[http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90165-1](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)90165-1)>
- SAUM, S. H. & MULLER, V. 2007. Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *Journ of Bacteriol.*, 19: 6968-6975. <<http://dx.doi.org/10.1128/JB.00775-07>>
- SHUKLA, H. D. 2006. Proteomic analysis of acidic chaperones, and stress proteins in extreme halophile *Halobacterium* NRC-1: a comparative proteomic approach to study heat shock response. *Proteome Science*, 4: 6. <<http://dx.doi.org/10.1186/1477-5956-4-6>>
- SORENSEN, K. B., CANFIELD, D. E., TESKE, A. P. & OREN, A. 2005. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. *Appl. and Environ. Microb.*, 71: 7352-7365. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.7352-7365.2005>>
- SOUZA, D. M. & GARCIA-CRUZ, H. C. 2004. Fermentative production of exocellular polysaccharides by bacteria. *Semina: Ciencias Agrarias*, 25: 331-340.
- SREMAC, M. & STUART, E. S. 2008. Recombinant gas vesicles from *Halobacterium* sp. displaying SIV peptides demonstrate biotechnology potential as a pathogen peptide delivery vehicle. *BMC Biotechnology*, 8: 9. <<http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-8-9>>
- STEIN, J. L., MARSH, T. L., WU, K. Y., SHIZUYA H. & DELONG, E. F. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J Bacteriol.*, 178: 591-599.
- STEPANOV, V. M., RUDENSKAYA, G. N., REVINA, L. P., GRYAZNOVA, Y. B., LYSOGOSKAYA, E. N., FILIPPOVA, I. Y. & IVANOVA, I. I. 1992. A serine proteinase of an archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisins. *Biochem. Jour.*, 285: 281-286.
- TAFRESHI, A. H. & SHARIATI M. 2009. Dunaliella biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiology*, 107: 14-35.
- TOPOLANCIK, J. & VOLLMER, F. 2007. Photoinduced transformations in bacteriorhodopsin membrane monitored with optical microcavities. *Bophys. Journ.*, 92: 2223.
- TRIVEDI, S., CHOUDHARY, O. P. & GHARU, J. 2011. Different proposed applications of bacteriorhodopsin. *Recent. Pat. DNA Gene Seq.*, 5: 35-40.
- VENTOSA, A., NIETO, J. J. & OREN, A. 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microb and Molec Biol Rev.*, 2: 504.
- WEI, X., JI, Z. & CHEN S. 2010. Isolation of halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly-gamma-glutamic acid. *Appl. Biochem. Biotec.*, 5: 1332-40.
- WOESE, C. R. 1995. When is a prokaryote not a prokaryote? In: ROBB, F.T. & PLACE, A.R.(Eds.) *Archaea*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 15-16.
- WOESE, C. R., KANDLER, O. & WHEELIS, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 87: 4576-4579.
- WOODMAN, I. L., BRAMMER, K. & BOLT, E. L. 2011. Physical interaction between archaeal DNA repair helicase Hel308 and Replication Protein A (RPA). *DNA Repair (Amst)*, 10: 306-13.
- WOOD, J. M., BREMER, E., CSONKA, L. N., KRAEMER, R., POOLMAN, B., VAN DER HEIDE, T. & SMITH, L. T. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 3: 437-60.