



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências da Biointeração
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

Diana Alves Matos

Bioprospecção de bactérias do gênero *Vibrio sp.* isoladas de ambiente marinho para produção de exopolissacarídeos

Salvador – BA

2015

DIANA ALVES MATOS

Bioprospecção de bactérias do gênero *Vibrio sp.* isoladas de ambiente marinho para produção de exopolissacarídeos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Salvador-BA

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

M433 Matos, Diana Alves

Bioprospecção de bactérias do gênero *Vibrio sp.* isoladas
de ambiente marinho para produção de exopolissacarídeos /
Diana Alves Matos. – Salvador, 2015.

63 f.

Orientador: Prof. Dr Milton Ricardo de Abreu Roque

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da saúde, 2015.

1. Exopolissacarídeos. 2. Produção, 3. *Vibrio*. I. Roque,
Milton Ricardo de Abreu. II Universidade Federal da Bahia. III.
Título.

CDU: 577.23

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e permitir a realização desse trabalho. Aos meus pais Hélio e Ana Lúcia pelo amor, dedicação e apoio que sempre me deram. Ao meu querido irmão que sempre acreditou em mim, pelos risos arrancados nos momentos de desespero e conselhos nos momentos certos. Aos meus avós pelas orações e preocupação. Aos meus tios e tias por estarem sempre torcendo e se preocupando comigo.

Ao meu orientador professor Milton Roque por ter me dado essa oportunidade de crescer como pessoa e como profissional, pela paciência, carinho e todo conhecimento que me foi passado.

Gostaria de fazer um agradecimento especial à Brena, Carine, Fulvia, Luísa e Sueli. Obrigada por todo apoio, carinho, conselhos, ensinamentos e acima de tudo pela amizade. Amo vocês! Não poderia deixar de agradecer a Hendor, Marcos e Mooana, meus estagiários, companheiros, amigos para todas as horas. Obrigada pela paciência, ajuda e resenhas durante esses anos. Gena, Luma e José, meus companheiros, parceiros, amigos e quebra-galhos! Obrigada por tudo! Agradeço à todos os colegas e amigos do Bioprospector.

Meus queridos amigos do mestrado, Line, Mai, Dri, Madi, Pati, Diego, Bel, Tati, amo essa turma! Meus companheiros de vida, Aiala, Allegra, Priscilla, Margila, Carla, Pablo, Nanda, Manoel, Everton, Carol, as Lores. Sou muito grata pela amizade de vocês.

Ao apoio dos laboratórios parceiros: Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/UFBA); Laboratório de Parasitologia (UFBA); LAPESCA/LAPBIM (UFBA).

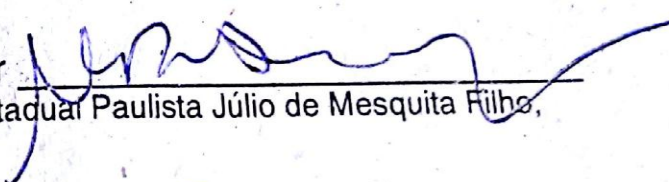
DIANA ALVES MATOS

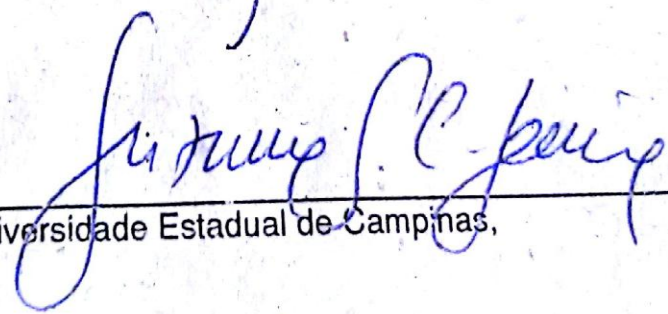
**Bioprospecção de bactérias do gênero *Vibrio* sp. isoladas
de ambiente marinho para a produção de
exopolissacarídeos**

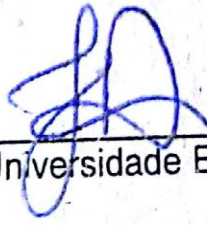
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Milton Ricardo de Abreu Roque – Orientador 
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Suzana Telles da Cunha Lima 
Doutora em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Janice Izabel Druzian 
Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCMB – Coleção de Culturas de Micro-organismos do Instituto de Ciências da Saúde

CPS – Polissacarídeo capsular

cP – centipoise

Da – Dalton

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EPS – Exopolissacarídeo

FTIR – Fourier Transformed Infrared

g/L - Grama por Litro

KDa – Quilodalton

LB - Luria-Bertani

mg – Miligrama

MM – Massa molecular

mV – milivolt

m/v – massa por volume

NA – Nutrient Agar

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

rpm – Rotação por minuto

SWN – Sea Water Nutrient (Água do mar nutriente)

TCBS – Tiosulfato Citrato Bile Sais

T% - porcentagem de transmitância

UFC – Unidade formadora de colônia

v/v - Volume por Volume

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Micrografias de transmissão eletrônica de <i>V. diabolicus</i> : cultivados em meio líquido (A) e em meio sólido (B) (ROUGEAX et al., 1999).....	21
Figura 2: Ilustração mostrando a relação evolutiva da família Vibrionaceae (MANSSON et al., 2011).....	30
Figura 3: Gráfico representando a Curva de calibração dos padrões de dextrana em função do tempo de retenção.....	34
Figura 4: Imagem das colônias bacterianas amareladas em meio TCBS,.....	35
Figura 5: Imagem das colônias bacterianas verdes em meio TCBS do isolado CCMB 22.....	35
Figura 6: Imagem das colônias bacterianas do isolado CCMB 01 em meio NA.....	36
Figura 7: Imagem do resultado da coloração de Gram.....	37
Figura 8: Imagem do crescimento e produção de exopolissacarídeos em meio de cultura líquido (A: Meio Zobell, B: Meio SWN, C: Meio SWN 1% de glicose.....	38
Figura 9: Imagem dos exopolissacarídeos extraídos dos isolados CCMB 01, CCMB65 e CCMB 17.....	39
Figura 10: Gráfico da Produção nos três meios: Meio Zobell, Meio SWN e Meio SWN 1% com glicose dos isolados.....	40
Figura 11: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 01.....	42
Figura 12: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 17.....	43
Figura 13: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 18.....	44

Figura 14: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 22.....	45
Figura 15: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 65.....	46
Figura 16: Espectro dos EPSs de CCMB 17 e CCMB 18.....	48
Figura 17: Espectros dos EPSs de CCMB 01, CCMB 22 e CCMB 65.....	48
Figura 18: Viscosidade aparente (cP) dos isolados CCMB 17 e CCMB 18.....	50
Figura 19: Viscosidade aparente (cP) dos isolados CCMB 01, CCMB 22 e CCMB 65.....	50
Figura 20: Cromatograma do isolado CCMB 01.....	52
Figura 21: Cromatograma do isolado CCMB 17.....	52
Figura 22: Cromatograma do isolado CCMB 18.....	53
Figura 23: Cromatograma do isolado CCMB 22.....	53
Figura 24: Cromatograma do isolado CCMB65.....	54
Figura 25: Correlação entre viscosidade aparente máxima e MM dos EPSs produzidos pelos isolados.....	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Média de produção dos isolados nos três meios.....	39
Quadro 2: Bandas encontradas nos espectros de infravermelho.....	47
Quadro 3: Massa molecular, tempo de retenção, área e viscosidade aparente do EPSs dos isolados.....	54
Quadro 4: Vibrio produtores de EPS e as características dos seus respectivos EPSs.....	55
Tabela 1: Compostos bioativos secundários da família Vibrionaceae.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS	16
3.2 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE EPS DE AMBIENTE MARINHO	19
3.3 O GÊNERO VIBRIO	21
3.4 EPS PRODUZIDOS POR <i>VIBRIO sp.</i>	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 COLETA DE AMOSTRA	30
4.2 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS	30
4.3 MICRO-ORGANISMOS	31
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS	31
4.5 CULTIVO, PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DO EPS	33
4.5.1 CULTIVO DOS MICRO-ORGANISMOS	33
4.5.2 PRODUÇÃO DE EPS	32
4.5.3 EXTRAÇÃO DO EPS	33
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO EPS	34
4.6.1 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	34
4.6.2 ANÁLISE DA VISCOSIDADE APARENTE	34
4.6.3 MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS	35
5.2 PRODUÇÃO DE EPS	38
5.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	42
5.4 VISCOSIDADE APARENTE	51
5.5 MASSA MOLECULAR (MM)	51
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO I	65

MATOS, Diana Alves. Bioprospecção de bactérias do gênero *Vibrio sp.* isoladas de ambiente marinho para produção de exopolissacarídeos. 64 f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Os exopolissacarídeos se tornaram objeto de estudo em diversas áreas da biotecnologia, uma vez que estes apresentam propriedades químicas e físicas que permitem uma vasta aplicação industrial, em áreas como aplicações em várias indústrias, tais como, a farmacêutica, petrolífera, de cosméticos e de alimentos. O aumento da demanda por polímeros naturais para várias aplicações industriais nos últimos anos levou a um aumento de interesse na produção de exopolissacarídeo (EPS) por micro-organismos. Alguns exopolissacarídeos microbianos já estão disponíveis comercialmente como xantana, dextrana, gelana, alginato, levana, entre outros, mas ainda são poucos em relação à quantidade de polímeros que vem sendo descoberta. A busca por produtos biodegradáveis configura uma prioridade nos estudos com polímeros de aplicação industrial e as bactérias se destacam pela rapidez e facilidade de manipulação. As bactérias do gênero *Vibrio* apresentam-se numa vasta distribuição em ambiente marinho e são poucos os estudos relacionados à produção de exopolissacarídeos e suas aplicações. Dessa forma o objetivo deste estudo foi buscar exopolissacarídeos produzidos pelos isolados CCMB 01, CCMB 17, CCMB 18, CCMB 22 e CCMB 65 pertencentes ao gênero *Vibrio sp.* a fim de analisar possível aplicação industrial. Os isolados foram triados em meio TCBS Agar, quatro dos isolados cresceram amarelados no meio indicando fermentação de sacarose e apenas um não fermentou sacarose (colônias verdes). Os isolados foram testados em três meios de produção diferentes, Zobell, SWN e SWN suplementado com 1% de glicose. Os maiores valores de produção foram no meio SWN, de baixo custo, alcançando 7,9 g/L. Os EPSs extraídos apresentaram baixa massa molecular e conseqüentemente baixa viscosidade. Os espectros de infravermelho apresentaram bandas representando a presença de anéis de galactose e manose, grupo hidroxila, presença de amina e grupo haleto de alquila que são comuns a outros EPSs descritos pela literatura.

Palavras – chave: Exopolissacarídeos, Produção, *Vibrio*

MATOS, Diana Alves. Bioprospecting of bacteria of the genus *Vibrio sp.* isolated from marine environment for production of exopolysaccharides. 64 f. 2015. Dissertation (Master) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015

ABSTRACT

The exopolysaccharides have become the object of study in different fields of biotechnology, since they exhibit chemical and physical properties that allow industrial applications such as the pharmaceutical, petroleum, cosmetics and foods. The increase in demand for natural polymers for various industrial applications in recent years has led to an increased interest in the production of exopolysaccharides (EPS) by microorganisms. Some microbial exopolysaccharides are already commercially available as xanthan gum, dextran, gellan, alginate, levan, etc., but there are few compared to the amount of polymers has been discovered. The search for biodegradable products sets a priority in studies with industrial application of polymers and bacteria are characterized by speed and ease of handling. The bacteria *Vibrio* species have shown up in a wide distribution in the marine environment and there are few studies related to the production of exopolysaccharides and their applications. Thus, the aim of this study is to look for exopolysaccharides produced by isolated CCMB 01, CCMB 17, CCMB 18, CCMB 22 and CCMB 65 belonging to the genus *Vibrio sp.* to analyze possible industrial application. The isolates were screened on TCBS Agar medium, four of the isolates grew yellow in the middle indicating fermentation of sucrose and not just a fermented sucrose (green colonies). The strains were tested at three different production facilities, Zobell, SWN SWN and supplemented with 1% glucose. The greatest production amounts were the SWN medium (up to 7.9 g / L of production) that is a low-cost way. The extracted EPSs showed low molecular mass and consequently low viscosity. Infrared spectra showed bands representing the presence of galactose and mannose rings, hydroxyl group, the presence of amine and alkyl halide groups that are common to other EPSs described in the literature.

Keywords: Exopolysaccharides, Production, *Vibrio*

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por polímeros naturais, para várias aplicações industriais nos últimos anos, levou a um maior interesse em estudos sobre a produção de exopolissacarídeo (EPS) por micro-organismos. Varias espécies bacterianas apresentam a característica de produzir biopolímeros com propriedades químicas variadas, o que está relacionado às condições e as interações com outros organismos, e podem ser modulada por fatores ambientais como temperatura, demanda de oxigênio, intensidade de luz, pressão, entre outras. Os EPSs microbianos, por serem produtos naturais, apresentam como vantagens a biodegradabilidade e, além disso, a produção pode ser manipulada em laboratório, e não sofrer influência de fatores externos como variações climáticas.

Os polissacarídeos microbianos apresentam uma grande diversidade de estruturas e propriedades físicas e químicas, sendo assim, diversas aplicações industriais se tornam possíveis e muitos polímeros microbianos são utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética, petrolífera e de alimentos. Podem ser utilizados como coagulante, estabilizante, emulsificante, espessante, agente gelificante, lubrificante e em estratégias para biorremediar ambientes contaminados. Alguns exopolissacarídeos microbianos estão disponíveis comercialmente como xantana, dextrana, gelana, alginato, levana, entre outros, mas existe o potencial de novas descobertas e produção em escala industrial de polímeros que vem sendo descobertos, muito desses oriundos de ambiente marinho.

O ambiente marinho corresponde a 70% da superfície da Terra e devido à sua dimensão muito ainda tem para ser estudado, inclusive sobre os organismos vivos. Alguns Micro-organismos marinhos passaram a ganhar mais atenção porque apresentam condições especiais de vida, como altas pressões, alta salinidade entre outras, e essas condições podem levar a produção de substâncias bioativas com funções e estruturas ainda desconhecidas e que podem apresentar aplicações diversas. Muitos EPSs produzidos por bactérias do ambiente marinho já foram descritos, apresentando propriedades anticâncer, antioxidantes, agentes estabilizantes, bioabsorventes, espessantes entre outros.

O gênero *Vibrio*, poder ser isolado de vários ambientes, sendo considerado ubíquo, ocorrem naturalmente na água do mar, estuários, e sistemas de água doce. Esse gênero é mais comumente conhecido pelas doenças que causa em humanos, como a cólera e doenças em organismos marinhos como em peixes e ostras. Contudo houve um aumento no estudo desse gênero principalmente nas espécies que foram extraídas de ambientes marinhos extremos e que produzem EPSs com novas propriedades. A bactéria marinha *Vibrio diabolicus* é responsável por produzir um EPS com características semelhantes às da heparina que rendeu uma patente sobre produção e uso de polissacarídeos solúveis em água. Além de polissacarídeos, o gênero *Vibrio* é responsável pela produção de inúmeros compostos secundários bioativos, o que denota o potencial desse gênero para a Biotecnologia.

A busca por produtos biodegradáveis configura uma prioridade nos estudos com polímeros de aplicação industrial, e as bactérias se destacam pela rapidez e facilidade de manipulação. As bactérias do gênero *Vibrio* apresentam-se numa vasta distribuição em ambiente marinho e são poucos os estudos relacionados à produção de exopolissacarídeos e suas aplicações. Dessa forma, a triagem e identificação de bactérias desse gênero, proveniente de ambiente marinho, e a caracterização de EPS produzidos por elas, apresentam-se como um relevante avanço em estudos e aplicações biotecnológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção e caracterizar os exopolissacarídeos produzidos pelo gênero *Vibrio sp.* de sedimento marinho a fim de analisar uma possível aplicação industrial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias do gênero *Vibrio sp.* de ambiente marinho;
- Identificar os isolados do gênero *Vibrio sp.* produtores de EPS;

- Avaliar a produção de EPS das bactérias isoladas em diferentes meios de cultivo;
- Avaliar os efeitos dos meios de cultivo e das diferentes bactérias na produção e caracterizar os EPSs resultantes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

A capacidade de produzir polissacarídeos é amplamente encontrada entre diferentes espécies microbianas, especialmente em procariontes. As bactérias produzem diversos biopolímeros com propriedades químicas variadas através da utilização de inúmeros substratos que podem ser simples ou complexos. Muitos destes biopolímeros apresentam a mesma função, enquanto outros são específicos para determinadas espécies e têm funções biológicas distintas (REHM & VALLA, 1997; NWODO et al., 2012). Em relação à localização celular, biopolímeros podem ser intracelulares ou extracelulares. Os biopolímeros intracelulares são poucos e têm uso muito limitado, já os biopolímeros extracelulares são vastos e podem ser agrupados em quatro classes principais: polissacarídeos, polianidridos inorgânicos (tais como polifosfatos), poliésteres, e poliamidas, e foram designadas coletivamente como substâncias poliméricas extracelulares (CERNING, 1995; REHM, 2010).

A maioria dos EPSs bacterianos são sintetizados intracelularmente e exportados para o ambiente extracelular como macromoléculas. Existem algumas exceções conhecidas (por exemplo, levanas e dextranas) cuja síntese e polimerização ocorrem fora das células pela ação de enzimas segregadas que convertem o substrato em polímero no ambiente extracelular (REHM, 2009; FREITAS et al., 2011).

Os micro-organismos que produzem EPS são encontrados em vários nichos ecológicos. Um ambiente com alta oferta da relação carbono/nitrogênio normalmente contém micro-organismos que produzem polissacarídeos, por exemplo, efluentes de açúcar, de papel ou indústrias de alimentos, além de plantas de águas residuais (MORIN 1998; KUMAR et al., 2007).

A produção de EPS é uma resposta direta a variações ambientais, incluindo a temperatura, pressão e intensidade de luz. Estes EPSs afetam o modo pelo qual os micro-organismos interagem com o ambiente externo sendo este ambiente líquido ou sólido. Os micro-organismos são frequentemente associados a um biofilme que normalmente apresentam alta densidade celular (OTERO & VINCENZINI, 2003; DONOT et al., 2012). Em um biofilme encontram-se micro-organismos de diversas espécies e taxa, inclusos numa matriz que consiste de uma mistura de compostos poliméricos, principalmente polissacarídeos, geralmente a substância polimérica é referida como extracelular (EPS) (SUTHERLAND, 2001). A formação de biofilmes é um pré-requisito para a existência de todos os agregados microbianos como um passo essencial para a sobrevivência de populações de bactérias. A proporção de EPS em biofilmes pode compreender entre cerca de 50-90% do total de compostos orgânicos (DONLAN, 2002; HULLEBUSCH et al., 2004; VU et al., 2009).

Exopolissacarídeos microbianos (EPS) apresentam papéis importantes, incluindo a proteção contra fagocitose, predação, dessecação, formação de biofilme, pode servir como fator aderente à superfície, estabilizadores de enzimas e armazenamento de nutrientes (CHI & ZHAO, 2003; CHI & FANG, 2005). Além disso, a presença de uma camada de polissacarídeo gelificado ao redor da célula pode ter efeitos primordiais sobre as propriedades de difusão, tanto para o interior quanto para o exterior da célula (KUMAR et al., 2007 *apud* DUDMAN, 1977).

EPS bacterianos ocorrem geralmente em duas formas: como polissacarídeos capsulares (CPS), onde os polímeros são ligados covalentemente à superfície da célula, e como polissacarídeos ou lodo que permanecem aderidos (fracamente ligada) na superfície celular ou são encontradas no meio extracelular (KUMAR et al., 2007; POLI et al., 2010 *apud* SUTHERLAND, 1982).

Muitas bactérias, que são capazes de produzir EPS são descritas como produtoras de homo ou heteropolissacarídeos (KWON et al., 1994). Na produção de EPS por bactérias Gram-negativas, a estrutura de muitos polissacarídeos é relativamente simples, formados de homopolissacarídeos (normalmente polímeros compostos de D-glicose) ou heteropolissacarídeos, sendo que este é normalmente composto de unidades repetidas e alinhadas desde dissacarídeos até octassacarídeos, compostos de dois a

quatro tipos de monossacarídeos diferentes e muitos contêm grupos acetila e piruvato (SUTHERLAND, 2001).

Devido à ampla diversidade em estrutura e propriedades físicas, os polissacarídeos microbianos possuem muitas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas entre outras. Algumas dessas aplicações, a depender de sua estrutura química, incluem seu uso como emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filmes, espessantes e agentes suspensores. Na indústria de alimentos a preferência por biopolímeros microbianos deve-se principalmente às suas propriedades e características funcionais, que estão relacionadas à capacidade de espessar, de manter partículas em suspensão e reter água, somadas às vantagens de uma produção independente das condições climáticas e sob condições controladas (LOPES & ANDRADE, 1995; KUMAR et al., 2007).

Uma área em crescimento na biotecnologia é a aplicação de micro-organismos e seus EPSs na remediação de efluentes ambientais produzidos pelas indústrias de mineração e metalurgia. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para eliminar os contaminantes do meio ambiente e para reduzir a quantidade de lixo tóxico que entra no ambiente a partir destas indústrias. Nas últimas décadas, o uso de micro-organismos nas técnicas de remediação aumentou devido à sua eficiência e as suas vantagens econômicas associadas em relação aos métodos de tratamento físicos químicos tradicionais (GADD, 2004; SINGH et al., 2006; VU et al., 2009).

Apesar de apenas alguns exopolissacarídeos microbianos já estarem disponíveis comercialmente, como a xantana, que é um produto bem estabelecido. Até 1998, mais de 1600 patentes sobre produção e aplicações de xantana foram registradas somente nos EUA. A xantana foi aprovada para uso alimentar pela *Food and Drug Administration* EUA em 1969 e recebeu a aprovação por parte da União Europeia no âmbito do número E-415 em 1980 (BECKER, et al., 1998)

A produção pode ter um custo elevado devido à possibilidade da bactéria ser patogênica, a qualidade do produto pode ser dificilmente mantida e garantida ou o produto pode não alcançar aceitabilidade. Apesar desses problemas, alguns polissacarídeos de bactérias Gram-negativas são economicamente viáveis e bastante utilizados, como a xantana e a gelana (SUTHERLAND, 2001).

Alguns EPSs bacterianos podem substituir diretamente polissacarídeos extraídos de plantas (por exemplo, goma de guar ou pectina) ou algas (por exemplo, carragenana ou alginato) em aplicações tradicionais (FIALHO et al., 2008; REHM, 2009; FREITAS et al., 2011).

Um grande número de polissacarídeos bacterianos é potencialmente útil, mas apenas alguns dos recentes EPSs bacterianos descobertos, relatados nas últimas décadas, surgiram como biopolímeros industrialmente importantes com valor comercial significativo, particularmente na utilização como biomateriais (ex. celulose bacteriana) (CHAWLA et al., 2008; REHM, 2009; FREITAS et al., 2011) ou como modificadores da reologia de sistemas aquosos (goma xantana) (IMESON, 2010).

3.2 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE EPS DE AMBIENTE MARINHO

Nos últimos anos, EPSs microbianos marinhos têm atraído a atenção, especialmente para aqueles originados a partir de bactérias marinhas (COLLIEC-JOUAULT et al., 2004). Micro-organismos marinhos muitas vezes produzem substâncias bioativas com novas funções e estruturas devido às condições especiais do seu habitat (FENICAL, 1993; GUO et al., 2010). EPSs microbianos são abundantes no meio ambiente marinho, por exemplo, no gelo e porções de oceano, onde eles podem auxiliar as comunidades microbianas a suportar condições extremas de temperatura, salinidade e nutrientes limitados (NICHOLS et al., 2005). Eles constituem uma grande parte do reservatório de carbono no oceano e aumentam a sobrevivência de bactérias marinhas que influenciam o ambiente ao redor da célula bacteriana (POLI et al., 2010). Novos EPSs microbianos marinhos com composições químicas, estruturas e propriedades únicas demonstraram serem apropriados para aplicações potenciais, tais como espessante, agentes estabilizantes, antioxidantes naturais, drogas anticâncer, bioabsorventes (YE et al., 2012)

Estudos de crescimento bacteriano nos sedimentos marinhos, agregados e partículas de detritos demonstraram que quase todas as células estão rodeadas por material polimérico extracelular e muitas destas células estão dentro de biofilmes aderentes (DECHO, 1990). Várias macromoléculas, tais como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, formam a matriz arquitetônica no espaço

extracelular de biofilmes microbianos e agregados acoplados no ambiente marinho. Bactérias em agregados marinhos apresentam vantagem em comparação às células de vida livre. Sua proximidade com outras células e superfícies, oferece oportunidades para interação e absorção de nutrientes (WINGENDER et al., 1999).

As bactérias associadas às condições de profundidade hidrotermais têm demonstrado a sua capacidade de produzir polímeros extracelulares incomuns em meio à base de carboidratos aeróbicos e, até agora, três principais produtores de EPS têm sido identificados, isto é, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* e *Vibrio*. Entretanto apenas alguns polímeros foram completamente caracterizados, mas informações relacionadas com as composições químicas e as propriedades reológicas ou de capacidade de ligação foram determinadas. A maior parte deles têm teores de ácidos urônicos entre 10% e 40% e altas massas moleculares, maior que 10^6 Da (GUEZENNEC, 2002). Além destes três gêneros há relatos de produção de EPS por *Bacillus sp.*, *Halomonas sp.*, *Planococcus sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Cyanobacteria*, *Hyphomonas* cepa MHS-3, *Flavobacterium uliginosum*, *Desulfovibrio sp.*, *Pseudomonas sp.* (SATPUTE et al., 2010)

Sayem et al. (2011) relataram que um EPS recentemente identificado de peso 1800 KDa com unidades monoméricas simples de α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerol-fosfato, exerce uma atividade antibiofilme contra duas cepas patogênicas e não-patogênicas sem efeitos bactericidas (bacteriostático). Este polissacarídeo foi extraído a partir de um *Bacillus licheniformis* associado com o organismo marinho *Spongia officinalis*. Arena et al., 2006 também relatou um novo tipo de polissacarídeo, EPS-1 produzido por *Bacillus licheniformis* termotolerantes, com efeitos antivirais e imunomoduladores isolado a partir de um banco de areia marinha da Ilha Volcano (Itália).

Outro EPS descrito por Urai et al. (2007) extraído de um isolado marinho *Rhodococcus erythropolis* PR4 produz uma grande quantidade de EPSs ácidos (FR1 e FR2). O FR2 é composto de D-galactose, D-glucose, D-manose, ácido D-glucurônico, e ácido pirúvico a uma razão molar de 1:1:1:1:1, e continha 2,9% (w / w) ácido esteárico e de 4,3% (w / w) de ácido palmítico ligado através de ligações éster. Foi proposto que o EPS desempenha um papel significativo na tolerância a hidrocarbonetos desta bactéria.

Dois polissacarídeos extracelulares solúveis em água, ETW1 e ETW2, foram isolados a partir da bactéria marinha *Edwardsiella tarda*. Com pesos moleculares de cerca de 29 e 70 kDa, respectivamente. A cadeia principal dos polissacarídeos consiste de ligada a resíduos de manose ligados em 1 – 3, com ramificações de manose. ETW1 e ETW2 apresentam atividade antioxidante, e que poderiam ser uma fonte potencial de antioxidante, usado como possível complemento ou ingrediente alimentar e na indústria farmacêutica (GUO et al., 2010).

Cyanothece sp. 113, cianobactéria marinha, unicelular, aeróbica, diazotrófica e fotossintética, produziu 22,34 g.L⁻¹ de exopolissacarídeo em 11 dias a 29 ° C, com taxa de arejamento de 7,0 L.min⁻¹ e iluminação contínua com 4300 lux. Após purificação, os espectros de UV, IV, RMN de ¹H, RMN ¹³C e análise de GC-MS mostraram que o exopolissacarídeo purificado foi α -D-1,6-homoglucano. Este é o primeiro relato descrevendo exopolissacarídeo linear α -D-1,6-homoglucano produzido por cianobactérias marinhas (CHI et al., 2007).

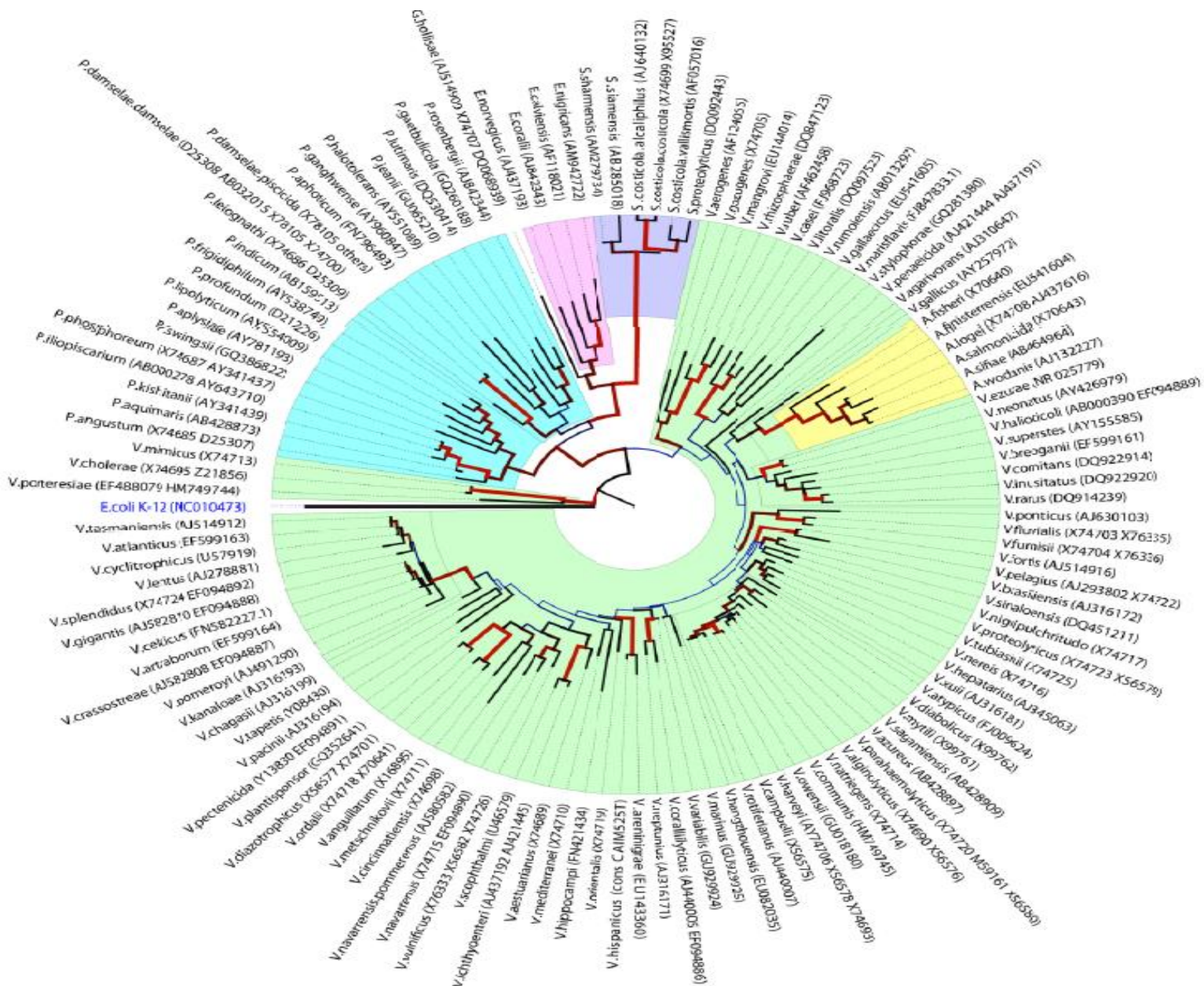
A bactéria *Zoogloea sp.*, isolada a partir de ambiente marinho, pode produzir dois polissacarídeos diferentes. Um polissacarídeo solúvel em água: WSP 1 em meio líquido isento de células, o outro polissacarídeo ligado a células: CBP 1 foi obtido a partir da superfície da célula. Ambos polissacarídeos continham glicose, galactose e manose como componentes de açúcar, mas as suas proporções molares foram diferentes e metade dos componentes de açúcar existiam em forma de ácido urônico (KWON et al., 1994).

Ambientes marinhos extremos tais como águas rasas, alto-mar, fontes hidrotermais, nascentes de águas quentes costeiras, regiões polares, são hoje amplamente aceitos como uma enorme fonte de recursos, devido à descoberta de novos micro-organismos e compostos bioativos. Desde a descoberta da primeira bactéria de fonte hidrotermal em alto-mar em 1994, muitas outras bactérias produtoras de EPS foram isoladas a partir de tais ambientes extremos. (CHI & FANG, 2005)

3.3 O GÊNERO *Vibrio*

A família *Vibrionaceae* corresponde a bactérias Gram-negativas, em forma de bacilos, γ -proteobactérias que geralmente são móveis e possuem um metabolismo quimioheterotrófico. Os membros desta família são comuns no ambiente marinho, incluindo os estuários, águas costeiras, e sedimentos (THOMPSON et al., 2004). A família inclui sete gêneros: *Allivibrio* (6 espécies), *Enterovibrio* (4 espécies), *Salinivibrio* (6 espécies), *Catenococcus* (1 espécie), *Grimontia* (1 espécie), *Vibrio* (100 espécies) e *Photobacterium* (21 espécies) (THOMPSON et al., 2004; ROMALDE et al., 2014).

Figura 1: Relacionamento evolutivo da família *Vibrionaceae* (MANSSON et al., 2011).



Bactérias do gênero *Vibrio* ocupam habitats que vão desde o fundo do mar até ambientes aquáticos rasos, algumas espécies são importantes para os sistemas naturais, incluindo o ciclo do carbono e osmorregulação. Podem ser de vida livre, na coluna d'água ou associado ao material, em partículas. *Vibrios* são particularmente abundantes na superfície de macro-organismos marinhos, como corais, peixes, plantas marinhas, esponjas, moluscos, camarões e zooplâncton, onde formam associações comensais, simbióticas ou patogênicas (THOMPSON et al., 2004). São geralmente capazes de crescer em agar marinho e no meio seletivo tiosulfato-bile citrato sal-sacarose ágar (TCBS) e na sua maioria são oxidase positiva (THOMPSON et al., 2004). O Agar TCBS foi desenvolvido por Kobayashi et al, 1963 que modificaram o meio seletivo de Nakanishi et al, 1963 (DONOVAN & NETTEN,1995).

A cólera é uma infecção diarreica aguda causada pela bactéria *Vibrio cholerae*, que provoca doença exclusivamente em seres humanos. Embora a infecção seja geralmente leve ou assintomática, alguns pacientes apresentam diarreia aquosa profusa e vômitos, casos graves não tratados podem levar a morte devido a enorme perda de fluidos corporais. O *Vibrio parahaemolyticus* é mais frequentemente associado com gastroenterite e tem sido associado a epidemias anuais (JOHNSON et al., 2012), enquanto *Vibrio vulnificus* está mais frequentemente associado com infecções em ferimentos, com uma taxa de letalidade de até 50%.(JOHNSON et al., 2012). As espécies *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são patógenos humanos (THOMPSON et al., 2004). Estes *Vibrios* patogênicos são potenciais agentes de surtos de doenças e pandemias, nomeadamente nos países em desenvolvimento, onde o acesso à água potável é limitado, e / ou em países onde o consumo de mariscos crus ou mal cozidos é comum (JOHNSON et al., 2012).

Várias espécies de *Vibrio*, incluindo *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* e *V. fischeri*, contêm dois cromossomos circulares (THOMPSON et al., 2004). Os genes housekeeping, tais como os que expressam proteínas ribossômicas, flagelos polares, e enzimas de replicação de DNA geralmente estão localizados no grande cromossomo ChrI (~ 3 Mb), enquanto que o menor ChrII (0,8-2,4 Mb) contém genes acessórios relacionados com a regulação da transcrição, por exemplo, patogenicidade e resistência antimicrobiana, mecanismos de prevenção e genes necessários para sobrevivência em uma variedade de condições

ambientais. Genes que codificam metabolismo da quitina e *quorum sensing* são divididos entre os dois cromossomos. Transferência horizontal de genes está envolvida na flexibilidade genética de *Vibrios*, incluindo a transdução por fagos, plasmídeo e os chamados "super-integrans" (ROWE-MAGNUS et al., 1999; TAGOMORI et al., 2002; GRIMES et al., 2009; HAZEN et al., 2010; MANSSON et al., 2011).

Mansson et al. (2011) elaboraram uma tabela para mostrar os inúmeros compostos secundários bioativos produzidos por *Vibrio sp.* (Tabela 1). Esses organismos além de produzirem EPS são capazes de produzirem antibacterianos, sideróforos, compostos anticâncer, bloqueadores de canais de Na⁺, inibidor de riboflavina sintase, entre outros. Como os *Vibrios* tem vários estilos de vida, a produção de metabólitos secundários muitas vezes confere uma vantagem seletiva para o organismo que o produz, e os diversos estilos de vida destas bactérias são refletidos em sua capacidade metabólica (FIRN & JONES, 2009; MASSON et al., 2011). Dessa forma, esses organismos mostram potencial para uso biotecnológico.

Tabela 1. compostos secundários bioativos produzidos pela família Vibrionaceae (MANSSON et al., 2011)

Bioactivities	Name	Compound class	Source	Other activities	Ref.
Antibacterial	Andrimid (4)	Pyrrolidinedione	<i>V. coralliilyticus</i>		[45,46]
	Aqabamycin A (6)	Nitro maleimide	<i>Vibrio</i> sp.	Anticancer	[47,48]
	Aqabamycin B (7)				
	Aqabamycin C (8)				
	Aqabamycin D (9)				
	Aqabamycin E (10)	Maleimide oxime			
	Aqabamycin E' (11)				
	Aqabamycin F (12)				
	Aqabamycin G (13)	Nitro maleimide			
	B-4607-C	Phenazine	<i>Vibrio</i> sp.		[49]
	Cycloprodigiosin (15)	Prodiginine	<i>V. gazogenes</i>		[50]
	3,5-Dibromo-2-(3',5'-dibromo-2'-methoxyphenoxy)-phenol	Diphenyl ether	<i>Vibrio</i> sp.	Antifungal	[51,52]
	2,2-Di-(3-indolyl)-3-indolone	Indole	<i>V. parahaemolyticus</i>		[53,54]
	Griseoluteic acid	Phenazine	<i>Vibrio</i> sp.		[49]
	Holomycin (5)	Pyrrrothine	<i>P. halotolerans</i>		[45]
	Indazole-3-carbaldehyde	Indazole	<i>Vibrio</i> sp.	Anticancer	[47]
	Magnesidin A (16)	Tetramic acid Mg ²⁺ salt	<i>V. gazogenes</i>	Antialgal	[55]
	Moiramide B	Pyrrolidinedione	<i>Vibrio</i> sp.		[56]
	Ngercheumicin A (19)	Depsipeptide	<i>Photobacterium</i> sp.		
	Ngercheumicin B (20)				
	Ngercheumicin C (21)				
	Ngercheumicin D (22)				
	Ngercheumicin E (23)				
	Pelagiomycin C	Phenazine	<i>Vibrio</i> sp.	Anticancer	[49,58,59]
	Prodigiosin (14)	Prodiginine	<i>V. psychroerythrus</i> <i>V. gazogenes</i> <i>V. ruber</i>	Antiprotozoan antifungal anticancer	[60–62]
	Turbomycin	Indole	<i>Vibrio</i> sp. (<i>V. parahaemolyticus</i>)	Antifungal	[54]
Unnarmicin A (17)	Depsipeptide	<i>Photobacterium</i> sp.	Antifungal	[63]	
Unnarmicin C (18)					
Vibrindole A	Indole	<i>V. parahaemolyticus</i>	Antifungal	[53]	

Retirado de Mansson et al., 2011.

Bioactivities	Name	Compound class	Source	Other activities	Ref.
Siderophore	Anguibactin (24)	Catechol hydroxamate	<i>V. anguillarum</i>	Anticancer	[64,65]
	Aerobactin	Hydroxamate	<i>Vibrio</i> sp.		[66]
	Amphibactin B	Hydroxamate (amphiphilic)	<i>Vibrio</i> sp.		[67]
	Amphibactin C				
	Amphibactin D				
	Amphibactin E				
	Amphibactin F				
	Amphibactin G				
	Amphibactin H				
	Amphibactin I				
	Bis-[3-(2,3-dihydroxy-benzoylamino)-propyl]-amin				
	Bisucaberin (29)	Hydroxamate	<i>V. salmonicida</i>	Anticancer	[69,70]
	Divanchrobactin	Catechol	<i>Vibrio</i> sp.		[65]
	Fluvibactin (28)	Catechol Hydroxyphenyl-oxazolone	<i>V. fluvialis</i>		[66]
	Trivanchrobactin	Catechol	<i>Vibrio</i> sp.		[65]
Vanchrobactin (25)	Catechol	<i>V. anguillarum</i>		[71]	
Vibriobactin (27)	Catechol Hydroxyphenyl-oxazolone	<i>V. cholerae</i>		[72]	
Vibrioferrin	Carboxylate	<i>V. parahaemolyticus</i>		[73]	
Vulnibactin (26)		Catechol Hydroxyphenyl-oxazolone	<i>V. vulnificus</i>		[74]
	Vulnibactin 2	Vulnibactin precursor			
	Vulnibactin 3				
Anticancer	Kahalalide F (30)	Depsipeptide	<i>V. mediterranei</i> (<i>V. shilonii</i>)	Antibacterial antimalarial antifungal	[75]
	Kahalalide H				
	Kahalalide J				[76]

Retirado de Mansson et al., 2011.

Bioactivities	Name	Compound class	Source	Other activities	Ref.
Quorum sensing interference	AI-2 (3)	Furanosyl borate diester	<i>Vibrio</i>	QS	[76]
	<i>N</i> -hexanoyl-L-homoserine lactone	Homoserine lactone	<i>V. anguillarum</i>	QS	[77]
	<i>N</i> -(3-hydroxybutanoyl)-L-homoserine lactone	Homoserine lactone	<i>V. harveyi</i>	QS	[78]
	<i>N</i> -(3-hydroxyhexanoyl)-L-homoserine lactone	Homoserine lactone	<i>V. anguillarum</i>	QS	[79]
	[1-(2'-methylpropoxy)-2-hydroxy-2-methyl-propoxy]butane (41)		<i>P. angustum</i> (<i>V. angustum</i>)	QS	[80]
	<i>N</i> -(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	Homoserine lactone	<i>V. anguillarum</i>	QS	[81]
	<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (1)	Homoserine lactone	<i>V. fischeri</i> <i>V. cholerae</i> <i>V. harveyi</i> <i>V. anguillarum</i>	QS	[17,82]
	<i>N</i> -octanoyl-L-homoserine lactone (2)	Homoserine lactone	<i>V. fischeri</i>	QS	[77]
Solonamide A (32)	Depsipeptide	<i>P. halotolerans</i>	QSI Gram pos	[83]	
Solonamide B (33)					
Na channel blocker	Anhydro-tetrodotoxin		<i>Vibrio</i> sp.		[84,85]
	4-epi-tetrodotoxin		<i>Vibrio</i> sp.		[84,85]
	Tetrodonic acid		<i>Vibrio</i> sp.		[85,86]
	Tetrodotoxin (31)		<i>V. harveyi</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>V. fischeri</i>		[84,85,87]
Riboflavin synthase inhibitor	7-hydroxy-6-methyl-8-(1-D-riboityl)lumazine	Pteridine	<i>P. phosphoreum</i>		[88]
	Photolumazine A				
	Photolumazine B				
	Photolumazine C				

Retirado de Mansson et al., 2011.

Bioactivities	Name	Compound class	Source	Other activities	Ref.
Misc.	Arundine	Indole	<i>V. parahaemolyticus</i>		[54]
	Benzoic acid	Aromatic	<i>Vibrio sp.</i>		[47]
	3,3-Bis-(3-indolyl)butan-2-one	Indole	<i>V. parahaemolyticus</i>		[54]
	3,3'-Bisindolylmethane				
	1,4-dithiane		<i>Vibrio sp.</i>		[47]
	3-hydroxybenzoic acid	Aromatic	<i>Vibrio sp.</i>		[47]
	4-hydroxycinnamic acid				
	p-Hydroxyphenyl-acetamide	Aromatic	<i>V. parahaemolyticus</i>		[54]
	Indole-3-carboxaldehyde	Indole	<i>V. parahaemolyticus</i>		[53]
	Indole-3-acetic acid	Indole	<i>Vibrio sp.</i>		[89]
	6-methyl-8-D-ribityl-2,4,7-trioxopterin	Pteridine	<i>P. phosphoreum</i>		[90]
	3-nitro-4-hydroxy-benzaldehyde	Nitro aromatic	<i>Vibrio sp.</i>		[47]
	3-nitro-4-hydroxycinnamic acid				
	3-nitro-1 <i>H</i> -indazole				
	Pharacine (43)	Terephthalic ester	<i>V. parahaemolyticus</i>		[54]
	Phenylacetic acid	Aromatic	<i>Vibrio sp.</i>		[47]
	Phenyl-2-bis-indolylmethane	Indol			
	Photopterin A	Pteridine	<i>P. phosphoreum</i>		[90]
	8-D-ribityl-2,4,7-trioxopterin				
	Trisindoline	Indole	<i>V. parahaemolyticus</i>		[54]
1,1,3-Tris-(3-indolyl)butane					
1,1',1''-Trisindolyl-methane (42)					

Retirado de Masson et al., 2011

3.4 EPS PRODUZIDOS POR *Vibrio sp.*

Espécies do gênero *Vibrio* são bactérias Gram-negativas presentes nos ecossistemas aquáticos (YILDIZ & VISICK, 2009; SATPUTE et al., 2010). Um trabalho realizado por Jiang et al. (2011), demonstrou que o exopolissacarídeo A101 purificado a partir de sobrenadante de cultura da bactéria marinha *Vibrio sp.* QY101, não só inibia a formação de biofilme por uma vasta variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas também interrompia os biofilmes já estabelecidos de algumas cepas. Este EPS A101 é predominantemente composto de monômeros de ácido glicurônico (21,47%), ácido galacturônico (23,05%), ramnose (23,90%) e glicosamina (12,15%). Além dos quatro monômeros abundantes, os monossacarídeos manose,

glicose, galactose e fucose também estavam presentes em A101 em baixa concentração. Este é o primeiro EPS bacteriano relatado que exibe tanto atividade de inibição da formação de biofilme, quanto atividade de ruptura de biofilme maduro.

Um trabalho de Joseph & Wright (2004), sobre a cepa clínica *V. vulnificus*, objetivou mostrar o papel da cápsula em biofilmes. A expressão do polissacarídeo capsular (CPS), que é o fator de virulência primário deste organismo, mostrou inibir a ligação e formação de biofilme, o que contrasta com outros estudos descrevendo os polissacarídeos como integrante de biofilmes em espécies relacionadas, como no estudo de Yildiz & Schoolnik (1999) onde a colônia rugosa variante de *Vibrio cholerae* O1 biótipo El Tor, é capaz de produzir um exopolissacarídeo, EPS^{ETr}, que confere resistência a clorina e auxilia na formação de biofilme.

As espécies marinhas *Vibrio campbellii* e *Vibrio fortis* produziram de EPS de composições distintas. O EPS de *V. campbellii* consistia de cinco monossacarídeos: arabinose, galactose, glicose, manose e ramnose, no entanto, o de *V. fortis* tem apenas três monossacarídeos: arabinose, galactose e manose. Esses EPSs eram de natureza amorfa e continham os picos de difração característicos. Os EPSs mostraram alta atividade emulsificante e reologia pseudoplástica. Este foi o primeiro relato de caracterização detalhada do EPS produzido por *V. campbellii* e *V. fortis*, publicado. As características biofísicas (termoestabilidade, capacidade de emulsionar e propriedades reológicas) desses EPSs mostraram potencial para aplicações industriais (KAVITA et al., 2013).

As análises químicas do EPS produzido pelo isolado estuarino *V. harveyi* cepa VB23 revelaram que este é composto principalmente de açúcares neutros, ácidos urônicos, proteínas e sulfatos. O EPS purificado revelou grupos funcionais reativos proeminentes, tais como hidroxila, carboxila e amidas, os quais correspondem a um polissacarídeo heteropolimérico típico, e possui boa atividade de emulsificação. A análise cromatográfica de uma amostra de EPS revelou que se tratava de uma galactoglicana. Os componentes em menor proporção encontrados foram ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose e manose (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006). O trabalho de Bramhachari et al. (2007) sobre o EPS produzido por *Vibrio furnissii* cepa VB0S3 apresentou as mesmas características deste EPS de *V. harveyi* cepa VB23.

Chalkiadakis et al. (2013) propuseram o nome *Vibrio neocaledonicus sp. nov* para o isolado NC470 isolada de um biofilme encontrado no invertebrado Holothuroidea na baía de St Vicente, este apresentou produção de um EPS com uma composição de açúcar incomum. Este EPS apresenta um alto teor de N-acetil-hexosaminas e de ácido urônico, com uma baixa quantidade de açúcar neutro, com massa molecular de 672 KDa.

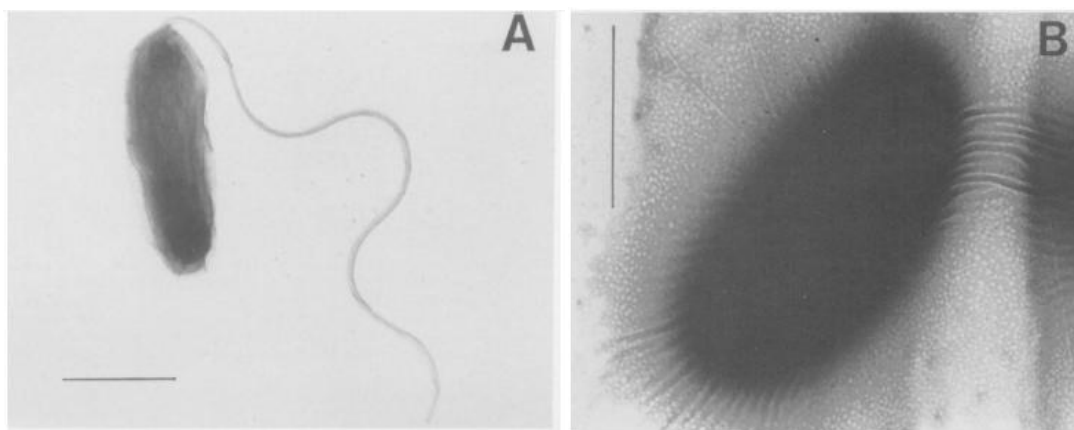
Um estudo feito sobre o EPS produzido por *Vibrio alginolyticus* revelou grupos de características proeminentes de álcoois poli-hídricos. Quando os acetatos de alditol derivados do EPS foram separados por cromatografia em fase gasosa, cinco picos correspondentes a glicose tetra-acetato, xilopirranose tetra-acetato, aminoarabinose tetra-acetato, aminoribose tetra-acetato e glicose penta-acetato, foram observados. A Espectrofotometria de massa do EPS revelou a presença de glicose, aminoarabinose, aminoribose e xilose em que a razão molar de 2:1:9:1. Estudos reológicos do EPS aquoso mostrou característica pseudoplástica. No entanto, o EPS era instável a altas temperaturas e pH elevado (MURALIDHARAN & JAYACHANDRAN, 2003).

Enos-Berlage & McCarter., (2000) realizaram um estudo com o objetivo de determinar o fator responsável pelos fenótipos opacos e translúcidos em *Vibrio parahaemolyticus* e examinar a organização celular colônias. O EPS foi extraído de cepas de ambos os tipos de colônias, opacas e translúcidas, e a estirpe opaca, demonstrou que produz níveis abundantes de polissacarídeo, em contraste com a cepa translúcida. Análise da composição dos EPS identificou quatro principais açúcares: glicose, galactose, fucose e N-acetilglucosamina. Eles também observaram que a abundante quantidade do EPS produzido pela cepa opaca enche o espaço intercelular da colônia, o que resulta em aumento da integridade estrutural deste fenótipo.

Vibrio diabolicus, (Figura 1) uma espécie isolada a partir de uma fonte hidrotermal de mar profundo do Pacífico Leste, apresentou na estrutura do EPS produzido a presença de unidade de repetição linear de um tetrassacárido (ROUGEAUX et al., 1999). Raguenees et al. (1997) relataram a produção de EPS contendo diferentes açúcares como a glicose, a galactose, a manose, e ácidos glicurônico e galacturônico das espécies de *Vibrio* isoladas de fontes hidrotermais de alto-mar. Uma patente de Guezennec et al. (2002) protege a utilização de *V. diabolicus* para a produção e uso de

polissacarídeos solúveis em água. O peso molecular dos EPS deste *Vibrio* é de 800.000 Da e composto de osaminas ($30 \pm 5\%$), ácidos urônicos ($32 \pm 5\%$) e monossacarídeos como ácido glicurônico (11,2%), N-acetil-glucosamina (18%), e N-acetilgalactosamina (7,9%). O EPS é semelhante à da heparina e, portanto, encontra aplicações importantes na indústria farmacêutica.

Figura 2: Micrografias obtidas por microscopia de transmissão de *V. diabolicus*: cultivados em meio Zobell líquido (A) e em meio Zobell sólido (B)



Fonte: (ROUGEAUX et al., 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

Os locais de coleta foram às praias arenosas da Baía de Todos os Santos (Inema, Base Naval de Aratu, Madre de Deus, Ribeira e Jiribatuba). Em cada uma das praias estabeleceu-se dois setores, perpendiculares a linha d'água, do qual foram fixados dois estratos. Em cada um dos estratos coletou-se uma amostra de sedimento, resultando quatro amostras de sedimento por praia.

4.2 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

As amostras de sedimento marinho das praias foram coletadas em tubos tipo Falcon de 50 mL, estéril e transportados para o Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprospecção localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS), UFBA. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em um béquer estéril, no qual se

pesou 10g dos sedimentos que foram colocados em um frasco de vidro do tipo Shot contendo 100 mL de água do mar estéril, totalizando cinco amostras compostas. Após 24 horas em temperatura ambiente, realizou-se a diluição seriada, retirando-se uma alíquota de 1,0 mL para um tubo de ensaio médio contendo 9,0 mL de solução salina, até a diluição 10^{-6} . Alíquotas de 100 μ L das diluições foram inoculadas como auxílio de alça Drigalski em placas de Petri descartáveis contendo meio de cultura marinho Zobell (Anexo I). Ao final da diluição, incubou-se o material em estufa a 30°C.

4.3 MICRO-ORGANISMOS

Foram isolados 70 micro-organismos, destes 5 linhagens bacterianas foram utilizadas neste trabalho e depositadas na Coleção de Culturas de Micro-organismos do Instituto de Ciências da Saúde (CCMB) com os seguintes códigos: CCMB 01, 17, 18, 22, 65. Os isolados foram triados em meio seletivo para *Vibrio sp.* TCBS Agar (KOBAYASHI et al., 1963), foram testados em meio Agar Nutriente e realizada a coloração de Gram.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS

Cada linhagem bacteriana foi inoculada em meio líquido *Luria Bertani* e incubadas à 30°C por 24 horas, para seguir com a extração do DNA bacteriano. A extração de DNA foi realizada através do kit Wizard Genomic DNA Purification.Promega® e o DNA amplificado por PCR em termociclador The Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied) através do kit Taq DNA Polymerase, Brasil (Life Technologies™). O PCR foi realizado com os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universais de Eubacteria *8F* (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e *1391R* (5' GACGGGCGGTGTGTRCA3'). A qualidade do DNA extraído e amplificado foi observado em gel de agarose 1% e 2% (m/v), respectivamente, utilizando o Sybr safe (Life Technologies™) para visualização das bandas de DNA.

Após amplificação dos fragmentos de DNA obtidos, os mesmos foram purificados utilizando a enzima *illustra™ ExoproStar™ 1-step* (GE Healthcare Life Sciences), conforme protocolo do fabricante. Em seguida, o DNA foi avaliado em gel de agarose

com auxílio do marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Life Technologies™) para posterior sequenciamento

4.5 CULTIVO, PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DO EPS.

4.5.1 Cultivo dos Micro-organismos

As linhagens bacterianas foram inoculadas em meio de cultura Zobell e Meio “Água do mar nutriente modificado” (SWN) (1000 mL; 10 g de extrato de carne; 10 g de peptona) por 24 horas à temperatura de 30°C, sob agitação de 120 rpm em agitador rotativo (Shaker Tecnal, TE-424).

4.5.2 Produção de EPS

Após crescimento nos meios de cultura mencionados acima, a produção do EPS foi realizada em triplicata, utilizando três variáveis de meios de produção. Os isolados foram inoculados em: Zobell suplementado com 10g de glicose (CHALKIADAKIS, et al., 2013); SWN modificado (MURALIDHARAN & JAYACHANDRAN, 2002) sem glicose; e SWN modificado com glicose (1%). O inóculo bacteriano foi ajustado para a concentração de 10^8 UFC. e preparado para a inoculação nos de meios de produção a 2% v/v, posteriormente incubado por 72 h, 30°C, 180 rpm em agitador rotativo (Shaker Tecnal, TE-424). Os inóculos foram preparados em 25 mL de meio em *erlenmeyer* de 125 mL.

4.5.3 Extração do EPS

Depois da produção do EPS, as amostras foram centrifugadas a 8000 xg, 4°C por 10 min. Depois da centrifugação, acrescentou-se ao sobrenadante etanol a 4°C na proporção de 3:1(v/v). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C por 12 horas (overnight). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 xg, a 4°C por 15 minutos, de acordo com a metodologia de Muralidharan & Jayachandran (2002). O EPS extraído foi seco em estufa a 40°C e câmara de dessecação, em seguida o EPS foi pesado e armazenado para análises posteriores.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO EPS

Os EPSs analisados foram provenientes do meio de cultura SWN sem adição de glicose devido ao alto rendimento e baixo custo. Os testes foram realizados com as amostras brutas.

4.6.1 Análise por espectroscopia no infravermelho

As amostras de EPS foram analisadas sob a forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr) em espectrofotômetro (IRAffinity-1, Shimadzu). As bandas obtidas nos espectrogramas foram utilizadas na identificação dos grupos funcionais característicos dos EPSs produzidos.

4.6.2 Análise da viscosidade aparente

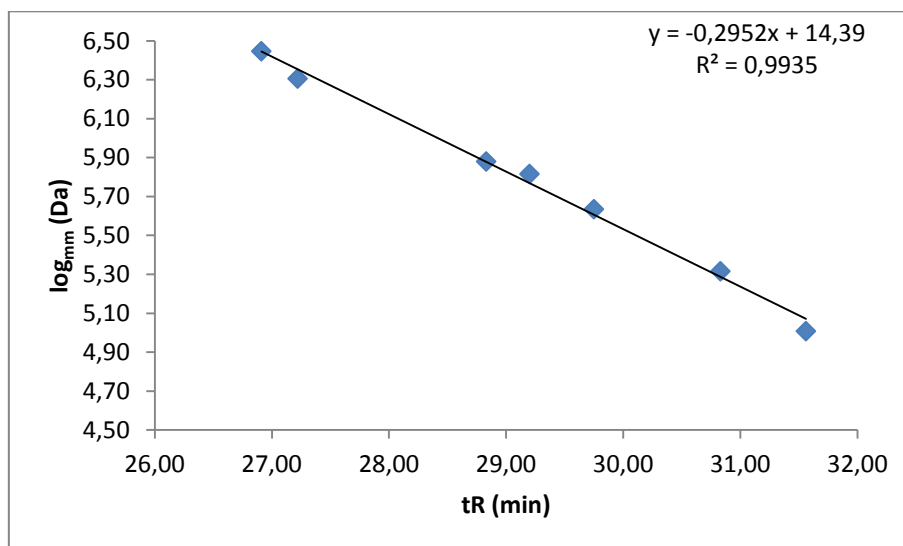
A análise foi realizada usando 16 mL das soluções dos EPSs a 0,1 % (m/v) em água destilada/deionizada a 25°C. Para a realização da análise foi utilizado o reômetro digital (Brookfield, LVDV III+), utilizou-se o adaptador spindle ULA, variando a taxa de cisalhamento de 05 a 140 s⁻¹ e a viscosidade de 0,24 a 2,40 centipoise (cP) acoplado a um banho-maria. As leituras foram realizadas a intervalos de 15 segundos e os parâmetros ajustados no *software* Rheocalc.

4.6.3 Massa Molecular por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A massa molecular dos biopolímeros obtidos foram determinadas por cromatografia de exclusão de tamanho em sistema CPC-CLAE (PerkinElmer Serie 200), utilizando colunas Shodex SB 803, 804, 805, 806 conectadas em série e acopladas a um detector IR (Índice de Refração). Solução de NaNO₃ a 0,05 M a um fluxo de 1,0 mL. min.⁻¹ foi utilizada como fase móvel do sistema. Foram injetados 20 µL das soluções aquosas (0,3% m/v) de todas as amostras separadamente. A quantificação da massa molecular dos biopolímeros foi realizada através da construção e uma curva de calibração a partir da injeção de padrões de dextrana (American Polymers Standards) com diferentes massas moleculares (102.000, 207.200, 431.800, 655.200, 759.400,

2.025.000 e 2.800.000 Da) e seus respectivos tempos de retenção ($\text{Log MM} = -0,3109 \times \text{TR} + 14,861$).

Figura 3: Curva de calibração dos padrões de dextrana em função do tempo de retenção.



4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância (ANOVA), para avaliar a influência dos cinco isolados e dos tratamentos (meios de cultura) e o teste de comparação de médias, Teste de Tukey ao nível de 1% e 5% de probabilidade, através do software ASSISTAT Versão 7.7 beta, na produção de EPS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das Linhagens

Os isolados utilizados neste trabalho foram triados em Meio de Cultura TCBS, com a seguinte característica: CCMB 17, CCMB 18, CCMB 65 e CCMB 01 apresentaram colônias e estrias amarelas (Figura 4), e CCMB 22 colônias verdes (Figura 5). O isolado CCMB 01 foi o único que apresentou crescimento em meio Agar nutriente (NA) (Figura 6).

Figura 4: Colônias bacterianas amareladas em meio TCBS, 24h de incubação à 35°C.
A: isolado CCMB 01, B: isolado CCMB 17, C: isolado CCMB 18 e D: CCMB 65.

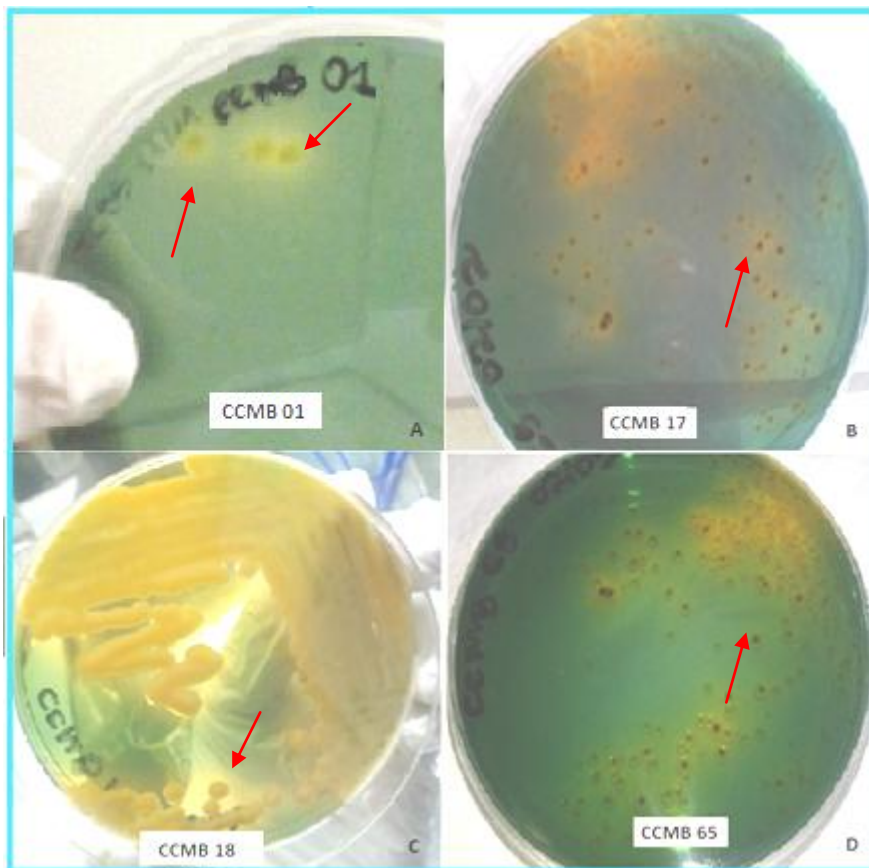


Figura 5: Colônias bacterianas verdes em meio TCBS do isolado CCMB 22, 24h de incubação à 35°C.

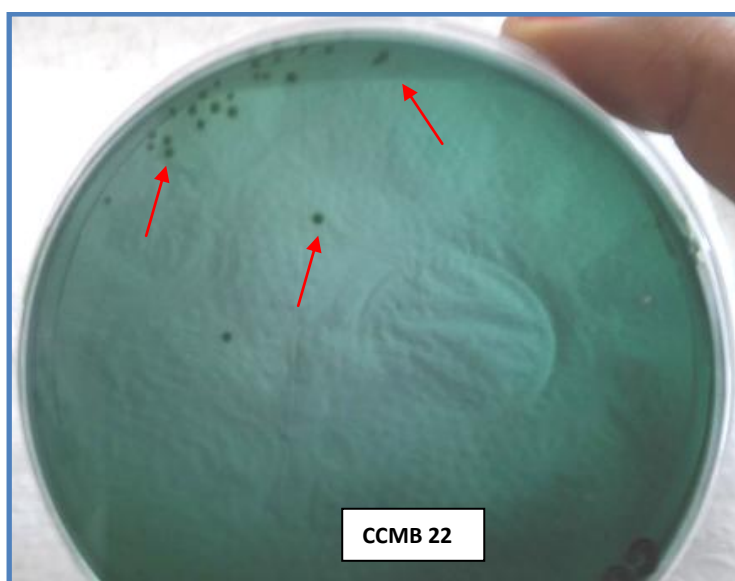
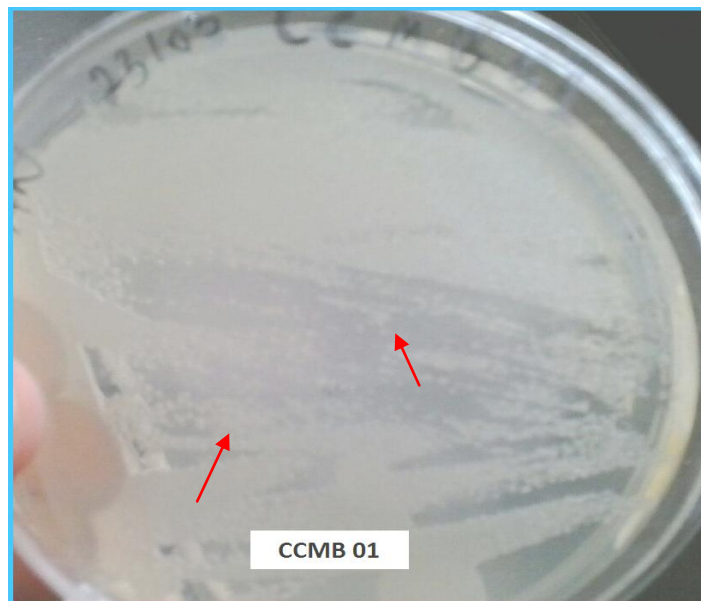


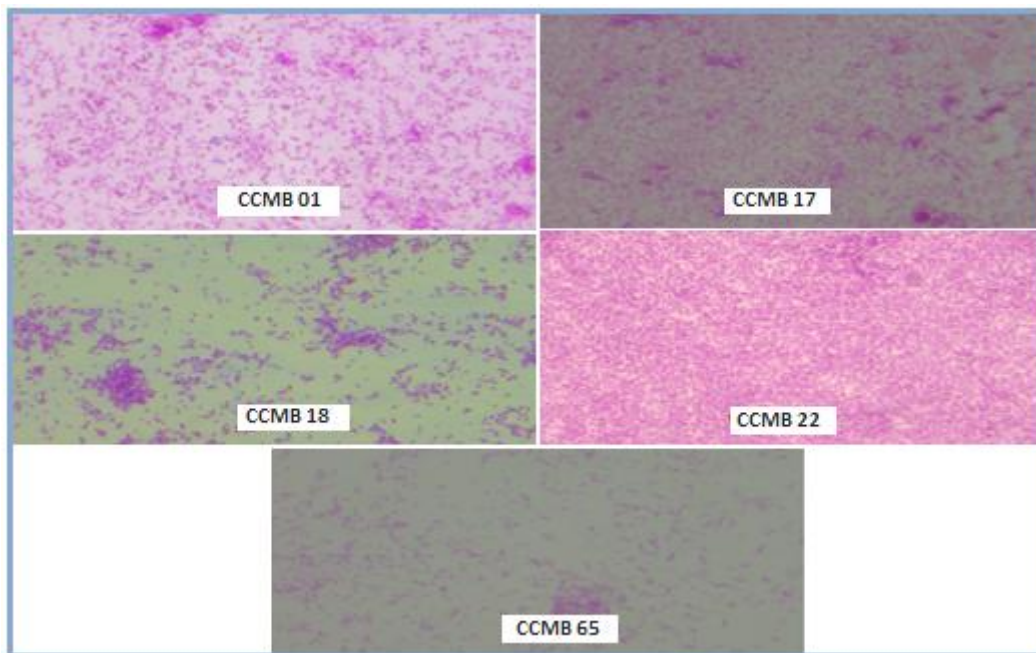
Figura 6: Colônias bacterianas do isolado CCMB 01 crescidas em meio NA, 24h de incubação à 35°C.



O resultado da coloração das colônias em meio TCBS pode ajudar na identificação de algumas espécies do gênero *Vibrio*, pois o Agar TCBS é uma forma diferencial altamente seletiva que é amplamente utilizado não só para *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*, mas para muitas espécies de *Vibrio*, apresentando diferenças morfológicas. O seu respectivo sistema seletivo consiste em bile de boi (0,8%), NaCl (1%) e pH alcalino (8.6) que suprimem o crescimento da maioria dos organismos interferentes, tais como enterobactérias e bactérias Gram-positivas (DONOVAN & NETTEN,1995 *apud* KOBAYASHI et al, 1963).

A vantagem do TCBS é seu sistema de diagnóstico sacarose/ azul de bromotimol, que facilmente distingue: vibrios sacarose-positivo que apresentam colônias amarelas como *V. cholerae* de vibrios sacarose-negativo que não fermentam a sacarose e apresentam colônias azuis/verdes como as colônias de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* (DONOVAN & NETTEN,1995). Mesmo esse meio sendo altamente seletivo para espécies de *Vibrio*, segundo a descrição do meio, ocasionalmente podem crescer *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.* ou *Proteus sp.* Sendo assim, uma análise molecular se fez necessária para uma identificação mais precisa da espécie. Todos os isolados analisados são bacilos curtos Gram-negativos (Figura 7). como indicado pela literatura (THOMPSON et al., 2004).

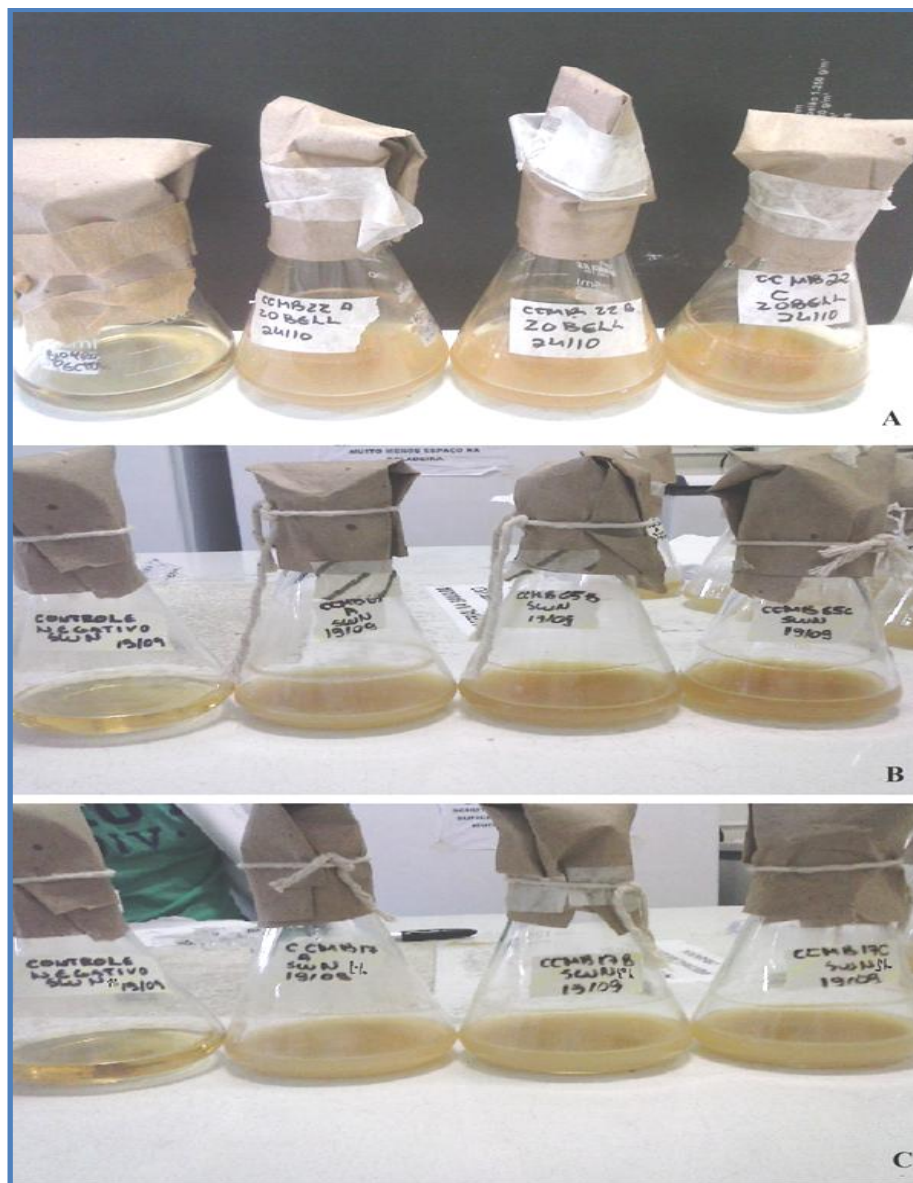
Figura 7: Resultado da coloração de Gram mostrando todos os isolados como bacilos curtos Gram-negativos.



5.2 Produção de EPS

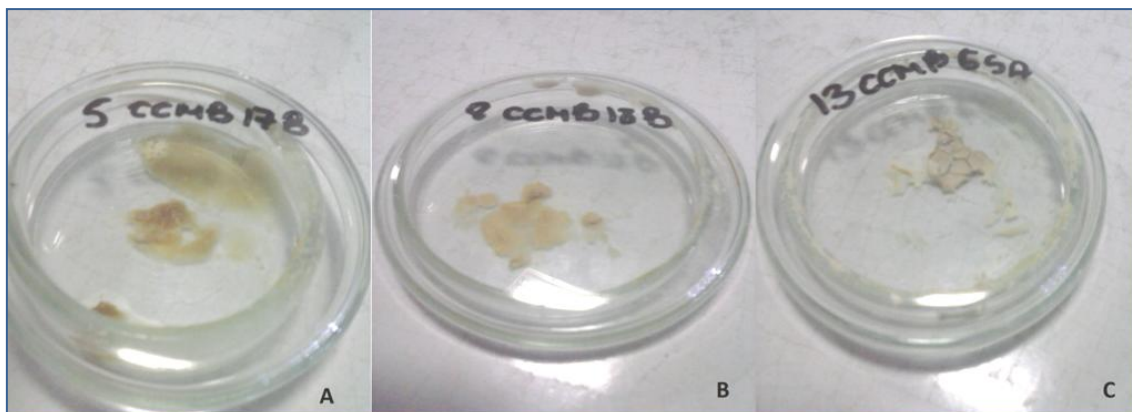
Todos os isolados apresentaram crescimento e produção nos três meios testados, Zobell, SWN sem glicose e SWN com glicose (Figuras 8 e 9), mostrando ampla adaptação a diferentes meios de cultivo.

Figura 8: Crescimento e produção de exopolissacarídeos em meio de cultura líquido A: Meio Zobell, B: Meio SWN, C: Meio SWN 1% de glicose



Controle negativo evidenciando a mudança da turbidez do meio de cultura após 72 h de crescimento.

Figura 9: Exopolissacarídeos extraídos através da técnica de precipitação em etanol dos isolados CCMB 17, CCMB 18 e CCMB65.



No meio Zobell, o isolado CCMB 18 apresentou maior produção (em média 3,94 g/L), enquanto os isolados CCMB 01 e CCMB 65 apresentaram os menores valores de produção (em média 2,71 e 2,7 (g/L), respectivamente) (Figura 10 e Quadro 1).

No meio SWN sem glicose a produção de todos os isolados aumentou de forma significativa ($p \leq 0,05$) em relação à produção obtida em meio Zobell. No meio SWN sem glicose a maior produção foi do isolado CCMB 17 (em média 7,14 g/L) e a menor foi do CCMB 18 (média de produção 5,8 g/L) (Figura 10 e Quadro 1).

Já no meio SWN com 1% de glicose, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de produção em relação ao meio SWN sem glicose, mas houve uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao Zobell (Quadro 1 e Figura 10).

Quadro 1. Média de produção dos isolados nos três meios.

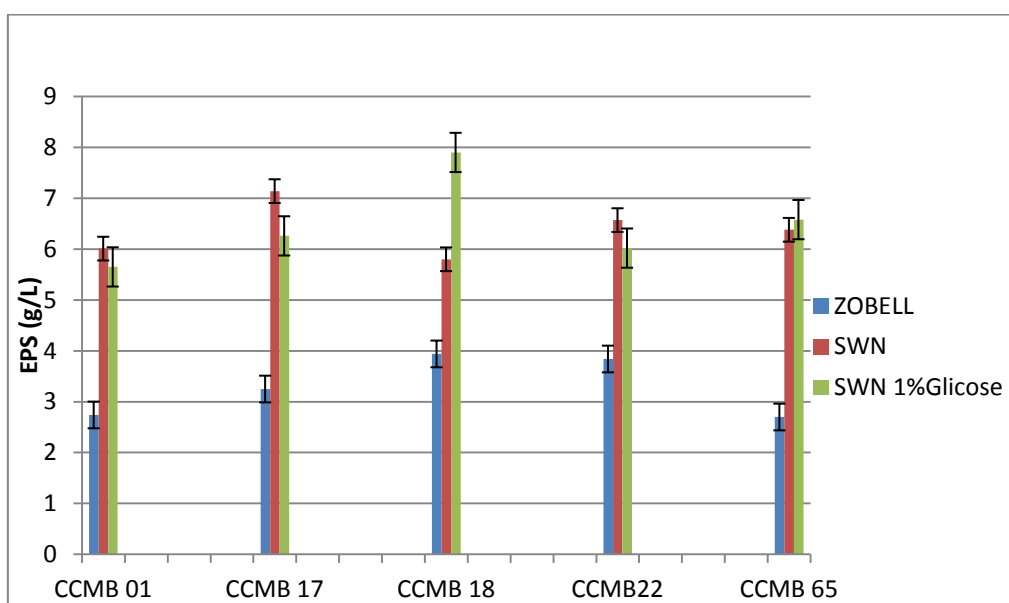
MEIOS ISOLADOS	ZOBELL (g/L)	SWN (g/L)	SWN 1% glicose (g/L)
CCMICS 01	2,74 b	6,01 a	5,65 a
CCMICS 17	3,25 b	7,14 a	6,26 a
CCMICS 18	3,94 b	5,8 a	7,9 a
CCMICS 22	3,84 b	6,57 a	6,02 a
CCMICS 65	2,7 b	6,38 a	6,58 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. A letra “a” representa os meios SWN e SWN 1% glicose e a letra “b” representa o meio Zobell.

O isolado CCMB 18 apresentou a maior produção no meio SWN 1% glicose (cerca de 7,9 g/L) enquanto o CCMB 01 apresentou a menor produção (em média 5,65 g/L). Os resultados que apresentaram diferenças significativas, Zobell em relação a SWN e Zobell em relação a SWN 1% glicose, foram analisados através do Teste de Tukey apresentando valor de $p \leq 0,05$ (p-valor 0,0001).

Mesmo sendo possível mostrar diferentes valores de produção entre os isolados nos três meios testados, não houve diferença significativa entre a produção dos isolados em cada meio segundo o Teste de Tukey onde o p-valor foi de 0,0879. Todos isolados apresentaram produção de EPS, contudo como foi observado nos resultados, o meio Zobell resultou nos menores valores de produção quando comparado com os meios SWN com e sem glicose. A diferença entre SWN e SWN com 1% de glicose não foi significativa ($p > 0,05$), demonstrando que as fontes de carbono contidas no meio são suficientes para a produção de EPS, sem a necessidade de adição de glicose, o que em escala industrial pode significar aumento no custo da produção. Estes resultados indicam que é possível diminuir o custo da produção desses EPSs, visto que a glicose não se faz necessária neste processo.

Figura 10: Produção de EPS nos três meios: Meio Zobell, Meio SWN e Meio SWN 1% com glicose de todos os isolados .



Kavita et al., 2013 obtiveram cerca de 0,4 g/L e 0,134 g/L de EPS que foi extraído de culturas de *V. campbellii* e *V. fortis* respectivamente, em meio Zobell, coletadas no Mar da Arábia. O baixo rendimento obtido por esse trabalho pode ser característico das linhagens testadas ou pelo tempo de incubação de 12 h. Hsieh et al., 2003 obtiveram um rendimento de 0,12 g/L do polissacarídeo capsular de *V. parahaemolyticus* testadas em meio BHI suplementado com 3% de NaCl após 12h de incubação. Os rendimentos do EPS obtido da cultura em batelada de *V. harveyi* foi de 0,0012 g /L após 6 h de produção e 0,00 278 g /L após 28 h de produção e não variaram muito seguido pela redução de produção de EPS após 32 h em meio salino mineral (Anexo I) (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006). A produção realizada neste trabalho foi de 72 h e obteve como rendimento mínimo de 2,71 g/L de EPS do isolado CCMB 01, e rendimento máximo de 7,9 g/L de EPS com o isolado CCMB 18. O baixo rendimento obtido citado por Bramhchari & Dubey, 2006 em comparação com os resultados deste trabalho pode ser devido à diferença na composição dos meios utilizados.

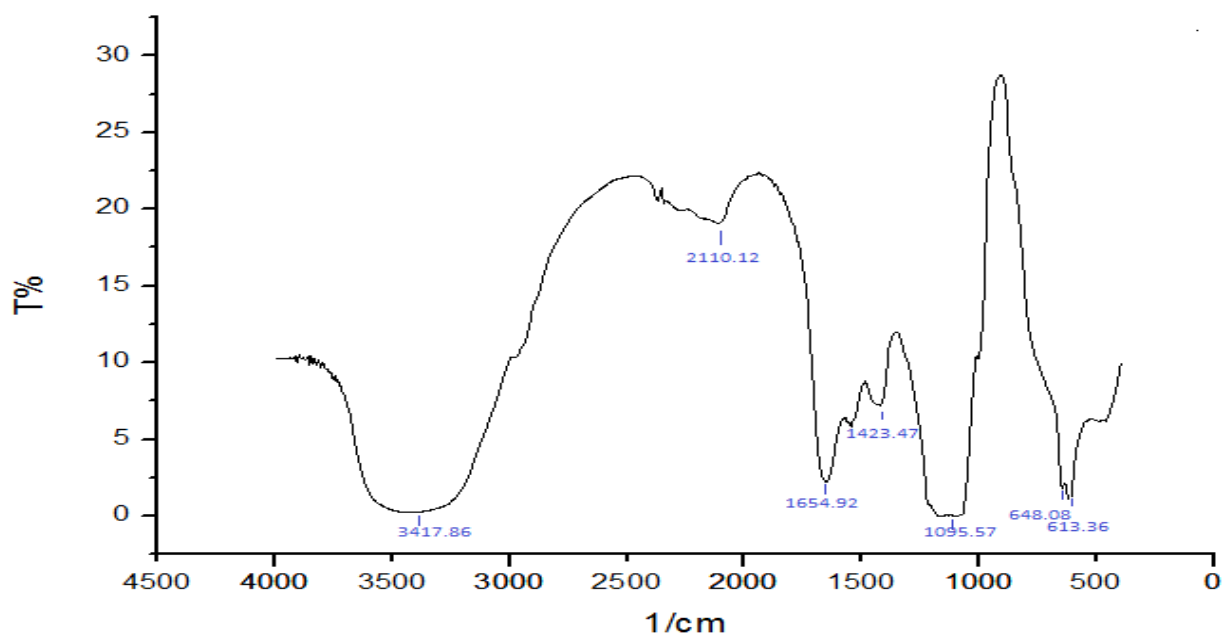
Já Chalkiadakis et al., (2013) relatam 2 g/L de EPS produzido pela espécie *V. neocaledonicus* após 72 h de experimento. Este valor foi similar aos obtidos neste trabalho visto que o autor também usou meio de cultura Zobell e o mesmo tempo de incubação. No presente trabalho ficou demonstrado que o meio Zobell não é o melhor meio para produção, pois além do alto custo, o rendimento obtido é menor do que o rendimento obtido por um meio mais simples e mais barato (SWN) do que os meios utilizados nos trabalhos citados.

5.3 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de infravermelho obtido do EPS produzido pelo isolado CCMB 01 (Figura 11) apresentou banda a 3417.89 cm^{-1} dentro da faixa de estiramento do grupo hidroxila ($3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$) (NWODO & OKOH, 2012 b), característico da presença de água. Este isolado também apresentou banda em 1654.92 cm^{-1} dentro da faixa de estiramento do grupo que pode ser de monossacarídeos como anel da galactose e manose ($1593 - 1662\text{ cm}^{-1}$) (FREITAS et al., 2009). A banda em 1095.57 cm^{-1} está dentro da faixa que pode representar o grupamento C – O presente em açúcares e ácidos urônicos ($1000 - 1125\text{ cm}^{-1}$) (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006). Bandas na faixa $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ representam carboidratos e são típicos de polissacarídeos (CAO et al.,

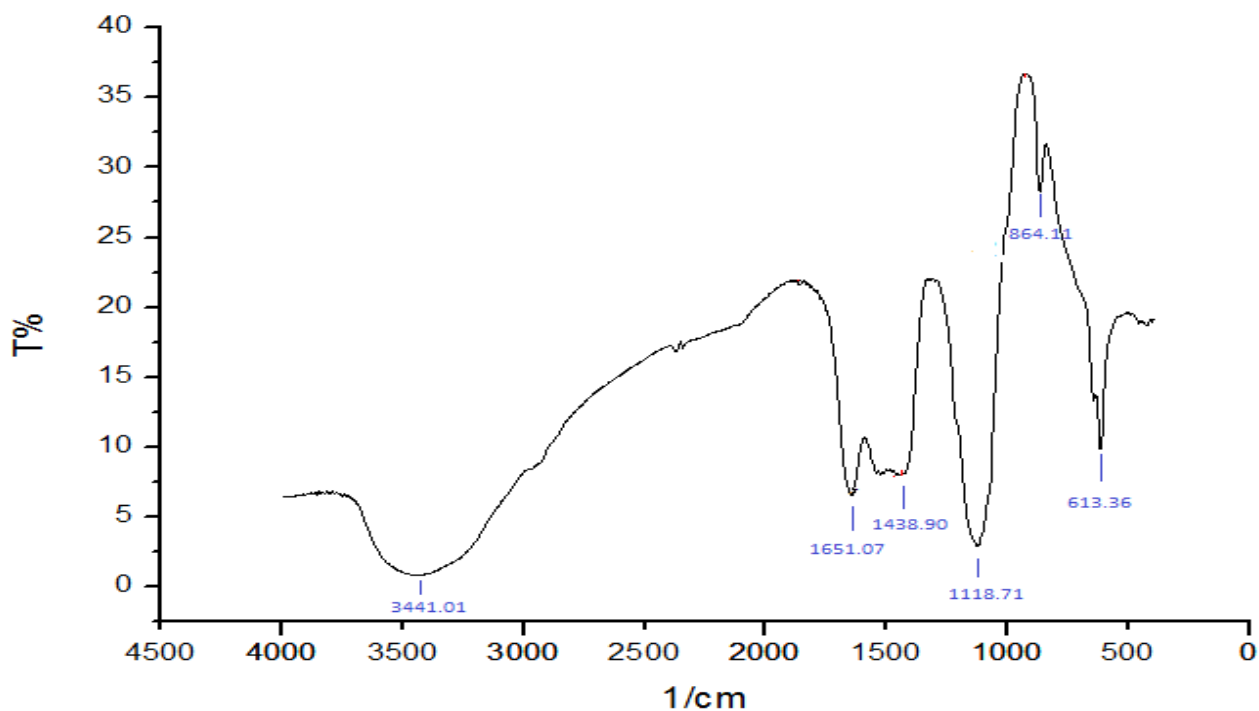
2011). Duas bandas, 648.08 e 613.36 cm^{-1} , estão dentro da faixa que pode representar o estiramento do grupo haleto de alquila (690 – 515 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009).

Figura 11: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 01.



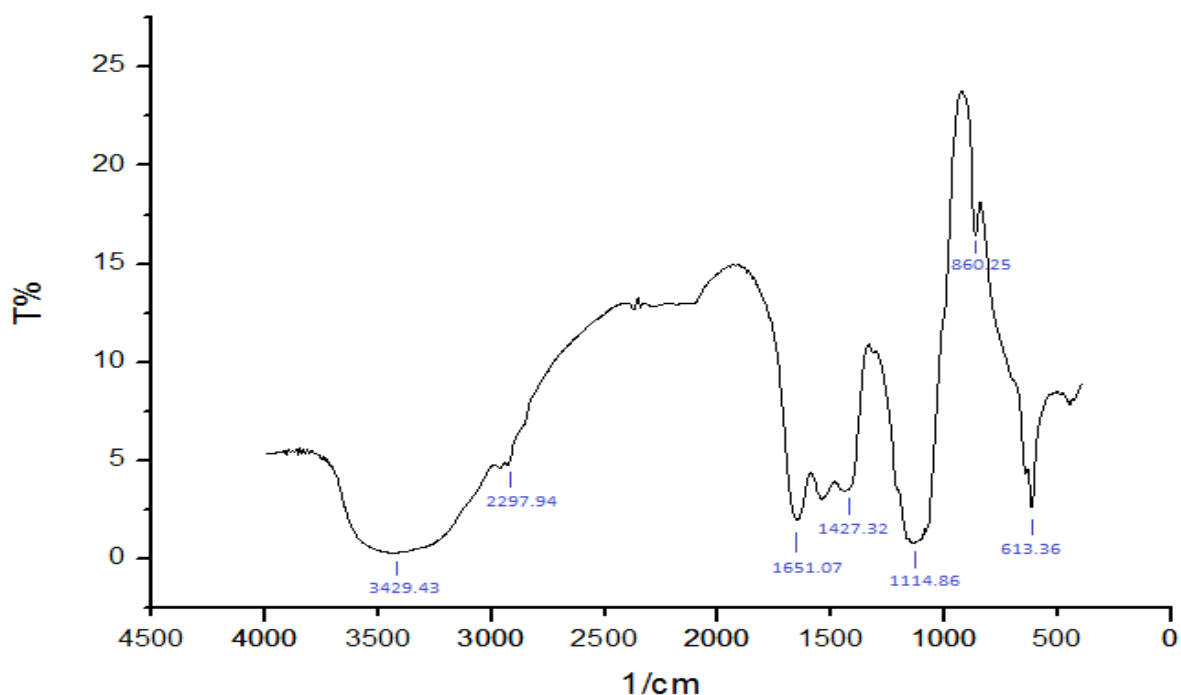
O espectro do EPS produzido pelo isolado CCMB 17 (Figura 12) também apresentou banda na região correspondente ao grupamento hidroxila (3341.01 cm^{-1}) (NWODO & OKOH, 2012 b), além deste, apresentou banda na região do estiramento do grupo que pode ser de monossacarídeos como anel da galactose e manose (1651.07 cm^{-1}) (FREITAS et al., 2009), banda em 1438 cm^{-1} dentro da faixa que pode representar estiramento C – C característico de presença de anel aromático na molécula (1400-1500 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009), banda em 1118.71 cm^{-1} que pode indicar o grupamento C – O presente em açúcares e ácidos urônicos (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006), presença flexão N – H fora do plano de amina primária que pode ser evidenciada pela banda 864.11 cm^{-1} (faixa 910-665 cm^{-1}) (KAVITA et al., 2013) e a banda em 613.36 cm^{-1} que pode representar o estiramento do grupo haleto de alquila (MISHRA & JHA, 2009).

Figura 12: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 17.



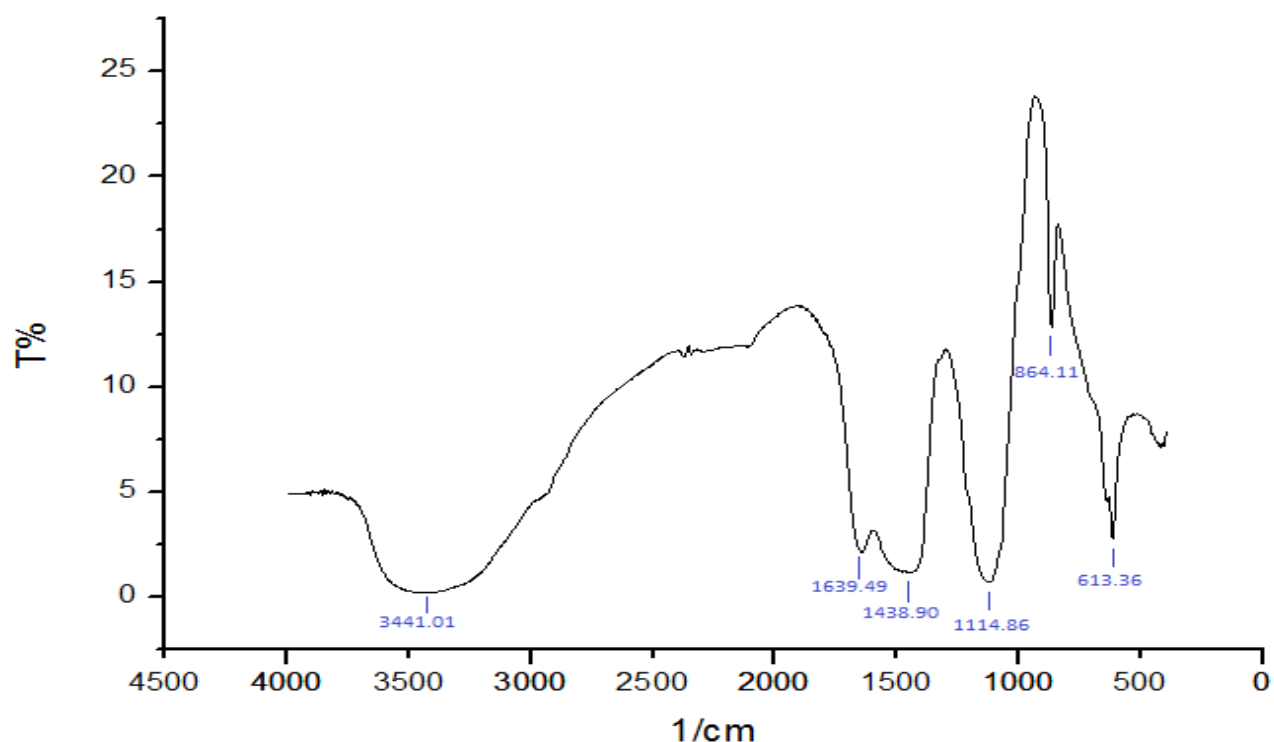
O espectro do EPS produzido pelo isolado CCMB 18 (Figura 13) também apresentou banda na região correspondente ao grupamento hidroxila (3429.43 cm^{-1}) (NWODO & OKOH, 2012 b), apresentou banda na região do grupo que pode ser de monossacarídeos como estiramento de anel de manose e galactose (1651.07 cm^{-1}) (FREITAS et al., 2009), banda 1438 cm^{-1} dentro da faixa que pode representar estiramento C – C de anel aromático presente na molécula (1427.32 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009), banda que pode representar a presença do grupamento C – O presente em açúcares e de ácidos urônicos (1114.86 cm^{-1}) (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006), presença de flexão N – H fora do plano de amina primária (860.25 cm^{-1}) (KAVITA et al., 2013) e grupo haleto alquila (613.36 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009).

Figura 13: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 18.



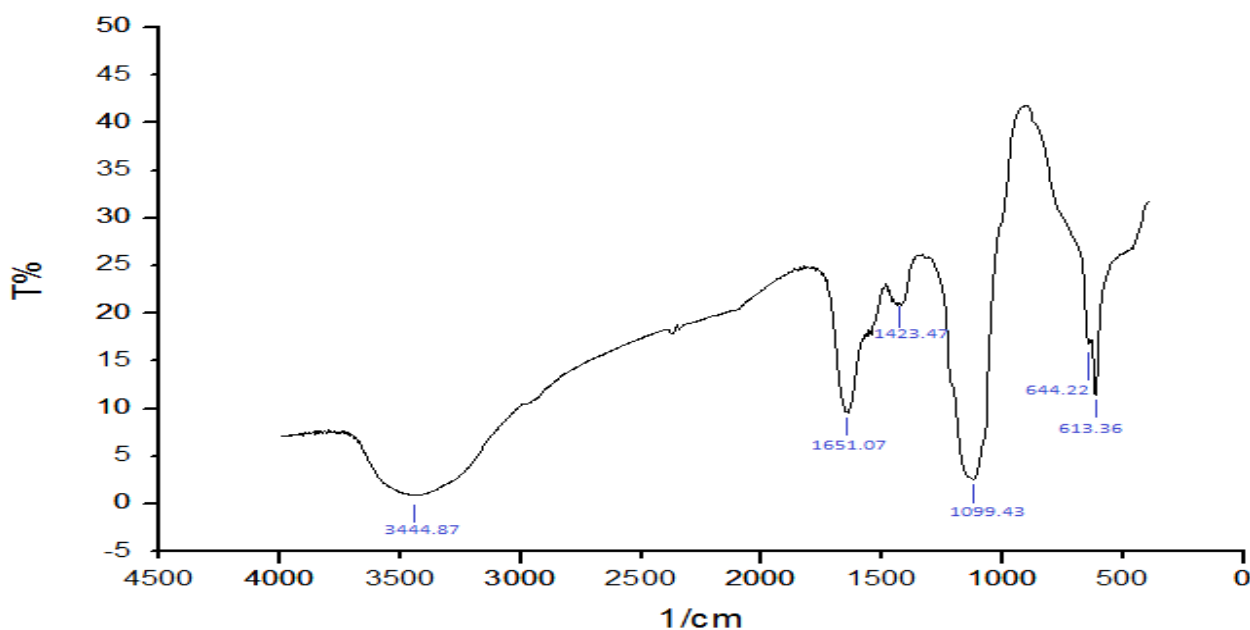
O espectro de infravermelho do EPS produzido pelo isolado CCMB 22 (Figura 14) assim como os demais isolados, apresentou presença de grupo hidroxila (3441.01 cm^{-1}) (NWODO & OKOH, 2012 b), anel de estiramento do grupo que pode ser de monossacarídeos como galactose e manose (1639.49 cm^{-1}) (FREITAS et al., 2009), presença de banda que pode representar o grupamento C – O presente em açúcares e ácido urônico (1114.86 cm^{-1}) (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006), estiramento C – C de anel aromático (1438.90 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009), presença do pico que representa a flexão N – H fora do plano de amina primária (864.11 cm^{-1}) (KAVITA et al., 2013) e presença do grupo haleto de alquila (613.36 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009).

Figura 14: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 22.



O espectro de infravermelho do EPS produzido pelo isolado CCMB 65 (Figura 15) assim como todos os espectros dos demais EPS produzidos pelos isolados também apresentou grupamento hidroxila (3444.87 cm^{-1}) (NWODO & OKOH, 2012 b), apresentou pico na região de estiramento do grupo que pode ser de monossacarídeos como do anel de manose e galactose (1651.07 cm^{-1}) (FREITAS et al., 2009), pico 1423.47 cm^{-1} na região correspondente ao estiramento C – C do anel aromático (MISHRA & JHA, 2009), pico 1099.43 cm^{-1} evidenciando a presença de ácidos urônicos (BRAMHACHARI & DUBEY, 2006) e dois picos representando a presença de haletos de alquila (644.22 e 613.36 cm^{-1}) (MISHRA & JHA, 2009).

Figura 15: Espectro de infravermelho do EPS extraído do isolado CCMB 65.



Todos os EPSs produzidos pelos isolados apresentaram características bem semelhantes havendo poucas diferenças de ausência ou presença de alguns grupos como a flexão N – H fora do plano da amina primária, haleto de alquila e pico correspondente ao estiramento do anel aromático, estes três grupamentos foram os únicos que não ocorreram em todos os EPSs como os outros grupos citados anteriormente (Quadro 2). Foi possível observar que os isolados CCMB 17 e CCMB 18 apresentam espectros bem semelhantes entre si (Figura 16), já os espectros dos isolados CCMB 01, CCMB 22 e CCMB 65 são mais diferentes entre si (Figura 17). É possível perceber que estes EPSs apresentam grupos funcionais que ocorrem em outros EPSs produzidos por *Vibrio sp.* como descrito pelo trabalho de Jiang et al., 2014 onde os espectros de infravermelho do EPS A101 produzido por *Vibrio sp.* mostrou características típicas de polissacarídeos, que exibiam uma vibração de alongamento 3417 cm^{-1} para o grupo hidroxila e um fraco C-H estiramento de banda em 2925 cm^{-1} característica absorção a 1634 cm^{-1} também foi observada, sugerindo a presença de ligações C – O, cuja vibração simétrica de alongamento foi em 1416 cm^{-1} . Os sinais a $1040\text{-}1082\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos à vibração de alongamento de C-O e ângulo mudança de vibração O-H.

Quadro 2. Bandas encontradas nos espectros de infravermelho

EPS	Hidroxila (3600-3200 cm⁻¹) (Nwodo & Okoh, 2012 b)	Ác. Urônico (1000-1125 cm⁻¹) (Bramhachari & Dubey, 2006)	Haletos de alquila (690-515 cm⁻¹) (Mishra & Jha, 2009)	Estiramento do anel de galactose e manose (1593 – 1662 cm⁻¹) (Freitas et al., 2009)	Estiramento C – C do anel aromático (1400 – 1500 cm⁻¹) (Mishra & Jha, 2009)	Presença de carboidrato (1000 - 1200 cm⁻¹) (Cao et al., 2011)	Flexão N – H fora do plano de amina primária (910-665 cm⁻¹) (Kavita et al., 2013)
CCMB 01	3417.86 cm ⁻¹	1095.57 cm ⁻¹	648.08 cm ⁻¹ 613.36 cm ⁻¹	1654.92 cm ⁻¹	-	1095.57 cm ⁻¹	-
CCMB 17	3441.01 cm ⁻¹	1118.71 cm ⁻¹	613.36 cm ⁻¹	1651.07 cm ⁻¹	1438.90 cm ⁻¹	1118.71 cm ⁻¹	864.11 cm ⁻¹
CCMB1 8	3429.43 cm ⁻¹	1114.86 cm ⁻¹	613.36 cm ⁻¹	1651.07 cm ⁻¹	1427.32 cm ⁻¹	1114.86 cm ⁻¹	860.25 cm ⁻¹
CCMBS 22	3441.01 cm ⁻¹	1114.86 cm ⁻¹	613.36 cm ⁻¹	1639.49 cm ⁻¹	1438.90 cm ⁻¹	1114.86 cm ⁻¹	864.11
CCMB 65	3444.87 cm ⁻¹	1099.43 cm ⁻¹	644.22 cm ⁻¹ 613.36 cm ⁻¹	1651.07 cm ⁻¹	1423.47 cm ⁻¹	1099.43 cm ⁻¹	-

Figura 16: Espectro dos EPSs de CCMB 17 e CCMB 18.

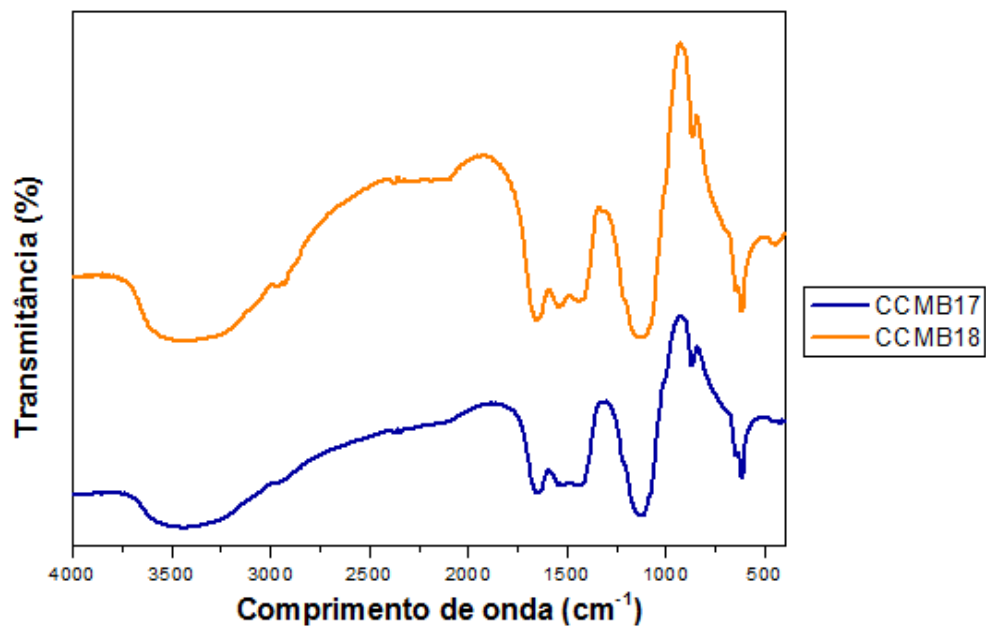
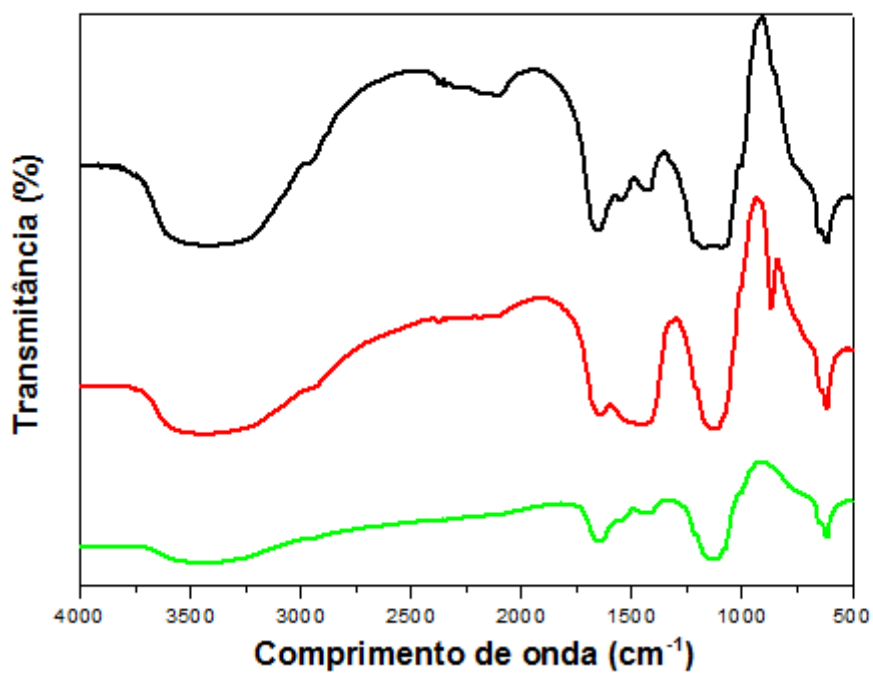


Figura 17: Espectros dos EPSs de CCMB 01, CCMB 22 e CCMB 65.



Amplio estiramento da banda do grupo hidroxila foi detectado no espectro dos EPSs extraídos de *V. campbellii* e *V. fortis*. Apresentaram absorvância fraca na faixa atribuída ao estiramento assimétrico do grupo de CH₂ alifático, que revela presença de açúcar. Da mesma forma, um estiramento de banda assimétrica correspondeu ao anel de alongamento de galactose e manose. Banda de absorção no intervalo de 1000-1125 cm⁻¹ confirmou a presença de ácido urônico. A banda entre 1200 e 900 cm⁻¹ foi atribuído à composição de polissacarídeo do EPS. Presença de bandas na faixa de 690-515 cm⁻¹ indicando presença de haletos de alquila C – X. Uma banda de 1239/1242 foi detectada pelo estiramento C – N (1250-1020 cm⁻¹) de aminas alifáticas. Bandas de absorção na gama de 910-665 cm⁻¹ correspondem à flexão N – H fora do plano de amina primária (KAVITA et al, 2013). Assim como os EPSs obtidos de *V. campbellii* e *V. fortis*, os isolados CCMB 17, CCMB 18, CCMB 22 e CCMB 65 apresentaram o grupo funcional haleto de alquila, o que indica uma similaridade entre os EPSs podendo estar ligado à alguma via metabólica comum ao gênero.

O espectro de infravermelho do EPS produzido por *V. neocaledonicus* mostrou banda larga para além de 3000 cm⁻¹ resultante do estiramento de O – H e C – H, bandas de absorvância em 3291 e 2930 cm⁻¹, respectivamente, e uma banda intensa de absorvância em 1.652 cm⁻¹ com uma banda em 1732 cm⁻¹ devido à presença de grupos carboxílicos sobre os ácidos urônicos. Além disso, as bandas a 1558 e 1645 cm⁻¹ foram atribuídos a amina I e aminoácidos de grupos osaminas II. A ausência de um dubleto a 1250-1230 cm⁻¹ indicou que nenhum grupo sulfato estava presentes neste EPS (CHALKIADAKIS et al., 2013). Os EPSs extraídos dos isolados CCMB 17, CCMB 18 e CCMB 22 não apresentaram o pico correspondente à amina primária e secundária como no EPS produzido pelo *V. neocaledonicus*, contudo é possível notar o grupamento amina está presente ao visualizar picos que indicam a vibração desta.

O espectro de FTIR dos EPS extraído de *Vibrio furnissii* VB0S3 mostrou grupos funcionais característicos, tal como um grupo hidroxila, tendo largo estiramento em 3.416 cm⁻¹ e um pico de fraco estiramento de grupo metil C – H em 2925 cm⁻¹. Um trecho largo de C – O – C, C = O em 1.000-1.200 cm-1 correspondente a presença de carboidratos. Os espectros de FTIR do polímero evidenciou presença de grupos carboxila que pode servir como sítios de ligação para cátions bivalentes (BRAMHACHARI et al., 2006). Todos os isolados apresentaram pico que evidencia

presença do grupo carboxila, da mesma forma que o EPS produzido por *V. furnissii*, podendo esse grupo ser comum aos EPSs produzidos pelas bactérias do gênero *Vibrio*.

5.4 Viscosidade Aparente

Todas as amostras apresentaram característica pseudoplástica, a viscosidade aparente decresceu concomitante com o aumento da taxa de cisalhamento. Todos isolados apresentavam uma viscosidade constante de 1 cP a uma taxa de cisalhamento de 65 (s^{-1}) (Figuras 18 e 19).

Figura 18: Viscosidade aparente (cP) dos isolados CCMB 17 e CCMB 18.

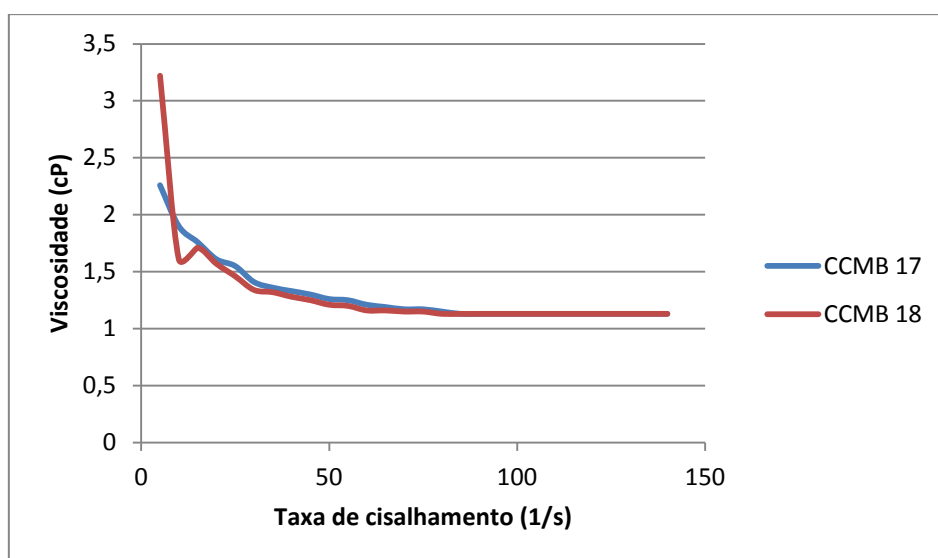
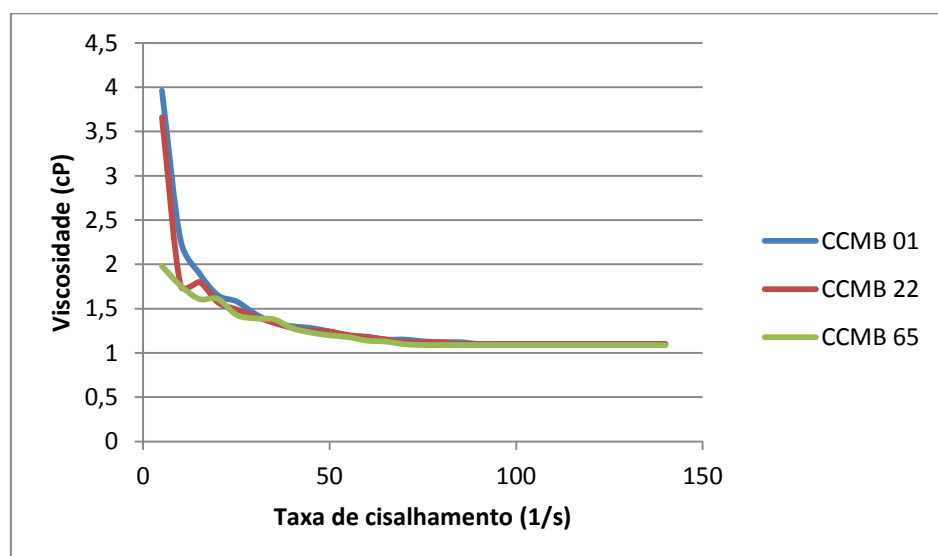


Figura 19: Viscosidade aparente (cP) dos isolados CCMB 01, CCMB 22 e CCMB 65.



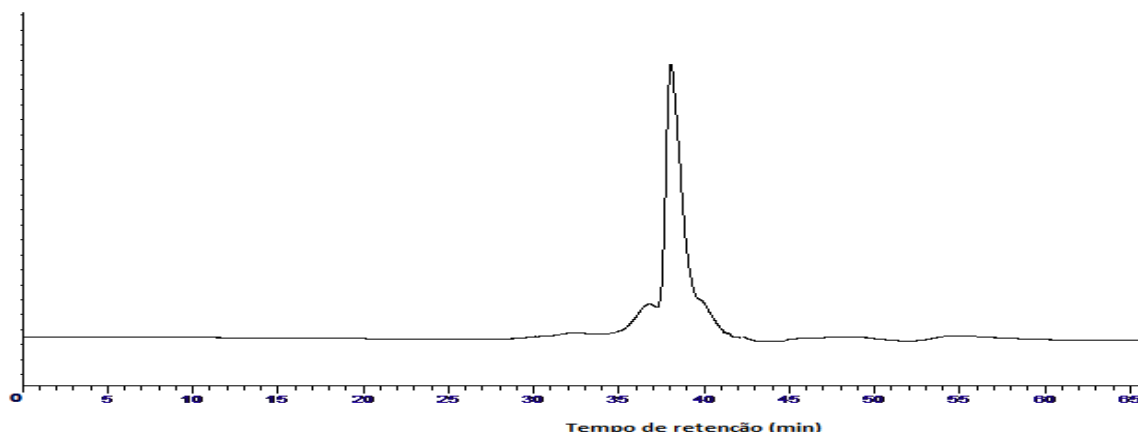
As características pseudoclássicas dos EPS são de grande interesse para a indústria alimentícia por conferir textura ao produto e, quando exposto a estresse, o produto diminui a viscosidade e flui mais facilmente (DUBOC & MOLLET, 2001).

A dinâmica de viscosidade dos EPSs produzidos por *V. campbellii* e *V. fortis* decresceu concomitantemente com a velocidade de corte até 97,3 taxa de cisalhamento (s^{-1}), mostrando propriedade reológica pseudoplástica à temperatura constante, 25 °C (KAVITA et al.,2013). Segundo estudo de Muralidharan & Jayachandran, 2003, a viscosidade do EPS produzido por *V. alginolyticus* diminuiu ao longo de um intervalo de aumento da taxa de cisalhamento 0-750 (s^{-1}) indicando propriedade pseudoplástica. Apesar da baixa viscosidade, os EPSs que foram extraídos neste trabalho, apresentou característica pseudoplástica assim como os EPSs obtidos nos trabalhos supracitados.

5.5 Massa Molecular (MM)

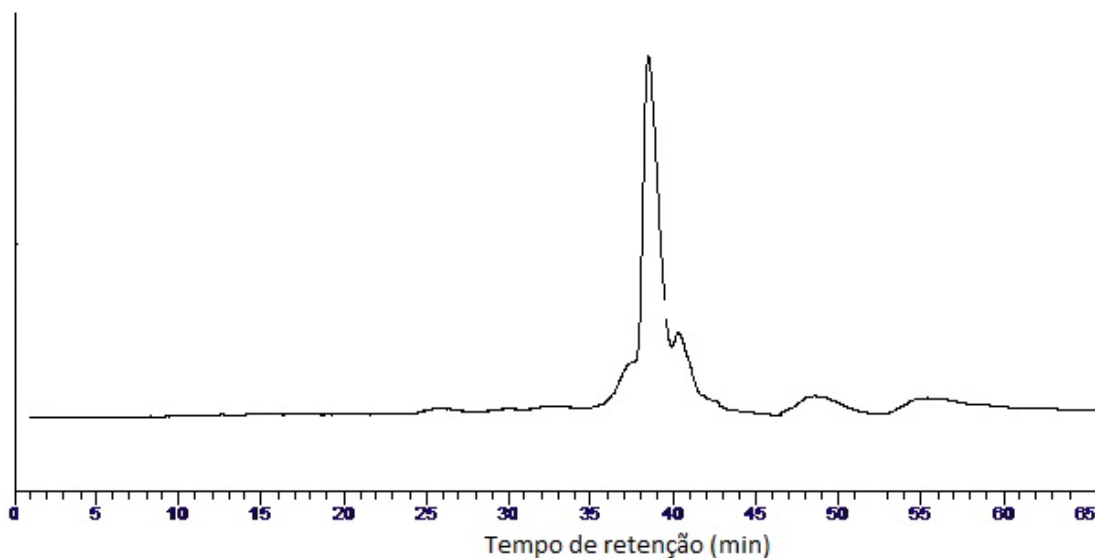
A análise de massa molecular foi realizada utilizando dez padrões de dextrana de diferentes MM dentro do intervalo de 102.000 Da à 5.900.000 Da que foram separados por GPC CLAE, resultaram em tempos de retenção de 31,56 à 26,91 minutos. A curva de calibração obtida pelo Log da MM em função do tempo de retenção de cada padrão de dextrana apresentou $R^2 = 0,9935$ ($y = -0,2952x + 14,39$). A separação GPC CLAE mostra que todos os EPSs produzidos apresentaram duas frações. O EPS produzido pelo isolado CCMB 01 apresentou o pico menor com 1,82 % da área e MM de $1,52 \times 10^3$ Da e tempo de retenção de 37,97 minutos. O pico maior apresentou 98,18% da área e MM de 536,54 Da com tempo de retenção de 39,5 minutos (Figura 20).

Figura 20: Cromatograma do isolado CCMB 01.



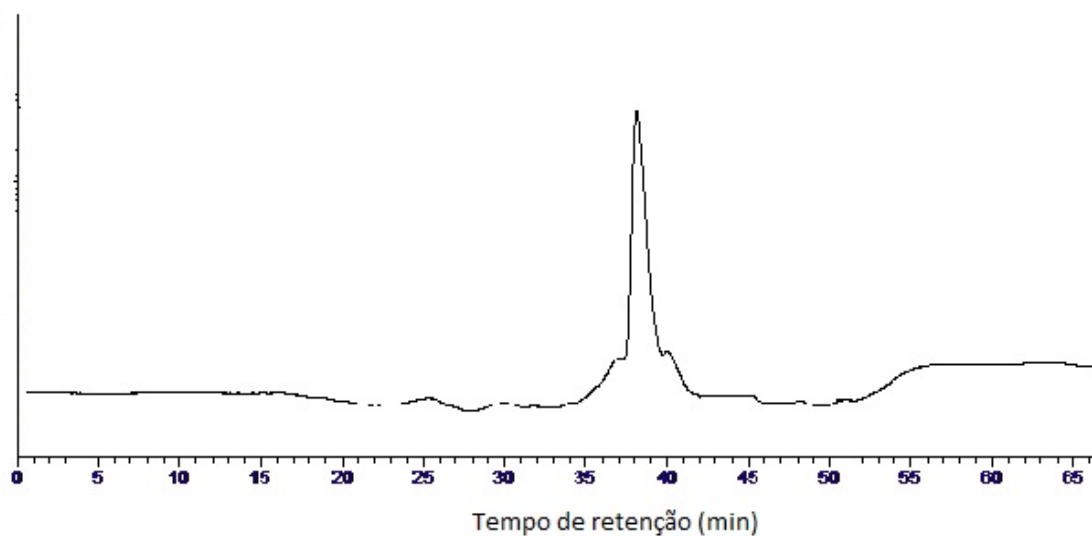
O EPS produzido pelo isolado CCMB 17 apresentou o pico maior com 93,72 % da área e MM de $1,517 \times 10^3$ Da e tempo de retenção de 37,97 minutos. O pico menor apresentou 6,28 da área e MM de 431,654 Da com tempo de retenção de 39,89 minutos (Figura 21).

Figura 21: Cromatograma do isolado CCMB 17.



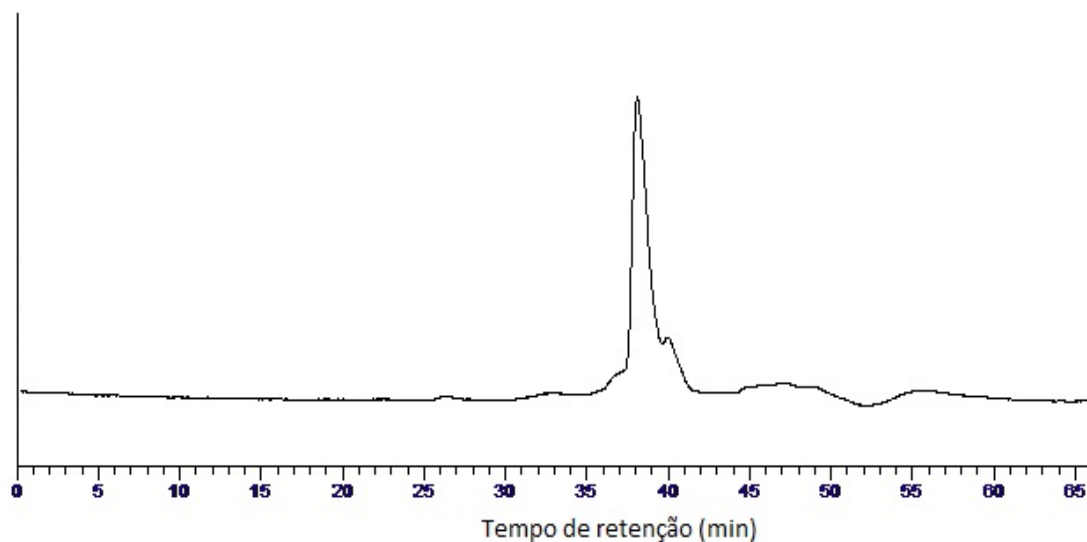
O EPS produzido pelo isolado CCMB 18 apresentou o pico maior com 96,71 % da área e MM de $1,517 \times 10^3$ Da e tempo de retenção de 37,97 minutos. O pico menor apresentou 3,29 % da área e MM de 400,557 Da com tempo de retenção de 39,93 minutos (Figura 22).

Figura 22: Cromatograma do isolado CCMB 18.



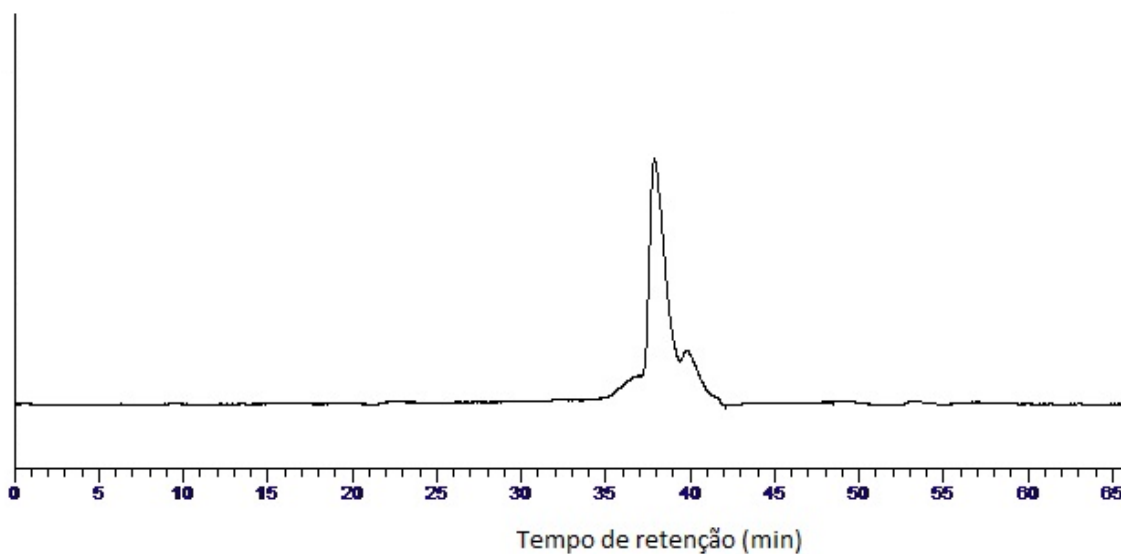
O EPS produzido pelo isolado CCMB 22 apresentou o pico maior com 95,18 % da área e MM de $1,408 \times 10^3$ Da e tempo de retenção de 38,08 minutos. O pico menor apresentou 98,18 % da área e MM de 400,557 Da com tempo de retenção de 39,93 minutos (Figura 23).

Figura 23: Cromatograma do isolado CCMB 22.



O EPS produzido pelo isolado CCMB 65 apresentou o pico maior com 92,64 % da área e massa de $1,517 \times 10^3$ Da e tempo de retenção de 37,97 minutos. O pico menor apresentou 7,36 % da área e MM de 374,235 Da com tempo de retenção de 40,03 minutos (Figura 24).

Figura 24: Cromatograma do isolado CCMB 65.



De acordo com dados apresentados (Quadro 3), é possível notar que a MM dos EPSs extraídos apresentam frações de mesma MM (1,52 KDa), com exceção do EPS produzido pelo isolado CCMB 22 que apresentou MM de 1,408 KDa. Além disso, é possível perceber que o EPSs extraídos apresentam massas bem baixas quando comparada às massa molecular de EPS produzidos por cepas de *Vibrio spp.* A Massa molecular dos EPSs extraído de *V. Campbellii* e *V. fortis* foram de 2431 KDa e 2218

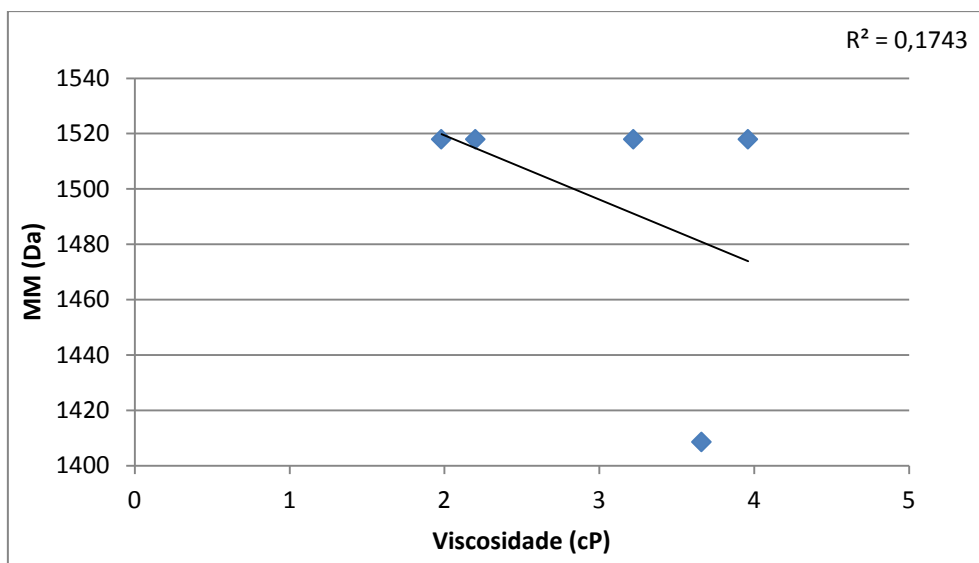
KDa, respectivamente (KAVITA et al. 2013). O EPS produzido pela espécie *V. neocaledonicus* apresentou MM de 672 KDa (CHALKIADAKIS et al., 2013). Já o EPS produzido por *V. alginolyticus* apresentou massa de 63900 KDa (MURALIDHARAN & JAYACHANDRAN, 2003). Estes resultados quando comparados aos relatados pela literatura pode levar a crer que apenas uma porção dos EPSs está sendo extraída ou os isolados produzem oligossacarídeos ao invés de polissacarídeos como o esperado.

Segundo Berg et al., 1995, a viscosidade é altamente dependente da massa molecular. Através dos resultados da viscosidade foi possível inferir que as massas moleculares dos polímeros seriam baixas, entretanto para este estudo a correlação foi pequena para essas variáveis ($R^2 = 0,1743$), (Figura 25).

Quadro 3: Massa molecular, tempo de retenção, área e viscosidade aparente do EPSs dos isolados.

Isolado	tR (min)	MM (KDa)	Área (%)	Viscosidade máx (cP)
CCMB 01	37,97	1,52	98,2	3,96
CCMB 17	37,97	1,52	93,7	2,26
CCMB 18	37,97	1,52	96,71	3,22
CCMB 22	38,08	1,41	95,18	3,66
CCMB 65	37,97	1,52	92,64	1,98

Figura 25: Correlação entre viscosidade aparente máxima e MM dos EPSs produzidos pelos isolados.



Diante dos resultados apresentados podemos inferir a necessidade de uso de outras técnicas a fim de elucidar de maneira mais eficiente a composição dos EPSs extraídos, associada a uma identificação molecular das espécies, requisitos fundamentais para interpretação conclusiva, considerado que a literatura mostra que há diferenças entre EPS produzidos por diferentes espécies de *Vibrio* (Quadro 4), além de determinar um método mais eficiente para extração do EPS.

Quadro 4: *Vibrio* produtores de EPS e as características dos seus respectivos EPSs.

Espécie	Origem	Meio de produção	Comp. do EPS	Tempo de Incubação	Taxa de produção	MM	Viscosidade	Referência
<i>Vibrio sp.</i>	Talo em deterioração de Laminaria (alga parda)	Meio Alginato (Anexo I)	Ác. Glicurônico, ác. Galacturônico, ramnose, glicosamina, manose, glicose, galactose, fucose	86 h	-	546 KDa	-	Jiang et al., 2014

<i>Vibrio campbellii</i>	Mar da Arábia	Zobell	Arabinose galactose glicose manose ramnose Arabinose galactose manose	12 h	0,4 g.L ⁻¹	2431 KDa	Propriedade pseudoplástica	Kavita et al.,2013
<i>Vibrio fortis</i>				12 h	0,134 g.L ⁻¹	2218 KDa	propriedade pseudoplástica	
<i>V.harveyi</i>	Rio Mandovi e Estuário Zuari	Meio Salino Mineral (Anexo I)	Galactose, glicose, ramnose fucose, arabinose, xilose, manose	48 h	0,0028 g.L ⁻¹	-	-	Bramhacha ri & Dubey, 2006
<i>V. furnissii</i>	Rio Mandovi e estuário Zuari	Meio Salino Mineral (Anexo I)	Galactose, glicose, ramnose fucose, arabinose, xilose, manose	48 h	0,0031 g.L ⁻¹	-	-	Bramhacha ri, et al., 2007
<i>Vibrio neocaledoni cus sp. nov</i>	Biofilme de Holoturoidea Baía St Vincent,	Zobell + glicose (10g.L ⁻¹)	N-acetil glicosamina, N-acetil galactosamina, glicose, ác. galacturônico, ác. glicurônico	72 h	2 g.L ⁻¹	672 KDa	-	Chalkiadaki s et al., 2013
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Biofilme asso- ciado a um painel de estanho	SWN modificado	Glicose tetra- acetato, xilopiranosse tetra- acetato, aminoribose tetra-acetato, tetra-acetato aminoarabinose glicose pentaacetato	72 h	-	63900 KDa	Característica pseudoplástica	Muralidhar an & Jayachandr an, 2002
<i>Vibrio diabolicus</i>	Tegumento do poliqueta <i>Alvinella pompejana</i> hidrotermal	Zobell + glicose	Ác. glicurônico, ác. galacturônico, glicosamina, galactosamina	48 h	2,5 g.L ⁻¹	-	Viscosidade do meio de cultura maior que 40 cP ao final da fermentação	Raguénès et al., 1997
<i>Vibrio parahaemo- lyticus</i>	Amostra clínica	Meio salino tamponado com fosfato	Glicose galactose fucose, N-acetil glicosamina N-acetil galactosamina arabinose manose	20 h	-	-	-	Enos- Berlage & Mc Carter, 2000

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os cinco isolados de sedimento marinho testados apresentaram crescimento em meio TCBS como descrito pela literatura, entretanto esse meio serve apenas como uma triagem dos isolados, sendo assim, uma identificação molecular se faz necessária para identificar as espécies.
- A produção de EPS pelos cinco isolados testados se mostrou maior em comparação à produção de EPS por outras espécies do gênero *Vibrio* relatadas

pela literatura, contudo a identificação da espécie pode determinar qual o método de extração mais adequado, a influência da composição do meio de cultivo e tipo de via metabólica usada pela bactéria.

- A massa molecular dos EPSs extraídos do meio SWN apresentou-se baixa em comparação às massas dos EPS descritos pela literatura, dessa forma sua viscosidade também se mostrou baixa, contudo os EPSs apresentaram característica pseudoplástica.
- O resultado da técnica de infravermelho apresentou bandas que podem indicar a presença de monossacarídeo como galactose e manose. Esses resultados demonstram que há presença de açúcares, contudo a baixa massa molecular desses EPSs pode sugerir que apenas uma porção destes está sendo extraída.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENA, A., MAUGERI, T. L., PAVONE, B., IANNELLO, D., GUGLIANDOLO, C., & BISIGNANO, G. (2006). Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. **International Immunopharmacology**, 6(1), 8–13.

CAO B., SHI, L., BROWN, R.N, XIONG, Y., FREDRICKSON, J. K., ROMINE, M. F., MARSHALL M. J., LIPTON M. S., AND BEYENAL, H. (2011). Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: Characterization by infrared spectroscopy and proteomics. **Environmental Microbiology**, 13, 1018-1031.

BECKER, A, KATZEN, F., PÜHLER, A, & IELPI, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50(2), 145–52.

BERG, D. J. C. V. D., ROBIJN, G. W., JANSSEN, A, C., GIUSEPPIN, M. L. F., VREEKER, R., KAMERLING, J. P., JOHANNES F. G. VLIAGENTHART, LEDEBOER, A. M., VERRIPS, C. T. (1995) Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide. **Applied And Environmental Microbiology**, 61(8) p. 2840–2844

BRAMHACHARI, P. V, & DUBEY, S. K. (2006). Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. **Letters in Applied Microbiology**, 43(5), 571–7.

- BRAMHACHARI, P. V., KISHOR, P. B. K., RAMADEVI, R., KUMAR, R., RAO, R. B. & DUBEY, S. K. (2007). Isolation and Characterization of Mucous Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Vibrio furnissii* Strain VB0S3. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 17(1), 44–51
- CERNING, J. (1995). Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. **Le Lait**, 75(4-5), 463–472.
- CHAWLA, P. R., BAJAJ, I. B., SURVASE, S. A., & SINGHAL, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, **Food Technology. Biotechnology**, 47(2), 107–124.
- CHI, Z., & FANG, Y. (2005). Exopolysaccharides from marine bacteria. **Journal of Ocean University of China**, 4(1), 67–74.
- CHI, Z., SU, C. D., & LU, W. D. (2007). A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanotheca* sp. 113. **Bioresource Technology**, 98(6), 1329–32.
- CHI, Z., & ZHAO, S. (2003). Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, 33(2-3), 206–211.
- COLLIEC-JOUAULT, S., ZANCHETTA, P., HELLEY, D., RATISKOL, J., SINQUIN, C., FISCHER, A. M., & GUEZENNEC, J. (2004). [Microbial polysaccharides of marine origin and their potential in human therapeutics]. **Pathologie-Biologie**, 52(3), 127–30.
- DECHO A.W. (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In: **Oceanogr Mar Biol Annu Rev**, Barnes M, ed. (Aberdeen, UK: Aberdeen Univ Press), 73–153
- DONLAN, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, 8(9), 881–90.
- DONOT, F., FONTANA, A., BACCOU, J. C., & SCHORR-GALINDO, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, 87(2), 951–962.
- DUBOC, P.; MOLLET, B. (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 759–768.
- ENOS-BERLAGE, J. L. & MCCARTER, L. L. (2000). Relation of Capsular Polysaccharide Production and Colonial Cell Organization to Colony Morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Bacteriology**, 182(19), 5513–5520
- FARIA, S. (2005). **Produção de Goma Xantana empregando Caldo de Cana por *Xanthomonas campestris* pv . *campestris* Produção de Goma Xantana empregando Caldo de Cana por *Xanthomonas campestris* pv . *campestris* NRRL B-1459**. Uberlândia. 119 f. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química), Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. 2005

- FENICAL, W. (1993). Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource. **Chemical Reviews**, 93(5), 1673-1683
- FIRN, R. D., & JONES, C. G. (2009). A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. **Journal of Experimental Botany**, 60(3), 719–26.
- FREITAS, F., ALVES, V. D., & REIS, M. A M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, 29(8), 388–98.
- FREITAS, F., ALVES, V. D., PAIS, J., COSTA, N., OLIVEIRA, C. , MAFRA, L., HILLIOU, L., OLIVEIRA, R., REIS, M. M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource Technology**, 100 ,859–865
- GADD, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, 122(2-4), 109–119.
- GRIMES, D. J., JOHNSON, C. N., DILLON, K. S., FLOWERS, A. R., NORIEA, N. F., & BERUTTI, T. (2009). What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean--a review. **Microbial Ecology**, 58(3), 447–60.
- GUEZENNEC, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 29(4), 204–8.
- GUO, S., MAO, W., HAN, Y., ZHANG, X., & YANG, C. (2010). Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*. **Bioresource Technology**, 101(12), 4729–4732.
- HAZEN, T. H., PAN, L., GU, J.-D., & SOBECKY, P. a. (2010). The contribution of mobile genetic elements to the evolution and ecology of *Vibrios*. **FEMS Microbiology Ecology**, 74(3), 485–99.
- HSIEH, Y.C., LIANG, S. M., TSAI, W. L., CHEN, Y. H., LIU, T. Y., LIANG, C. M. Study of Capsular Polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, 71(6), 3329–3336.
- HULLEBUSCH, E. D. VAN, ZANDVOORT, M. H., & LENS, P. N. L. (2004). Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. **ReViews in Environmental Science & BioTechnology**, 1(2), 1–25.
- IMESON, A. (ed.) (2010) Food Stabilisers, Thickening and Gelling Agents, **Wiley-Blackwell**

JIANG, P., LI, J., HAN, F., DUAN, G., LU, X., GU, Y., & YU, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. **PLoS One**, 6(4), 18514.

JOHNSON, C. N., BOWERS, J. C., GRIFFITT, K. J., MOLINA, V., CLOSTIO, R. W., PEI, S., ... COLWELL, R. R. (2012). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). **Applied and Environmental Microbiology**, 78(20), 7249–57

JOSEPH, L. A., & WRIGHT, A. C. (2004). Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide Inhibits Biofilm Formation . **Journal of Bacteriology**, 186(3). 889–893

KAPER, J.B., MORRIS J.G. J.R., LEVINE, M.M. (1995). Cholera. **Clin Microbiol Rev**; 8(2), 48 – 86.

KAVITA, K., MISHRA, A., & JHA, B. (2013). Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: characterization and applications. **Carbohydrate Polymers**, 94(2), 882–8.

KERVAREC, N., PICHON, R., & GUEZENNEC, J. (1999). Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent, **Carbohydrate Research**, 322, 40–45.

KUMAR, A. S., MODY, K., JHA, B. (2007). Bacterial exopolysaccharide – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, (47), 103–117.

KWON, K.-J., PARK, K.-J., KIM, J.-D., KONG, J.-Y., & KONG, I.-S. (1994). Isolation of two different polysaccharides from halophilic *Zoogloea* sp. **Biotechnology Letters**, 16(8), 783–788.

MANSSON, M., GRAM, L., & LARSEN, T. O. (2011). Production of bioactive secondary metabolites by marine vibriaceae. **Marine Drugs**, 9(9), 1440–68.

MISHRA, A. & JHA, B. (2009) Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, 100, 3382–3386

MOORE, S., THOMSON, N., MUTREJA, A., & PIARROUX, R. (2014). Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(5), 373–9.

MORIN, A., (1998). Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production and recovery of microbial polysaccharides. In: *Polysaccharides – Structural Diversity and Functional Versatility*. **Dumitriu, S. (Ed.)**, Marcel Dekker Inc. Publication, New York, p. 275–296.

- MURALIDHARAN, J., & JAYACHANDRAN, S. (2003). Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*, **Process Biochemistry**, 38, 841–847.
- NICHOLS, C. A. M., GUEZENNEC, J., & BOWMAN, J. P. (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, 7(4), 253–71.
- NWODO, U. U., GREEN, E., & OKOH, A. I. (2012) a. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, 13(11), 14002-14015.
- NWODO U.U. & OKOH, A.I. (2012) b .Characterization and flocculation properties of biopolymeric flocculant (glycosaminoglycan) produced by *Cellulomonas* sp. **Journal of Applied Microbiology**, 114, 1325--1337
- OTERO, A., & VINCENZINI, M. (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. **Journal of Biotechnology**, 102(2), 143–152.
- POLI, A., ANZELMO, G., & NICOLAUS, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. **Marine Drugs**, 8(6), 1779–802.
- POLI, A., DI DONATO, P., ABBAMONDI, G. R., & NICOLAUS, B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. **Archaea**, 1 – 13.
- RAGUENES, G., CHRISTEN, R., GUEZENNEC, J., PIGNET, P., & BARBIER, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a New Polysaccharide-Secreting Organism Isolated from a Deep-sea Hydrothermal Vent Polychaete Annelid, *Alvinella pompejana*, **International Journal of Systematic Bacteriology**, (15), 989–995.
- REHM, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews. Microbiology**, 8(8), 578–92.
- REHM, B.H.A. (ed.) (2009) Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives, **Caister Academic Press**
- REHM, B. H., & VALLA, S. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 48(3), 281–8.
- ROWE-MAGNUS, D. A, GUÉROUT, A M., & MAZEL, D. (1999). Super-integrans. **Research in Microbiology**, 150(9-10), 641–51.

- SATPUTE, S. K., BANAT, I. M., DHAKEPHALKAR, P. K., BANPURKAR, A. G., & CHOPADE, B. A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, 28(4), 436–50.
- SAYEM, S. M. A., MANZO, E., CIAVATTA, L., TRAMICE, A., CORDONE, A., ZANFARDINO, A., VARCAMONTI, M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Factories**, 10(1), 74.
- SHUANGZHI, Z., & ZHENMING, C. H. I. (2003). A New Pullulan-Producing Yeast and Medium Optimization for Its Exopolysaccharide Production, **Journal of Ocean**, 2, 53–57.
- SINGH, R., PAUL, D., & JAIN, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, 14(9), 389–97.
- SUTHERLAND, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology (Reading, England)**, 147(Pt 1), 3–9.
- SUTHERLAND, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, 11(9), 663–674.
- TAGOMORI, K., IIDA, T., & HONDA, T. (2002). Comparison of Genome Structures of Vibrios, Bacteria Possessing Two Chromosomes, **Journal of Bacteriology**, 184(16), 4351–4358.
- THOMPSON, F. L., IIDA, T., & SWINGS, J. (2004). Biodiversity of Vibrios, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 68(3), 403–431.
- URAI, M., YOSHIZAKI, H., ANZAI, H., OGIHARA, J., IWABUCHI, N., HARAYAMA, S., NAKAJIMA, M. (2007). Structural analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. **Carbohydrate Research**, 342(7), 933–42.
- VU, B., CHEN, M., CRAWFORD, R. J., & IVANOVA, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 14(7), 2535–54.
- WINGENDER J, NEU TR, FLEMMING H-C (1999) What are bacterial extracellular polymer substances? In: *Microbial Extracellular Polymer Substances*, (Berlin, Germany: Springer) pp 1–19.
- YE, S., LIU, F., WANG, J., WANG, H., & ZHANG, M. (2012). Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6. **Carbohydrate Polymers**, 87(1), 764–770.

YILDIZ, F.H., & SCHOOLNIK, G.K. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96, 4028–4033

YILDIZ, F. H., & VISICK, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. **Trends in Microbiology**, 17(3), 109–18.

ANEXO I

Meios de Cultura

Meio Zobell: 1000 mL de água destilada; 5 g de peptona, 1 g de extrato de levedura, 0,10 g de citrato férrico, 19,45 g de NaCl; 8,80 g de MgCl₂; 1,8 g de CaCl₂; 0,16 g de NaHCO₃; 3,24 g de Na₂SO₄; 0,55 g de KCl; 0,08 g de KBr; 0,034 g de SrCl₂; 0,022 g de H₃BO₃; 0,004g Na₂O₃Si; 0,0024 g de NaF; 0,0016 g de NH₄NO₃; 0,008 g NaH₂PO₄.

Meio Aginato (w / v), NaCl a 3%, 0,5% de alginato de sódio (Sigma), 0,3% de KH₂PO₄, 0,7% K₂HPO₄, 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,01% de MgSO₄, 0,01% FeSO.

Meio Salino Mineral (w/v) - 0,2% de glicose; 12,6% K₂HPO₄; 18,2% KH₂PO₄; 10% NH₄NO₃; 1% MgSO₄.7H₂O; 0,6% MnSO₄; 1% molibdato de sódio; 1% CaCl₂; 0,06% FeSO₄.2H₂O; 1,5% NaCl.

Meio Zobell com glicose - (750 ml de meio Zobell, 250 ml de água do mar filtrada, 40 g de glicose).

Meio salino tamponado com fosfato - 20 mM fosfato de sódio, 100 mM NaCl

