

Luisa Helena Gurzoni Brandt de Faria

**Caracterização Taxonômica e Produção de
Polissacarídeos utilizando Bactérias
isoladas de amostras de solo**



1910001117



LUISA HELENA GURZONI BRANDT DE FARIA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E PRODUÇÃO
DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO BACTÉRIAS
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO**



T 1.117/02

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto - SP, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos (Área de Concentração de Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2002



†576.8
F224c

Faria, Luisa Helena Gurzoni Brandt.

Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando
bactérias isoladas de amostras do solo / Luisa Helena Gurzoni Brandt de Faria
– São José do Rio Preto: [s.n.], 2002
180 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Bactérias. 4. Polissacarídeos
microbianos. 5. Fermentação - Otimização. 6. Biologia molecular. 7. PCR -
Reação da polimerase em cadeia. 8. Taxonomia bacteriana. I. Garcia-Cruz,
Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biotecnologia,
Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.8

LUISA HELENA GURZONI BRANDT DE FARIA

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E PRODUÇÃO
DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO BACTÉRIAS
ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO**

**COMISSÃO JULGADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz.....
2º Examinador: Prof. Dr. Raúl Hernán Castro Gómez.....
3º Examinador: Profª. Drª. Eleni Gomes.....
4º Suplente: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior.....
5º Suplente: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi.....



DADOS CURRICULARES
LUISA HELENA GURZONI BRANDT DE FARIA

NASCIMENTO 06/09/1975 – TANABI/SP

FILIAÇÃO José Brandt de Faria
Maria Aparecida Gurzoni Brandt de Faria

1994/1998 Curso de Graduação – Farmácia Bioquímica
Centro Universitário Federal de Alfenas - MG

2000/2002 Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, nível de Mestrado, no Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio
Preto – SP



Ao meu pai e minha mãe pelo
apoio e pela dedicação de uma
vida, aos meus irmãos e à minha
avó (in memoriam).



AGRADECIMENTOS

Por mais solitário que tenha sido o processo de elaboração deste trabalho, a sua realização só foi possível e teve sentido graças aos inúmeros momentos escondidos entre palavras e páginas. Estes momentos trouxeram consigo a alegria do compartilhar, seja com a família, meus amigos ou com quem quer que fosse. Portanto, aqui, além de pensamentos e hipóteses, também moram histórias e sentidos, minha vida e muitas outras. É por isso, que agradeço àqueles que participaram fornecendo subsídios (teóricos, práticos, sentimentais, afetuosos...) para que eu pudesse ao final costurar tudo desta forma.

Desta forma agradeço ao Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz que além de orientador foi acima de tudo um amigo.

Ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP de São José do Rio Preto – SP, pelo uso de suas dependências e pelo auxílio de seu corpo docente e técnico-administrativo.

Ao laboratório de Microbiologia aplicada da UNESP de São José do Rio Preto – SP, na pessoa da Prof. Dra. Eleni Gomes e Prof. Dr. Roberto Silva pelo uso das dependências do laboratório pelo qual são os responsáveis.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP de Rio Claro - SP, pelo uso de sua estrutura e pelo auxílio de seu corpo docente e técnico administrativo.

Ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior da UNESP de Rio Claro – SP pelas consultas e apoio científico na etapa de Biologia Molecular deste trabalho.



À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de estudos concedida e pelo fornecimento da reserva técnica.



“ É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King



SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
Resumo.....	01
1. INTRODUÇÃO.....	03
2. OBJETIVOS.....	07
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
4. CAPÍTULO I.....	64
4.1. Introdução.....	64
4.2. Objetivos Específicos.....	66
4.3. Material e Métodos.....	67
4.4. Resultados e Discussão.....	73
5. CAPÍTULO II.....	110
5.1. Introdução.....	110
5.2. Objetivos Específicos.....	112
5.3. Material e Métodos.....	113
5.4. Resultados e Discussão.....	116
6. CONCLUSÕES.....	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
8. ABSTRACT.....	148
ANEXO I.....	150
ANEXO II.....	161
ANEXO III.....	168



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das diferentes áreas envolvidas na pesquisa de polissacarídeos.....	12
Figura 2 - Síntese e interconversão de açúcares nucleotídeos difosfato envolvidos na síntese de exopolissacarídeos...	18
Figura 3 - Modelo das reações bioquímicas envolvidas durante a biossíntese de exopolissacarídeo por <i>Klebsiella aerogenes</i> tipo 8 e espécies correlacionadas.....	21
Figura 4 - Estrutura química da goma dextrana.....	26
Figura 5 - Estrutura química da goma xantana.....	28
Figura 6 - Estruturas química das gomas (a) succinoglicana e (b) galactoglicana.....	30
Figura 7 - Estrutura química da goma acetana, podendo apresentar 4 resíduos de açúcares como substituintes..	31
Figura 8 - Estrutura química da goma curdlana.....	32
Figura 9 - Estrutura química da goma gelana.....	35
Figura 10 - Estrutura química das gomas (a) welana e (b) ramsana.	36
Figura 11 - Estrutura química do alginato.....	37
Figura 12 - Conformações dos polissacarídeos, deduzidas em computador, para as ligações dos tipo a, b, c, d.....	40
Figura 13 - Espaço ocupado pelo giro de uma molécula de polissacarídeo com o mesmo peso molecular, com cadeia linear (A) e cadeia ramificada (B).....	42
Figura 14 - Mecanismo esquemático de gelificação em uma solução de polímeros.....	46



- Figura 15 - Reação em cadeia da polimerase. Cada ciclo consiste de desnaturação da fita molde, anelamento dos primers em cada fita alvo complementar e síntese da sequência entre os primers..... 58
- Figura 16 - Parâmetros de fermentação obtidos para as bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), incubadas a 30°C e 200 rpm durante um período de 120 h, utilizando o meio base acrescido de glicose a 2%..... 77
- Figura 17 - Peso celular seco das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h. 83
- Figura 18 - Produção de polissacarídeo das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h. 84
- Figura 19 - Rendimento da produção de polissacarídeo das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h..... 85
- Figura 20 - Viscosidade do caldo de fermentação em relação as fontes de carbono das bactérias 18E (A) e 39A (B), incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h 86
- Figura 21 - Viscosidade do caldo de fermentação em relação as fontes de carbono da bactéria 24A, incubada à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h, em 100 e 12 rpm.... 87
- Figura 22 - Variação do pH do caldo de fermentação das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h..... 88
- Figura 23 - Parâmetros de fermentação obtidos para a bactéria 39A na seleção de fontes de nitrogênio, incubada a 30°C e 200 rpm durante um período de 96 h..... 96
- Figura 24 - Parâmetros de fermentação obtidos para a bactéria 24A na seleção de fontes de nitrogênio, incubada a 30°C e 200 rpm durante um período de 96 h..... 97
- Figura 25 - Parâmetros de fermentação obtidos para as bactérias 18E, 39A e 24A, variando a temperatura de incubação,



a 200 rpm durante um período de 96 h.....	103
Figura 26 - Parâmetros de fermentação obtidos para as bactérias 18E, 39A e 24A, incubadas a 30°C e 200 rpm durante um período de 96 h, variando o pH inicial do caldo de fermentação.....	106
Figura 27 - Sequência parcial DNAr 16S da bactéria 18E.....	128
Figura 28 - Sequência parcial DNAr 16S da bactéria 39A.....	128
Figura 29 - Sequência parcial DNAr 16S da bactéria 24A	129
Figura 30 - Árvore mais parcimoniosa resultante da análise de parcimônia de 31 caracteres informativos de 16S de 17 espécimes de <i>Rhizobium</i> ou <i>Mesorhizobium</i> .. Passos = 61, CI = 0,8033, RI = 0,8554. Os números à frente dos ramos indicam o suporte de Bootstrap de 100 réplicas, cada uma com 100 buscas heurísticas, realizadas no PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000) que foram omitidos quando menores do que 50%. 39 corresponde a bactéria 39A. Os demais microrganismos tiveram suas seqüências 16S retiradas do GenBank (www3.ncbi.nlm.nih.gov) e correspondem, de cima para baixo na árvore, aos códigos de acesso: AJ 295079, Y 14161, Y 14158, X 68389, AJ 295080, AJ 295081, AF 156710, Y 14160, Z 94807, AFO 41444, AFO 41442, AF 479641, L 38825, UO 7934, U 50165, AJ 278249.....	130
Figura 31 - Árvore de consenso estrito entre as 88 árvores mais parcimoniosas resultantes da análise de parcimônia de 10 caracteres informativos de 16S de 19 espécimes de <i>Bacillus</i> . Passos = 69, CI = 0,9167, RI = 0,9412. Os números à frente dos ramos indicam o suporte de Bootstrap de 100 réplicas, cada uma com 100 buscas heurísticas, realizadas no PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000), que foram omitidos quando menores do que 50%. 18 corresponde a bactéria 18E. Os demais microrganismos tiveram suas seqüências 16S retiradas do GenBank (www3.ncbi.nlm.nih.gov) e correspondem, de cima para baixo na árvore, aos códigos de acesso: AFO 13121, AF 155957, AJ 288157, Y 15466, AF 417874, AF 390088, AF 363442, AF 290561, AF 290551, AF 206326, AF 176321, AF 155955, ABO 50630, ABO 21199, AJ 310100, AF 155952, Z 84594, Z 84585.....	131



- Figura 32 - Árvore de consenso estrito entre as duas mais parcimoniosas resultantes da análise de parcimônia de 28 caracteres informativos de 16S de 12 espécimes de *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium*. Passos = 59, CI = 0,7561, RI = 0,7872. Os números à frente dos ramos indicam o suporte de Bootstrap de 100 réplicas, cada uma com 100 buscas heurísticas, realizadas no PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000) que foram omitidos quando menores do que 50%. 24 corresponde a bactéria 24A. Os demais microrganismos tiveram suas seqüências 16S retiradas do GenBank (www3.ncbi.nlm.nih.gov) e correspondem, de cima para baixo na árvore, aos códigos de acesso: Z 30542, AF 239848, AJ 389903, AJ 389902, AJ 389901, AJ 130720, AF 239847, AF 195069, 388030, AF 357225, AF 316615..... 132
- Figura 33 - Resultado da identificação da bactéria 18E (*Bacillus*) através da matriz computacional do sistema de identificação API 50 CHB..... 165
- Figura 34 - Esquema para a realização do sistema de identificação API 50 CHB..... 166
- Figura 35 - Gabarito para marcar resultados da identificação convencional e utilizando o sistema de identificação API 50 CH..... 167



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Categorias e caracteres aplicados em sistemática bacteriana.....	55
Tabela 2 - Viscosidade do caldo de fermentação* para seleção das bactérias produtoras durante o período de incubação de 48, 72 e 96 h a 200 rpm e 30°C.....	74
Tabela 3 - Produção de polissacarídeo e determinação do peso celular seco das bactérias produtoras, após 96 h de incubação a 200 rpm e 30°C, utilizando o meio base acrescido de glicose a 2%.....	74
Tabela 4 - Dosagem de açúcares redutores residuais no caldo de fermentação* das bactérias 18E, 39A e 24A, durante o período de 120 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose 2%. 78	78
Tabela 5 - Dosagem de proteínas do caldo de fermentação das bactérias 18E, 39A e 24A durante o período de 120 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose a 2%.....	79
Tabela 6 - Dosagem de açúcares redutores residuais do caldo de fermentação da bactéria 18E, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.....	90
Tabela 7 - Dosagem de proteínas do caldo de fermentação da bactéria 18E, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.....	90
Tabela 8 - Dosagem de açúcares redutores residuais do caldo de fermentação da bactéria 39A, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.....	91
Tabela 9 - Dosagem de proteínas do caldo de fermentação da bactéria 39A, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.....	91



Tabela 10 - Dosagem de açúcares redutores residuais do caldo de fermentação da bactéria 24A, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.....	92
Tabela 11 - Parâmetros de fermentação na produção de polissacarídeos pela bactéria 39A, em meio contendo glicose a 1%, adicionado de diferentes concentrações da fonte de nitrogênio e incubado a 30°C, por 96 h e 200 rpm.....	99
Tabela 12 - Produção de polissacarídeos pela bactéria 24A, em meio contendo glicose a 1%, adicionado de diferentes concentrações da fonte de nitrogênio e incubado a 30°C, por 96 h e 200 rpm.....	100
Tabela 13 - Efeito do teor de ácido pirúvico na produção de polissacarídeos pelas bactérias 24A, 39A e 18E, incubadas a 30°C, por 96 h e 200 rpm.....	109
Tabela 14 - Características morfológicas das colônias e características morfotintoriais das bactérias isoladas, semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 h.....	118
Tabela 15 - Características bioquímicas e motilidade das bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras* de raízes, com 24h de crescimento a 30°C, semeadas em PCA.....	118
Tabela 16 - Atividade enzimática das bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras* de raízes, com 24h de crescimento à 30°C em PCA.....	119
Tabela 17 - Porcentagem de semelhança (de acordo com as características observadas) entre os gêneros das bactérias Gram positivas isoladas e o Bergey's Manual (1994).....	119
Tabela 18 - Porcentagem de semelhança (de acordo com os testes bioquímicos realizados) entre os gêneros das bactérias Gram negativas isoladas e o Bergey's Manual (1994).....	119
Tabela 19 - Provas bioquímicas da bactéria 18E para identificação da espécie do gênero <i>Bacillus</i> comparadas com o Manual Bergey's de Sistemática Bacteriana.....	121



Tabela 20 - Porcentagem de semelhança, de acordo com as características bioquímicas observadas entre as espécies do gênero <i>Bacillus</i> e o Manual Bergey's de Sistemática Bacteriana (1984).....	122
Tabela 21 - Resultados da fermentação de carboidratos para as bactérias 39A e 24A.....	125
Tabela 22 - Composição das tiras ou galerias do kit API 50 CH.....	164
Tabela 23 - Composição do meio API 50 CHB.....	164



FARIA, L. H. G. B. Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo. 2002. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, câmpus de São José do Rio Preto – SP.

RESUMO

As gomas hidrossolúveis ou hidrocolóides são polissacarídeos de origem vegetal, animal, marinha ou microbiana. O maior problema da utilização de hidrocolóides extraídos de fontes naturais é a escassez e a possibilidade de esgotamento das mesmas. Com o avanço da tecnologia, a utilização destes tem aumentado muito e com isso suas fontes naturais são cada vez mais exploradas, verificando-se a necessidade de procurar fontes alternativas de produção, de forma a racionalizar seu uso. Nesse sentido, as bactérias representam uma ótima fonte produtora alternativa. Foram selecionadas três culturas bacterianas produtoras de polissacarídeos e foram determinadas suas características nutricionais e tempo de incubação para uma ótima produção. Também foram realizados testes bioquímicos específicos para sua identificação. Durante a produção de polissacarídeos as culturas foram incubadas num meio base contendo uma fonte de carbono (glicose ou sacarose), uma fonte de nitrogênio (NaNO_3 , KNO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e sais minerais. As culturas foram incubadas num “shaker” rotatório a 200 rpm a 30°C por 96 h. Após esse período, as células foram separadas por centrifugação a 12000 rpm por 30 minutos e secas até peso constante. O sobrenadante foi precipitado com uma mistura de álcool-acetona (3:1 v/v) e seco até peso constante. A fonte de carbono selecionada para a bactéria 18E foi sacarose 1%; a fonte de nitrogênio, sulfato de amônio 15 mM, sendo que as nitrato de sódio e nitrato de potássio não foram indicadas devido à ausência de crescimento bacteriano; a temperatura selecionada foi 35°C e o pH foi



6,0; de acordo com os maiores rendimentos obtidos. A bactéria 39A apresentou maiores rendimentos com glicose a 1%, como fonte de carbono e nitrato de sódio a 5 mM, como fonte de nitrogênio; a temperatura ótima foi 30°C e o pH foi 7,0. A bactéria 24A apresentou maiores rendimentos com sacarose 1%, como fonte de carbono e nitrato de sódio 10 mM, como fonte de nitrogênio. As temperaturas de 25 e 30°C apresentaram os mesmos rendimentos e a faixa de pH escolhida foi 7,0-8,0. Foram determinadas as características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos produtores de polissacarídeos para sua identificação. A bactéria 18E apresenta 91,9% de possibilidade de acordo com o sistema de identificação API 50 CHB e pode ser classificada como *Bacillus cereus*. Técnicas de Biologia Molecular indicaram que a bactéria 18E apresenta 64% de similaridade com as seguintes espécies do gênero *Bacillus*: *B. pseudomycoides*; *B. mycoides*; *B. cereus* 1, 2 e 3; *B. anthracis* 1 e 2; *B. thuringiensis* 1 e *Bacillus* sp 1, 2 e 3. A bactéria 38A apresenta 98% de similaridade com *Mesorhizobium* sp2. Enquanto que a bactéria 24A analisada, apresenta 84% de similaridade as seguintes bactérias: *Agrobacterium larrymoorei*; *Bradyrhizobium japonicum* 1 e 2; *Agrobacterium tumefaciens* 1, 2 e 3; *Agrobacterium* sp e *Rhizobium* sp.

Palavras chaves: polissacarídeo, otimização do processo fermentativo, taxonomia bacteriana, PCR.



1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos hidrossolúveis utilizados na indústria de alimentos, também chamados de colóides hidrofílicos ou hidrocolóides, são polímeros de elevado peso molecular que se dissolvem ou se dispersam em água para agir como agentes espessantes, gelificantes, estabilizantes e encapsuladores. Além disso, mostram propriedades secundárias de emulsificantes. Os hidrocolóides são obtidos de uma grande variedade de fontes. Muitos podem ser de origem vegetal, tais como: algas, sementes ou exsudatos de vegetais superiores; outros podem ser de origem animal como a gelatina e ainda temos os hidrocolóides que são produtos de biossíntese microbiana (GARCIA-CRUZ, 2001).

As bactérias produzem uma ampla variedade de polissacarídeos, normalmente em pequenas quantidades, que são necessários para seu próprio benefício. Esses polímeros apresentam funções distintas na célula bacteriana: (a) internamente desempenham o papel na estocagem de carbono ou energia para a célula; (b) participam na estrutura da parede celular e (c) extracelularmente, atuam na prevenção de agressões ambientais como dessecação e ainda, como defesa contra outros microrganismos (MARGARITS & PACE, 1985; LOPES & ANDRADE, 1995; DEMAINE, 2000).

Em relação aos polissacarídeos de origem vegetal, estes representam três quartos do peso celular seco das plantas, portanto é esperado que estes polissacarídeos sejam abundantes e obtidos a baixos custos. Entretanto, os tecidos de plantas contêm misturas de polissacarídeos de onde os componentes individuais podem ser separados. Este processo de separação é química e mecanicamente complexo. Desta forma, os custos são elevados, uma vez que são utilizadas somente plantas ou partes delas que são ricas em



polissacarídeos e que podem ser processadas de forma simples (WHISTLER, 1993).

As fontes naturais de polissacarídeos ficam sujeitas a problemas como sazonalidade e escassez do produto. Desta forma os polissacarídeos microbianos podem ser produzidos sob condições controladas e com espécies selecionadas, onde problemas de variação de estrutura podem ser evitados. Além disso, os polissacarídeos microbianos apresentam alta regularidade estrutural, que é raramente encontrada em polímeros de outras fontes (LAPASIN & PRICL, 1995).

✱ Muitos polissacarídeos produzidos por bactérias têm propriedades reológicas diferentes dos polissacarídeos naturais e dos polímeros sintéticos. Eles são susceptíveis a biodegradação e são menos nocivos como poluentes ambientais que os polímeros sintéticos. Deste modo, alguns polissacarídeos são produzidos em escala industrial e usados em vários materiais da indústria alimentícia, farmacêutica e química (KAWAI et al., 1992).

✧ Atualmente, os polissacarídeos microbianos, também chamados exopolissacarídeos, representam somente uma pequena fração da tendência do mercado dos biopolímeros. Os fatores que limitam o seu uso são a produção, a qual requer um conhecimento completo da biossíntese e da tecnologia do bioprocessamento adaptada, e o alto custo da sua recuperação (De VUYST & DEGEEST, 1999).

O Brasil é dentre todos os países do mundo, o que possui a maior biodiversidade. Entretanto, se por um lado ela está à nossa disposição, por outro ela ainda é pouco explorada. A conservação e o uso da diversidade biológica com finalidades econômicas e sociais constitui-se um desafio que os brasileiros terão que enfrentar. Assim como existe uma potencialidade muito grande para exploração de plantas e animais, maior ainda é a potencialidade do uso de microrganismos (MELO & AZEVEDO, 1998).



São várias as espécies capazes de produzir polissacarídeos extracelulares que podem ser recuperados do meio de cultura, mas para isto temos que possuir o microrganismo identificado e através do conhecimento metabólico do mesmo, podem ser feitas alterações de substrato ou genéticas dos microrganismos visando uma produção de interesse industrial.

A utilização de bactérias como fonte de polissacarídeos industriais tem sido estimulada pela própria diversidade biológica destes organismos, pelo seu rápido crescimento e reprodução, e pela sua versatilidade nutricional. A capacidade dos microrganismos de sintetizar polissacarídeos de alto peso molecular e composição química elaborada, não encontra similaridade em nenhum componente do reino vegetal. Em relação à estrutura química, os polímeros de origem microbiana geralmente apresentam um alto grau de regularidade, o que é raro nos polissacarídeos obtidos a partir de outras fontes (LOPES & ANDRADE, 1995).

Muitas espécies bacterianas são desconhecidas, conseqüentemente, o conhecimento sobre ecologia bacteriana é pobre e a expectativa em relação às espécies com novas funções e produtos é alta (BUSSE et al., 1996).

As características fenotípicas empregadas como critérios na taxonomia convencional refletem apenas uma pequena fração da informação genética dos microrganismos. O desenvolvimento da biologia molecular possibilitou a aplicação de novas metodologias para a caracterização de microrganismos. Deste modo, o emprego da análise do DNA dos microrganismos para critérios taxonômicos apresentam como vantagem a unificação do conceito de espécie e obtenção de bons esquemas de identificação, fornecendo uma estabilidade na classificação destes, pois esta não fica dependente de modificações causadas por poucas mutações (SILVEIRA et al., 2000).



Aliando triagens ("screening") de microrganismos e desenvolvimento de processos para caracterização microbiana, podemos ter um desenvolvimento e otimização da biotecnologia nacional para obtenção de hidrocolóides e com isso contribuir para o desenvolvimento tecnológico e econômico do Brasil, pois possuímos os insumos básicos para sua produção e purificação, açúcar e álcool, desta forma poderíamos nos tornar independente de importações deste aditivos (LOPES et al., 1991).

Assim, a proposta deste projeto é explorar de forma racional os recursos naturais existentes, possibilitando a descoberta de linhagens selvagens de bactérias produtoras de polissacarídeos com potencial de utilização industrial.



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produção de exopolissacarídeos por bactérias selvagens isoladas de amostras do solo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a produção de exopolissacarídeos utilizando glicose e sacarose como fontes de carbono;
- Estudar a produção de exopolissacarídeos utilizando nitrato de sódio e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio;
- Verificar o efeito do pH e da temperatura;
- Verificar o efeito de diferentes fatores de crescimento (ácido succínico, pirúvico e α -cetoglutárico).
- Identificar as bactérias isoladas.



3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. POLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

As gomas podem ser definidas como moléculas de alto peso molecular, com características hidrofílicas, que usualmente possuem propriedades coloidais; além disso, algumas apresentam a capacidade de formar géis ao combinar-se com solventes apropriados. Desse modo, o termo gomas seria aplicado a uma grande variedade de substâncias com tais características. Porém, mais comum é a utilização do termo gomas para se referir a polissacarídeos (LOPES et al., 1991; PASQUEL, 1999).

Numerosos polissacarídeos com diferentes composições, tamanhos e estruturas são sintetizados por bactérias. Análises estruturais combinadas com estudos reológicos revelaram que há consideráveis variações entre os diferentes polissacarídeos; alguns apresentam propriedade de espessar e estabilizar, enquanto outros aumentam a viscosidade intrínseca (De VUYST & DEGEEST, 1999).

O uso de hidrocolóides na indústria de alimentos baseia-se principalmente no aproveitamento de suas propriedades funcionais, que estão relacionadas à capacidade de espessar, de manter partículas em suspensão e de reter água (GLICKSMAN, 1982).

Os exopolissacarídeos produzidos por uma grande variedade de microrganismos são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes. Devido a essa 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 e outras. Algumas dessas aplicações, dependendo de sua estrutura química, incluem seu uso como emulsificantes, estabilizantes, ligantes,



gelificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filme, espessantes e agente suspensores. Esses biopolímeros emergiram rapidamente como uma nova e importante fonte industrial de material polimérico e começaram gradualmente a competir economicamente com gomas naturais de algas marinhas e plantas. O potencial do uso de microrganismos geneticamente modificados, sob condições de fermentação controladas, pode resultar ainda na produção de novos exopolissacarídeos com propriedades melhoradas e possibilitar a abertura de novas áreas para aplicação industrial e, portanto, promover um aumento em sua demanda (LOPES et al., 1991; LOPES & ANDRADE, 1995).

O maior problema em relação à utilização de hidrocolóides extraídos de fontes naturais é a escassez, a sazonalidade e a possibilidade de esgotamento das mesmas (KOVACS & KANG, 1977). Com o avanço da tecnologia, a utilização desses hidrocolóides tem aumentado muito rapidamente e com isso suas fontes naturais são cada vez mais exploradas, verificando-se a necessidade de procurar fontes alternativas de produção, de forma a racionalizar seu uso. Nesse sentido, as bactérias representam uma ótima fonte produtora alternativa.

Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pelo Food and Drug Administration (FDA) desde julho de 1969 (FDA, 1969). A goma xantana comercial é produzida pela linhagem de *Xanthomonas campestris* utilizando xarope de glicose como fonte de carbono, derivados de amônia como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento sob condições aeróbias a 28°C e agitação constante. Após a fermentação, a goma é recuperada por precipitação com etanol, seca e moída (SOUW & DEMAINE, 1979; COTTRELL et al., 1980).

Outro polissacarídeo importante é a goma gelana, um biopolímero que é comercializado pela Kelco Co. (EUA) e vem sendo



apontado como um dos mais eficientes e multifuncionais hidrocolóides desenvolvidos até o momento. Foi o segundo polissacarídeo de origem microbiana a ser aprovado para uso em alimentos pelo FDA, em 1992. Sua descoberta deu-se em 1977, quando a bactéria produtora *Pseudomonas elodea* foi identificada pela primeira vez durante uma pesquisa para identificar novos microrganismos sintetizadores de gomas isolados do ambiente (PSZCZOLA, 1993).

3.2. FONTES DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

✕ Os polissacarídeos microbianos têm diferentes funções na célula microbiana. Podem ser componentes estruturais da parede celular, como lipopolissacarídeos e ácidos teicóicos; podem derivar dos mecanismos de reserva de carbono e energia da célula e, dependendo do sistema microbiano, podem formar cápsulas ao redor da parede celular ou difundir para o meio de cultura durante o processo fermentativo.

✕ De acordo com De Vuyst e Degeest (1999), no ambiente natural os exopolissacarídeos possuem o papel de proteger a célula microbiana contra dessecação e ataque de fagos, bem como de antibióticos e compostos tóxicos (íons metálicos tóxicos, dióxido de enxofre, etanol), de predadores como protozoários, do stress osmótico. Servem também para adesão em superfícies sólidas, formação de biofilme e reconhecimento celular (via ligação com lectina). ✕

A produção de exopolissacarídeos é baseada em muitas espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas, algumas algas e muitos fungos. Podem ser usados os mais diversos substratos: glicose, frutose, sacarose, lactose, amido hidrolisado, metanol e diferentes hidrocarbonetos (MARGARITIS & PACE, 1985).



3.3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

No processo de produção de polissacarídeo deve-se considerar desde o isolamento do microrganismo em estudo até a determinação dos parâmetros de fermentação, onde se destaca o meio de fermentação e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos exopolissacarídeos.

Devido ao controle das condições de cultivo, uso de enzimas e o uso de mutantes bacterianos, tem sido possível preparar polissacarídeos bacterianos com estruturas alteradas. Pequenos processos de degradação química têm sido úteis. Nota-se que diferentes espécies microbianas ou linhagens podem produzir uma variedade de polissacarídeos com similaridade estrutural. Esses polissacarídeos podem desenvolver uma determinada propriedade funcional de acordo com o menor ou maior grau de mudanças nas características estruturais dessas macromoléculas. Essas poucas diferenças podem mudar muito as propriedades biológicas dos polissacarídeos em relação a sua susceptibilidade às enzimas e sua capacidade e especificidade em relação a sua ligação com íons (SUTHERLAND, 1997).

A pesquisa de polissacarídeos é interdisciplinar e envolve um série de estágios, a qual se inicia com o isolamento e a seleção das linhagens produtoras e termina com a caracterização estrutural e físico-química dos polissacarídeos produzidos, como está detalhado na Figura 1.



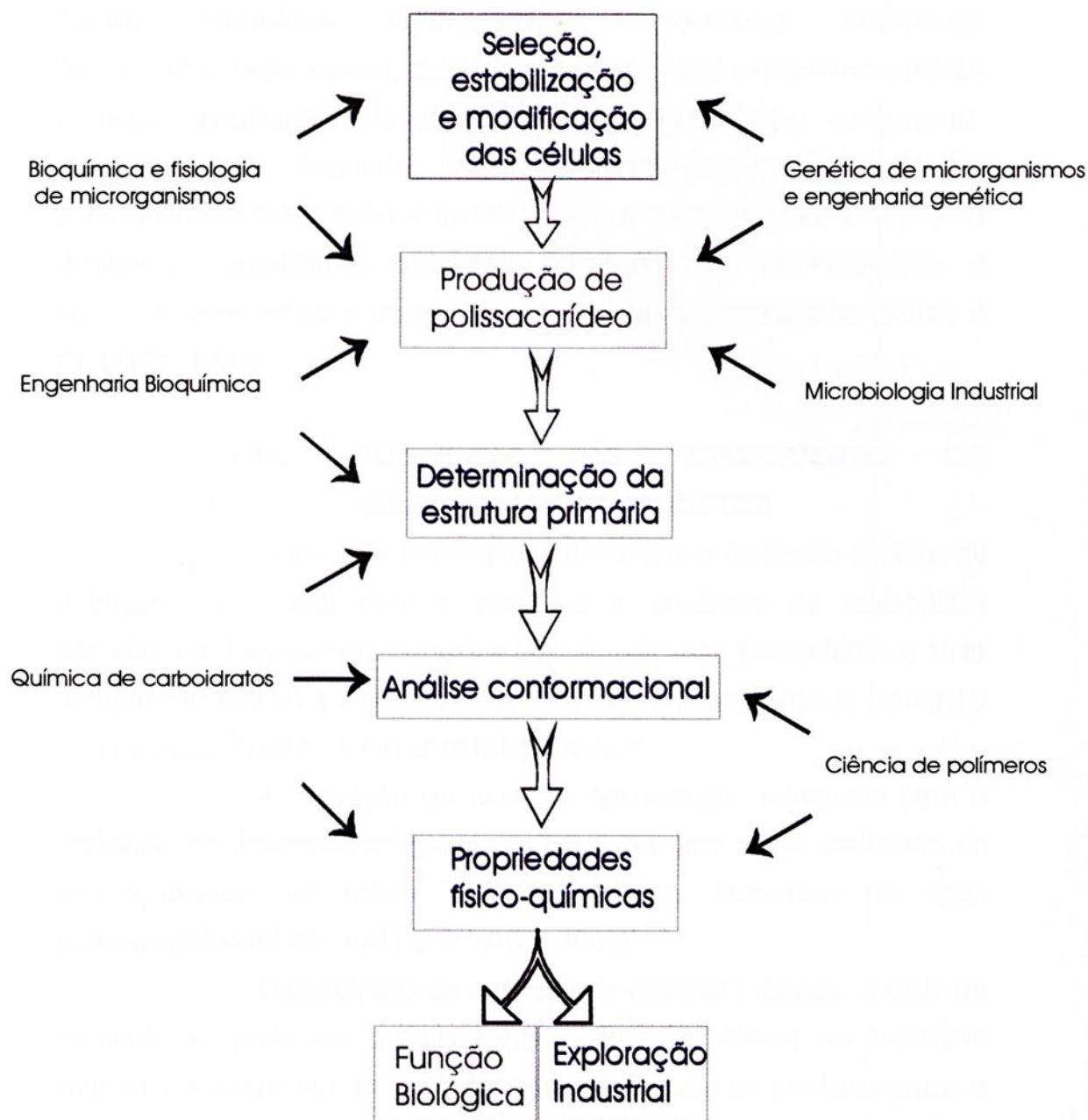


Figura 1. Representação esquemática das diferentes áreas envolvidas na pesquisa de polissacarídeos (CRESCENZI, 1995).

3.3.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Espécies de microrganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, entre outras, crescem em meio sólido produzindo colônias gomosas resultantes da produção de polissacarídeo extracelular. Somente uma pequena fração de microrganismos produzem polissacarídeo extracelular e os libera para o caldo de cultura, e poucos desses microrganismos convertem substrato para polissacarídeo, o suficiente para esta ser uma atividade econômica interessante (KANG & PETTITT, 1993).

3.3.2. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO PRODUTOR

O meio de fermentação determina o ambiente químico ou nutricional e é vital para a pesquisa e produção de metabólitos microbianos. Ele é o componente crítico do processo fermentativo e afeta diretamente não só a produtividade, mas também a viabilidade comercial do processo (ZHANG & GREASHAM, 1999).

A utilização do meio de fermentação adequado para a produção de diferentes exopolissacarídeos por uma ampla variedade de microrganismos irá refletir nas propriedades funcionais de cada polissacarídeo (MARGARITIS & PACE, 1985).

Dependendo da natureza do material utilizado, o meio de fermentação pode ser quimicamente definido (sintético) ou indefinido (natural ou complexo). O meio definido é composto de produtos puros e em proporções conhecidas, enquanto o meio complexo é formulado incluindo ingredientes de origem natural, cujas composições não são completamente conhecidas. Os meios empregados para fornecer alta produtividade em processos fermentativos comerciais são predominantemente formulados com fontes complexas e baratas de carbono e nitrogênio. O desempenho da fermentação pode variar de

acordo com a quantidade dos produtos indefinidos do meio, ocorrem variações indesejáveis na produtividade, que por sua vez, tem impacto altamente significativo nos produtos biológicos sintetizados pelos microrganismos (proteínas, polissacarídeos, etc). Já, os componentes do meio quimicamente definido são compostos químicos simples e sua concentração e sua estrutura são conhecidas, podendo ser empregados com sucesso em estudos bioquímicos e fisiológicos microbianos, uma vez que a sua interferência é mínima e os resultados são reprodutíveis (ZHANG & GREASHAM, 1999).

Na literatura são descritos vários meios de produção, entretanto a composição qualitativa é a mesma e cada suplemento apresenta uma determinada função na produção de polissacarídeos. Basicamente, os meios de produção de polissacarídeos apresentam uma fonte de fósforo (por exemplo, fosfato de potássio) e nitrogênio (por exemplo, sulfato de amônio) em concentrações adequadas para o crescimento do microrganismo; uma fonte de carbono (glicose, sacarose, manose, frutose e outras) como reserva energética e para a produção do polissacarídeo, e ainda oligoelementos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} e outros, que apresentam papel importante como cofatores enzimáticos das vias de produção de polissacarídeos (MARTINS et al., 1990; WONG, 1993; MADI et al., 1997).

A fonte de carbono é convertida pela célula microbiana em biopolímero dependendo do meio de fermentação e sob certos parâmetros fixos (pH, temperatura, tempo de incubação, proporção de carbono/nitrogênio, etc). Geralmente, concentrações limitantes de outros nutrientes e excesso de carboidratos favorecem a produção de polissacarídeos (SUTHERLAND, 1972).

Temos ainda diferenças na resposta individual de cada microrganismo envolvido no processo, onde a taxa de síntese de polissacarídeo para um microrganismo é influenciada pela limitação de um nutriente que pode não ser o mesmo para outra espécie microbiana.



Um alto rendimento é obtido quando ocorre a conversão de 70-80% da fonte de carbono utilizada em biopolímero (MARGARITIS & PACE, 1985).

Através de alterações na composição do meio de cultura podemos ter mudanças no comportamento físico-químico do biopolímero em solução e, desta forma, pode apresentar aplicações finais variadas. Essas alterações na molécula do polissacarídeo ocorrem em seus grupamentos substituintes das cadeias laterais e com isto, tem-se alterações no seu peso molecular e reologia. É importante destacar que as alterações não ocorrem na cadeia principal, pois esta é sempre a mesma e é determinada geneticamente (WHISTLER, 1993).

3.3.3. OUTROS PARÂMETROS QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Durante o crescimento e a produção de polissacarídeos, além do meio de fermentação, é necessário considerar a influência de parâmetros, tais como: pH, temperatura, taxa de oxigênio e taxa de cisalhamento.

A temperatura é um fator crítico na síntese de polissacarídeos. A faixa de temperatura para crescimento e produção dos polissacarídeos encontra-se entre 25-35°C; nesta, cada espécie bacteriana apresenta sua temperatura ótima (GANDHI et al., 1997; KAWAI et al., 1992; VERMANI et al., 1995). Esses mesmos autores verificaram que a faixa de pH para melhor produção de polissacarídeo está entre 6,0 – 7,0.

Enzimas responsáveis por alguns processos metabólicos de transferência de energia são afetadas por mudanças de pH e temperatura, afetando desta forma o balanço energético da célula. Por exemplo, a proporção de NADH/NAD⁺ influencia a atividade da enzima lactato deidrogenase; uma alta taxa inibe esta enzima (HOFVENDAHL et al., 1999).



O oxigênio é normalmente necessário para a síntese de componentes do polímero ou indiretamente na oxidação dos piridina nucleotídeos reduzidos. Entretanto, há pouca informação na avaliação dos efeitos da tensão de oxigênio dissolvido e do oxigênio utilizado para o crescimento e produção de polissacarídeos durante a fermentação (MARGARITIS & PACE, 1985). Em escala de laboratório, onde o processo fermentativo é realizado em frascos individualizados, essas informações são difíceis de serem obtidas, sendo necessária a utilização de fermentadores para esta avaliação.

O efeito do cisalhamento melhora a incorporação de oxigênio ao meio de cultura. Um maior cisalhamento aumenta a taxa de oxigênio dissolvido e, portanto, a produção do biopolímero (MARGARITIS & PACE, 1985). Na produção de alginato por *Azotobacter vinelandii* o peso molecular do polímero é influenciado pela taxa de oxigênio dissolvido no meio e pela agitação do caldo de fermentação, onde alta tensão de oxigênio produz mais alginato e baixas rotações (< 300 rpm) levam o microrganismo a produzir polímeros de alto peso molecular (PEÑA et al., 2000).✕

3.4. BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Na literatura há poucas informações sobre o processo da biossíntese dos diferentes tipos de exopolissacarídeos. Um bom entendimento do processo bioquímico é importante, pois estas informações podem ser usadas para controle e otimização da sua produção e também para ter conhecimento das características físico-químicas dos mesmos. Com o conhecimento do processo biossintético podem-se adaptar os processos tecnológicos com o objetivo de diminuir os custos (De VUYST & DEGEEST, 1999).✕



A síntese de exopolissacarídeos é claramente dividida em dois mecanismos distintos. Um processo é extracelular, sendo exemplificado pela síntese de dextrana e levana e outro processo intracelular, pelo qual a maioria dos exopolissacarídeos são sintetizados (MARGARITIS & PACE, 1985; SUTHERLAND, 1993).

Os exopolissacarídeos microbianos podem pertencer a quatro categorias: (1) dextranas e levanas, que são sintetizadas por uma grande variedade de bactérias, algumas espécies são capazes de produzir ambos polímeros. Além disso, pertence a esse tipo de polímero a "mutana", que é insolúvel e esta formada por ligações α -(1-3) D-glicana, sintetizada por culturas de *Streptococcus mutans*; (2) homopolissacarídeos que não são levanas, dextranas e mutanas; (3) heteropolissacarídeos que possuem unidades repetidas regulares; (4) heteropolissacarídeos com estruturas irregulares (SUTHERLAND, 1993).

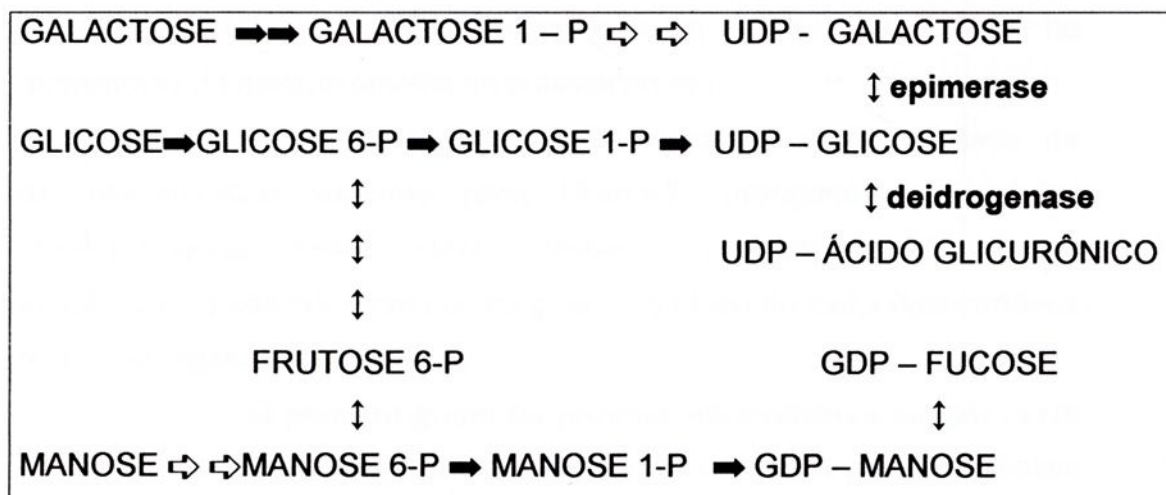
3.4.1. BIOSÍNTESE CELULAR DE EXOPOLISSACARÍDEOS

Na biossíntese celular de exopolissacarídeos surgem conceitos importantes para sua explicação e os precursores ocupam um espaço importante. Somente um grupo reduzido de exopolissacarídeos requerem precursores como substratos específicos na sua biossíntese; na maioria dos casos, a síntese e composição é independente do substrato utilizado para crescimento pelo microrganismo. Dextranas e polissacarídeos correlatos diferem, devido ao fato de que a síntese é extracelular, pois as espécies que sintetizam dextrana requerem sacarose como substrato específico e na sua ausência o polímero não é formado (SUTHERLAND, 1993).

Os carboidratos precursores são exopolissacarídeos sintetizados intracelularmente e excretados para o ambiente extracelular; eles requerem para sua produção açúcares nucleotídeos, usualmente são



monossacarídeos difosfato nucleosídeos. Esses compostos funcionam como ativadores, formas ricas em energia, e são os precursores imediatos necessários para unir as unidades repetidas oligossacarídicas que formam a maioria dos exopolissacarídeos. Os açúcares nucleotídeos cumprem dois importantes papéis adicionais, eles são precursores de vários outros monossacarídeos que são sintetizados na forma ativada, e alguns são importantes na regulação do anabolismo de carboidratos (Figura 2). As modificações encontradas no metabolismo de açúcares nucleotídeos são: epimerização, oxidação, descarboxilação, redução e rearranjos. A pouca capacidade para a síntese do açúcar nucleotídeo resulta, inevitavelmente, em menor produção de polissacarídeos. O controle pode ser realizado pela regulação do suplemento de açúcares nucleotídeos (SUTHERLAND, 1993).



⇔ = Sistema catabólico usado em substratos específicos

P = Grupo monoéster fosfato

Figura 2. Síntese e interconversão de açúcares nucleotídeos difosfato envolvidos na síntese de exopolissacarídeos.

De acordo com Sutherland (1972), as enzimas envolvidas na biossíntese de exopolissacarídeos podem ser classificadas em quatro tipos:

Grupo I: enzimas que estão envolvidas no metabolismo inicial do substrato, como as hexoquinases;

Grupo II: enzimas responsáveis pela síntese e interconversão dos açúcares nucleotídeos (exemplo: enzima UDP-glicose fosforilase e UDP-glicose deidrogenase);

Grupo III: transferases, enzimas responsáveis pela formação de unidades monossacarídicas repetidas, ligadas ao carreador lipídico;

Grupo IV: translocases ou polimerases, que formam a molécula do exopolissacarídeo.

Cada grupo destas enzimas está localizado em diferentes regiões da célula microbiana e apresentam funções específicas na biossíntese da macromolécula do polissacarídeo.

A Figura 3 representa o modelo da biossíntese de exopolissacarídeo sugerida para *Klebsiella aerogenes* e espécies correlacionadas. Esse modelo descreve as reações bioquímicas envolvidas e pode ser usado como guia na síntese de exopolissacarídeos de outras espécies microbianas.

O primeiro grupo de enzimas intracelulares também está envolvido em outro processo metabólico da célula. A primeira dessas enzimas, a hexoquinase, está envolvida na fosforilação da glicose (Glc) para glicose 6-fosfato (Glc-6-P) e a segunda enzima, fosfoglicomutase, converte Glc-6-P em Glc-1-P.

Do segundo grupo de enzimas intracelulares, a uridina difosfato-glicose fosforilase (UDP-glicose fosforilase), cataliza a conversão de Glc-1-P para uridina difosfato-glicose (UDP-Glc), que é o açúcar nucleotídeo chave mais importante, uma vez que a UDP-Glc é o precursor

durante a biossíntese de exopolissacarídeos. Nesse ponto é importante enfatizar a dupla função dos açúcares nucleotídeos como a UDP-Glc na biossíntese dos exopolissacarídeos. Uma delas é a interconversão da UDP-Glc para o açúcar nucleotídeo UDP-galactose (UDP-Gal) com a enzima UDP-galactose-4-epimerase e/ou interconversão do açúcar nucleotídeo UDP-ácido glicurônico (UDP-Glc UA) com a enzima UDP-glicose deidrogenase. A outra função do açúcar nucleotídeo, é funcionar como doador de resíduos monossacarídicos durante a biossíntese da molécula do exopolissacarídeo. A coenzima uridina difosfato (UDP) é um carreador essencial para os resíduos monossacarídicos que começam a ser ativados e transferidos para um aceptor específico durante a biossíntese do polímero.

O terceiro grupo de enzimas está localizado no espaço periplamático da célula e é referido como glicosiltransferases. Estas enzimas, estão envolvidas na transferência dos açúcares nucleotídeos, UDP-glicose ou UDP-galactose e/ou UDP-ácido glicurônico para a forma de unidades repetidas ligadas ao carreador lipídico presente na membrana celular. Durante esse passo, a UDP é liberada, enquanto o açúcar é ligado ao carreador lipídico.

O quarto grupo destas enzimas são as translocases ou polimerases que supõe-se estarem localizadas na parte externa da membrana celular e parede celular. Entretanto, não se sabe muito sobre essas enzimas. Presume-se que elas estão envolvidas na polimerização de macromoléculas e em seguida na eliminação dos exopolissacarídeos na superfície da célula sob a forma de limo viscoso ou como uma cápsula polissacarídica ao redor da célula. O mecanismo exato do processo de eliminação da macromolécula do exopolissacarídeo não é bem conhecido.



Localização	Função	Reações					
Espaço Intracelular e membrana	Formação de precursores	Glicose → Glicose 6-fosfato → Glicose 1-fosfato ↓ UDP-glicose ↔ UDP-galactose ↓ UDP-ácido glicurônico					
Membrana	Assimilação dos açúcares e repetição das unidades	UDP-glicose ↓ → UMP ↓ ↓ [Glicosil fosfato]	UDP-galactose ↓ → UMP ↓ → → ↓ Carreador lipídico	UDP -----	UDP-ácido glicurônico ↓ → UDP ↓ Fosfato -Glc-Gal -Gal -	GlcA	
Membrana	Polimerização	GCL - P - P - Glc -	Gal - Gal - GlcA	+	GCL - P - P - Glc -	Gal - Gal - GlcA	
				↓			
				↓			
			GCL - P - P - Glc	- Gal -	Gal - Glc - Gal - Gal		
				↓			
				GlcA	↓	GlcA	+ GLC-pirofosfato
				↓			
Membrana e parede celular	Transferência p/ o receptor (e extrusão ?)		Aceptor-[Glc - Gal	- Gal] _N	+ GCL - pirofosfato		
				↓			
				GlcA			

Figura 3. Modelo das reações bioquímicas envolvidas durante a biossíntese de exopolissacarídeo por *Klebsiella aerogenes* tipo 8 e espécies correlacionadas (Sutherland, 1972).

3.4.2. BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEO FORA DA CÉLULA MICROBIANA

A biossíntese de homopolímeros como a dextrana e levana, é catalizada por enzimas extracelulares ativadas por açúcares específicos, e muitas das limitações associadas com o processo tradicional de fermentação não são aplicadas na produção destes biopolímeros. Por exemplo, muitos produtos comerciais a base de dextrana podem ser sintetizados utilizando dextrana-sacarase imobilizada (KOBOLI & REILLY, 1980) ou dextrana-sacarases isoladas das células nativas (JEANES, 1974). Na produção da dextrana não há produção de intermediários ativados, não há competição pelo substrato da síntese da parede celular e para outros requerimentos celulares. Entretanto, certas espécies bacterianas produzem dextranas e levanas, e a taxa relativa de síntese desses polímeros possui absoluto requerimento de sacarose, mas pode ser dependente de vários outros fatores. A enzima cliva a sacarose liberando frutose e transferindo a unidade α -D-glicopiranosil para a molécula aceptora (SUTHERLAND, 1993).

Em contraste aos homopolissacarídeos, na síntese dos heteropolissacarídeos estão envolvidas várias enzimas e cofatores, assim a produção comercial desses biopolímeros por síntese química sem a participação da célula ou a utilização de células imobilizadas é pouco provável (Margaritis & Pace, 1985).

3.5. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE NOVAS LINHAGENS MICROBIANAS PRODUTORAS

O Brasil é dentre todos os países do mundo, o que possui a maior biodiversidade. Entretanto, se por um lado ela está a nossa disposição, por outro ela ainda é pouco explorada. A conservação e o uso da diversidade biológica com finalidades econômicas e sociais constitui-se

um desafio que os brasileiros terão que enfrentar. Assim como existe uma potencialidade muito grande para exploração de plantas e animais, maior ainda é a potencialidade do uso de microrganismos (MELO & AZEVEDO, 1998).

São várias as espécies capazes de produzir polissacarídeos extracelulares que podem ser recuperados do meio de cultura, mas para isto temos que possuir o microrganismo identificado e através do conhecimento das necessidades metabólicas do mesmo, podem ser feitas alterações de substrato ou genéticas visando uma produção de interesse industrial.

As bactérias possuem importância indiscutível na sustentabilidade da biosfera e têm papel preponderante nos ciclos biogeoquímicos. O número de espécies descritas na literatura, cerca de 4.200, a maioria representada por organismos cultivados, está muito aquém do estimado, representando menos de 1% do total de espécies existentes na natureza (CANHOS et al., 1999).

O isolamento e a seleção de novas linhagens microbianas produtoras são realizados com o objetivo de encontrar espécies que apresentem altos rendimentos na produção de polissacarídeos e tenham boa estabilidade e reprodutibilidade durante a produção dos mesmos, pois é amplamente aceito que linhagens isoladas do ambiente apresentam perdas ou mudanças de suas características originais quando submetidas a vários processos de cultivo "in vitro" (CRESCENZI, 1995).

Com a utilização de programas de isolamento de bactérias do ambiente, podem ser encontradas novas espécies produtoras de polissacarídeos, e por meio da determinação da estrutura química e de suas propriedades físico-químicas pode-se verificar se estas propriedades funcionais são melhores ou apresentam potencial para serem melhoradas (De VUYST & DEGEEST, 1999).

Portanto, a produtividade e outros aspectos do processo de fermentação são altamente dependentes do desenvolvimento de



linhagens superiores via mutagênese e procedimentos de "screening" ao acaso, bem como otimização do ambiente químico e físico em que o organismo é exposto (ZHANG & GREASHAM, 1999). Contudo, podemos encontrar espécies microbianas diferentes que produzam o mesmo polissacarídeo e, desta forma escolher aquelas que apresentem os melhores rendimentos. Portanto, é necessário realizar a identificação do microrganismo produtor.

3.6. CLASSIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os microrganismos produzem exopolissacarídeos que apresentam uma ampla variedade de propriedades químicas e físicas. Estas são devidas à variedade estrutural o que permite também aplicações industriais variadas. Os exopolissacarídeos recuperados facilmente do caldo de fermentação e produzidos em grandes quantidades pelos microrganismos possuem grande potencial de comercialização (LAPASIN & PRICL, 1995).

Os polissacarídeos microbianos resultam da condensação de unidades monossacarídicas. Eles podem ser classificados em dois tipos: homopolissacarídeos, que contém em sua molécula apenas um tipo de açúcar e heteropolissacarídeos, que contém mais de um tipo de açúcar. A síntese de heteropolissacarídeos por microrganismos que utilizam alguma fonte de carbono disponível envolve sistemas enzimáticos complexos, no entanto, a síntese de homopolissacarídeos envolve apenas uma enzima ou um sistema enzimático simples. De acordo com o arranjo estrutural das unidades monoméricas, os polissacarídeos podem ser lineares ou ramificados. Outra distinção entre eles, está baseada em suas cargas, que podem ser aniônicas, neutras ou catiônicas. Entre os polissacarídeos aniônicos, podemos citar a goma xantana e o alginato. Como exemplo de polissacarídeos neutros, temos a levana,



escleroglucana, pululana, dextrana e curdlana. Outros polissacarídeos apresentam propriedades aniônicas, e contém grupos ácidos, tais como carboxilas, fosfatos e sulfatos. Outros ainda podem, em seu estado natural, apresentar alguns grupos aminos livres e desta forma possuem propriedades catiônicas (MARGARITIS & PACE, 1985).

De acordo com Lapasin & Pricl (1995), na construção das cadeias de polissacarídeos, os monômeros de açúcares apresentam ligações químicas de natureza covalente em C (1), através de uma ponte de oxigênio, com o átomo de carbono da unidade seguinte, essas ligações são conhecidas como glicosídicas. As cadeias com peso molecular muito alto podem ser ligadas desta forma, onde a construção dos blocos de açúcares são fixados no C (1) do anel. Muitos monossacarídeos ocorrem naturalmente, podendo ser considerados como derivados da glicose na forma piranose, onde podem apresentar diferentes configurações no átomo da carbono, substituição do grupo $-CH_2OH$ com outro grupo funcional como $-H$, $-CH_3$ ou $-COOH$, substituição do grupo $-OH$ com outro grupo funcional como $-NHCOCH_3$, SO_4^{2-} ou $-NH_2$ e várias outras substituições.

3.6.1. DEXTRANA

A dextrana foi o primeiro polissacarídeo microbiano produzido em escala industrial. Esta teve início na Suécia entre 1942 e 1944, posteriormente na Inglaterra em 1947, e por último nos Estados Unidos em 1949 (LOPES & ANDRADE, 1995).

A dextrana é um homopolissacarídeo extracelular ramificado, sintetizado por *Leuconostoc mesenteroides* e está constituída por unidades de D-glicose, unidas por ligações $\alpha(1-6)$. A Figura 4 representa a estrutura química da goma dextrana. Esta é empregada pelas indústrias alimentícias, cosmética, fotográfica e farmacêutica. A dextrana é utilizada como extensor do plasma sanguíneo e como

componente base para a fase estacionária de cromatografia de coluna (CRESCENZI, 1995).

Entre outras aplicações industriais da dextrana, é interessante destacar seus usos em: medicina veterinária (Fe^{2+} -dextrana como fonte de ferro), recuperação secundária e perfuração de poços de petróleo, além de seu uso em alimentos (VANDAMME et al., 1996).

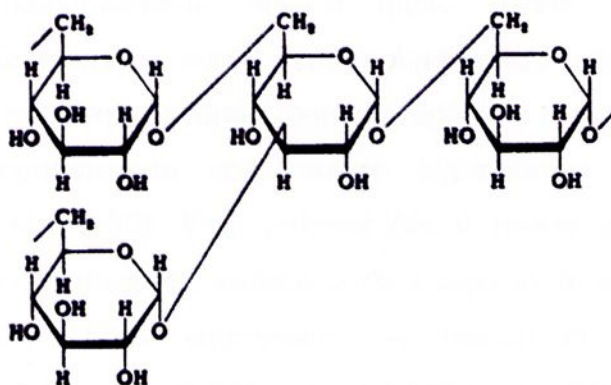


Figura 4. Estrutura química da goma dextrana

3.6.2. XANTANA

A goma xantana é produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é um heteropolissacarídeo ramificado não gelificante, cuja cadeia principal é formada por unidades de β -D-glicose e na cadeia ramificada apresenta um trissacarídeo composto de 2 unidades de manose (β 1-4) e uma de ácido glicurônico (β 1-2) que está ligado de modo alternado às unidades de D-glicose por ligações α 1-3 (JANSSON et al., 1975). A goma xantana apresenta ainda, em sua composição química, um grupamento acetila e um piruvato (Figura 5). O teor em grupamentos substituintes no polissacarídeo, principalmente grupos piruvato, pode variar conforme a linhagem bacteriana utilizada, as condições de cultivo e os processos pós-fermentativos empregados para

a recuperação e purificação da goma (BECKER et al., 1998). A variação na proporção dos grupos acetila e piruvato pode afetar de forma acentuada o comportamento físico-químico da goma xantana em solução.

A goma xantana, sob a forma de sal de sódio e/ou potássio, é empregada comercialmente em produtos alimentícios ou para uso industrial. Atualmente, os maiores fabricantes de xantana são a Kelco Company Inc., nos Estados Unidos, com uma produção média de 14.000 toneladas/ano. Industrialmente ela é muito usada devido suas propriedades físico-químicas como pseudoplasticidade, alta viscosidade independente de pH, temperatura e concentração de sais, além de não apresentar incompatibilidade com outros ingredientes do alimento (VANDAMME et al., 1996). Este polieletrólito é usado em alimentos, basicamente como espessante, estabilizante e agente de suspensão em sistemas aquosos, sendo empregado na fabricação de xaropes, concentrados à base de frutas ou legumes, sorvetes, alimentos congelados, enlatados e dietéticos (KOVACS & KANG, 1977). Dentre inúmeras outras aplicações a xantana é utilizada como espessante/estabilizante de tintas para estamparia em tecidos, em detergentes e explosivos plásticos, e na recuperação secundária e terciária de poços de petróleo, em fluidos de fraturamento hidráulico. A goma xantana vem sendo associada a outros polissacarídeos hidrossolúveis, como galactomananas, utilizadas como gelificantes em produtos alimentícios (LOPES & ANDRADE, 1995).



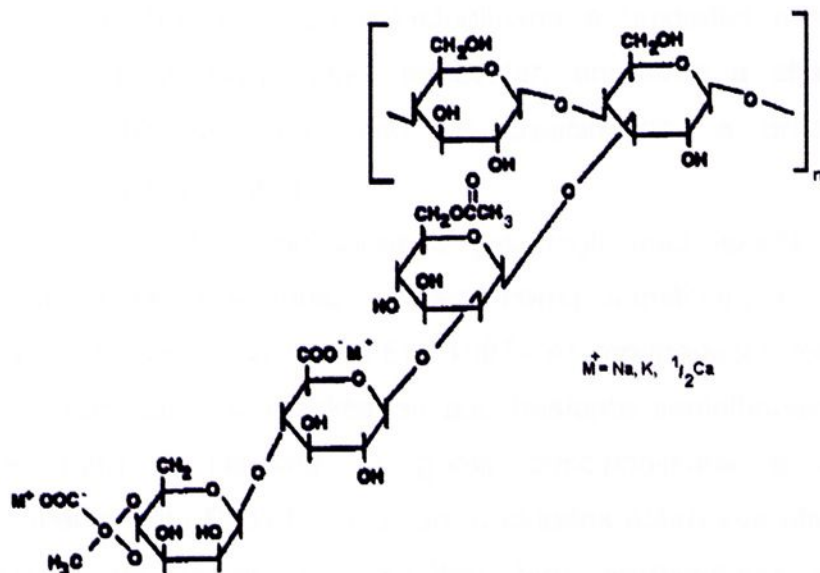


Figura 5. Estrutura química da goma xantana.

3.6.3. SUCCINOGLICANAS E GALACTOGLICANAS

Succinoglicanas e Galactoglicanas é o nome genérico de um grupo de polissacarídeos aniônicos ramificados, formados por unidades de D-glicose e D-galactose. Estas gomas são sintetizadas por diferentes espécies dos gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Rhizobium* (SUTHERLAND, 1994).X

De acordo com Zevenhuizen (1997), a pressão osmótica do meio em que a bactéria em estudo cresceu ou em que foi isolada, determina o mecanismo que o microrganismo segue para a produção de galactoglicanas ou succinoglicanas. Em geral, a baixa osmolaridade, que sempre prevalece em comunidades de água doce, dá origem a microrganismos entre os quais bactérias produtoras de galactoglicanas são predominantes. Enquanto, um solo com salinidade variável, a maioria das vezes, dá origem a bactérias que produzem succinoglicanas. Bactérias que sintetizam ambos tipos de polissacarídeos, como

Rhizobium meliloti, excretam a baixa pressão osmótica no meio de crescimento, o polímero tipo galactoglicana e unidades repetidas de succinoglicanas de baixo peso molecular, enquanto a alta pressão osmótica (> 10 atm) no meio de crescimento, a produção de succinoglicana é estimulada.

As succinoglicanas e galactoglicanas apresentam uma cadeia lateral tetrassacarídica e tem como substituintes os ácidos succínico e pirúvico (ZEVENHUIZEN, 1997). As propriedades reológicas e físico-químicas das succinoglicanas são bastante semelhantes às aquelas descritas para a xantana. A goma succinoglicana é produzida industrialmente pela Shell Co. inglesa, e estudos sobre sua utilização na recuperação de poços de petróleo tem apresentado resultados promissores (VANDAMME et al., 1996).

A Figura 6 representa as estruturas químicas das unidades repetidas de succinoglicana (a) e galactoglicana (b).



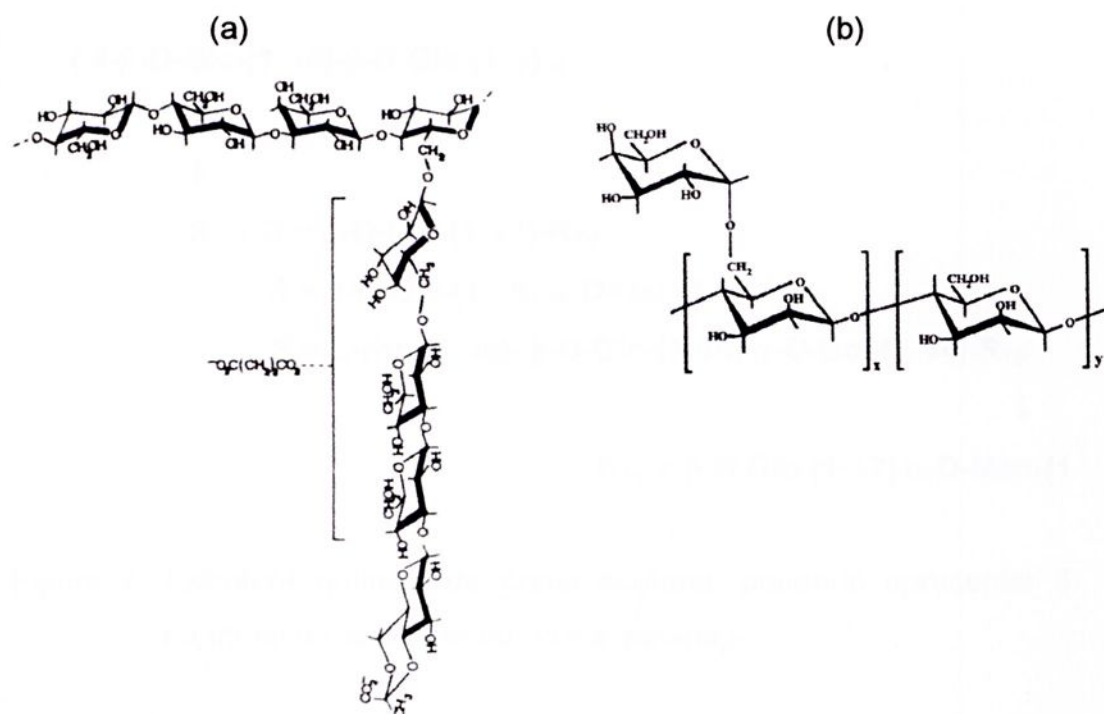


Figura 6. Estruturas química das gomas (a) succinoglicana e (b) galactoglicana.

3.6.4. ACETANA

A acetana é outro polissacarídeo de origem bacteriana e é produzida pela bactéria *Acetobacter xylinum*. Apresenta características estruturais e físico-químicas similares às da goma xantana (Figura 7). O esqueleto polimérico é idêntico ao da xantana, as duas primeiras unidades monossacarídicas da ramificação são iguais, além do tipo de ligação glicosídica entre a cadeia principal e ramificada. Esta identidade estrutural e as semelhanças observadas face ao comportamento reológico, favorecem a hipótese de que ambos os polissacarídeos adotam o mesmo tipo de conformação ordenada em solução (LOPES & ANDRADE, 1995).

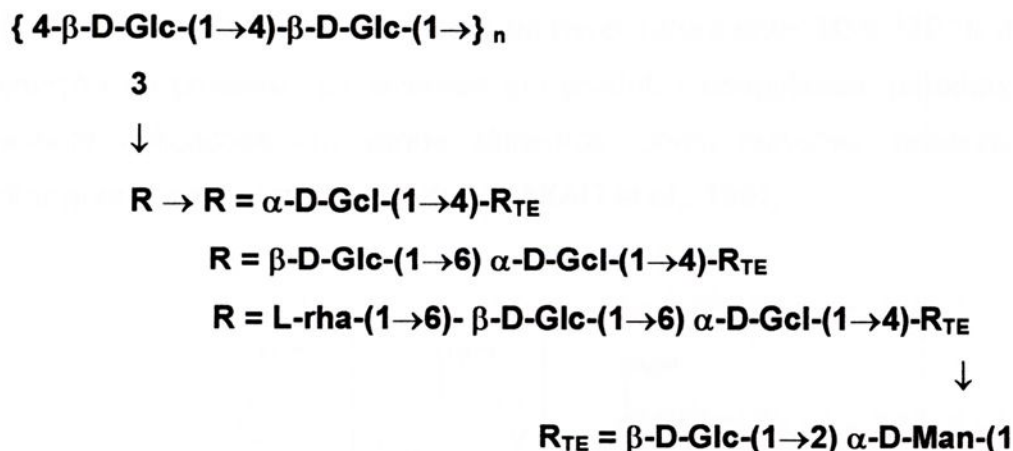


Figura 7. Estrutura química da goma acetana, podendo apresentar 4 resíduos de açúcares como substituintes.

3.6.5. CURDLANA

A curdlana é sintetizada por *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* e algumas espécies do gênero *Agrobacterium*. É formada exclusivamente por unidades de β -D-glicose, com ligações glicosídicas β 1-3 (Figura 8). O gel formado por este polímero apresenta propriedades intermediárias entre a rigidez do gel de ágar e a elasticidade da gelatina. Industrialmente, a curdlana pode ser utilizada como gelificante em ração animal, ligante para tabaco e como agente imobilizador de enzimas. Derivados sulfatados da curdlana apresentam efeito anticoagulante. Até o início da década de noventa, a goma curdlana era produzida principalmente pela empresa japonesa Takeda Chemical Ind. (LOPES E ANDRADE, 1995).

Em relação ao seu uso em alimentos, vários estudos indicam que a curdlana não possui valor calórico, podendo ser empregada em alimentos de baixa caloria (SANDFORD, 1979).

Uma propriedade interessante da curdlana, é o aumento da firmeza de seu gel com o aumento da temperatura entre 80 e 130 °C e diminuição do processo de sinerese em produtos congelados, portanto, apresenta aplicações em vários alimentos, como sorvetes, talharim, hambúrguer e alimentos congelados (NAKAO et al., 1991).

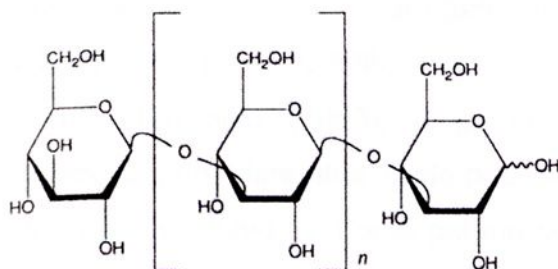


Figura 8. Estrutura química da goma curdlana.

3.6.6. FAMÍLIA GELANA

No início dos anos oitenta, a pesquisa de novos polímeros de origem bacteriana, desenvolvida pela Kelco, Division of Merck Co. Ind., resultou na produção de um novo grupo de polissacarídeos hidrossolúveis, constituído pelas gomas: gelana, welana, ramnsana (Figuras 9, 10a e 10b) e S-198 e S-657.

GELANA: é sintetizada por *Pseudomonas elodea*, no estado nativo forma um gel macio e elástico. Porém, após desacetilação, há produção de um gel bastante rígido e estável devido ao aumento das interações intermoleculares. A gelana é comercializada sob o nome GELRITE e foi aprovada pelo FDA para uso em alimentos em 1992. Ela é considerada como um substituto potencial do ágar, empregado como meio sólido para cultura de microrganismos e de tecidos vegetais, além de possuir aplicações como espessante, agente de suspensão e gelificação em diversos produtos (LOPES & ANDRADE, 1995).

Há duas formas de goma gelana. Uma forma é parcialmente acetilada (goma gelana de alta acetilação) e fornece um gel termorreversível que é bastante suave e não quebradiço. Na maioria das aplicações em alimentos, é utilizada a goma gelana de baixa acetilação, uma vez que forma um gel firme, translúcido e mais rígido. Esta propriedade permite a goma gelana de baixa acetilação sua utilização em alimentos e vários produtos que requeiram um gelificante altamente claro e translúcido (SANDERSON & CLARK, 1983).

Segundo Pszczola (1993), a goma gelana apresenta várias vantagens no seu uso em alimentos, onde pode-se destacar:

- Liberação de flavor: a goma gelana se liga com a água de uma forma tal que libera o flavor dos alimentos rapidamente. Por exemplo, em formulações com goma gelana em recheio de frutas, contribui para aumentar a liberação do flavor, enquanto fornece uma textura suave;

- Estabilidade: a goma gelana apresenta estabilidade ao aquecimento, mantêm um gel firme sob uma ampla faixa de pH (3,5 - 8,0) e condições de estocagem. Para formação dos géis são utilizadas baixas concentrações, geralmente de 0,05 a 0,40 %;

- Reversibilidade térmica: o gel pode ser formulado para fundir sob aquecimento ou manter sua estrutura em altas temperaturas;

- Alta transparência: o gel de goma gelana contém 15% de açúcares cristalinos;

- Dispersibilidade: a goma gelana dispersa bem, sem formar grumos. Não requer etapas de pré-mistura;

- Fácil utilização: os géis são produzidos pela adição da goma gelana em água, sob agitação e aquecimento a 75°C, adicionando íons e resfriando para endurecer. Podem ser utilizados íons monovalentes e divalentes;



- Compatibilidade: a goma gelana é compatível com grande variedade de outros polissacarídeos e proteínas. Por exemplo, combinando a goma gelana com as gomas xantana e locuste, produz texturas variadas. A combinação da goma gelana e gelatina produz um gel sem necessidade de refrigeração e não funde com aquecimento. A mistura de goma gelana com o amido, é uma nova forma de aplicação sem precisar de modificações químicas do mesmo. Nestas, os níveis de amido podem ser diminuídos enquanto libera-se o flavor; serve também para estabilizar pastas de amido e reter a água.

A goma gelana pode ser usada como agente gelificante, texturizante, estabilizante e formador de filmes de revestimento, podendo substituir outros hidrocolóides ou ser utilizada em combinação com os mesmos. Suas principais aplicações incluem produtos de panificação e confeitaria, na forma de recheios ou coberturas, produtos lácteos, emulsões, sorvetes, geléias, sobremesas ou rações para animais domésticos. A ótima consistência e grande transparência dos géis formados possibilitam a substituição do ágar em meios de cultura.



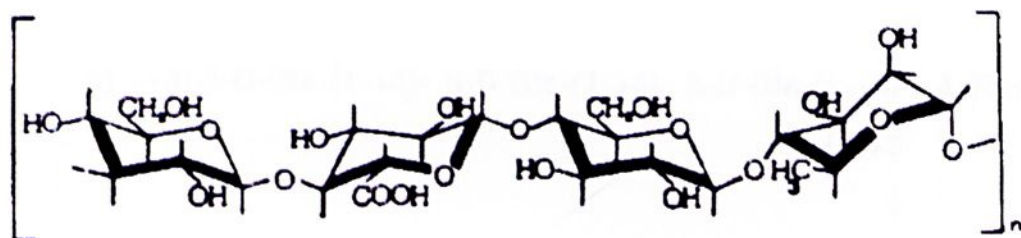


Figura 9. Estrutura química da goma gelana

WELANA E RAMSANA: são exopolissacarídeos ramificados sintetizados por bactérias do gênero *Alcaligenes* ATCC 31555 *Alcaligenes* ATCC 31961, respectivamente; apresentam a mesma cadeia principal que a gelana, diferindo nos resíduos de açúcar da cadeia lateral (Figura 10); não formam gel, porém produzem soluções altamente viscosas e termoestáveis. A goma welana, inicialmente denominada S-130 é comercializada pela Kelco Co. Inc. sob a marca registrada BIOZAN. A alta viscosidade apresentada pela welana a baixas taxas de cisalhamento, e a baixa viscosidade a altas taxas de cisalhamento, contribuem para que este polímero possa ser utilizado como um excelente agente de suspensão, tal qual a goma xantana. A rigidez da cadeia macromolecular e sua grande estabilidade conformacional frente a variações de pH, temperatura e concentração de eletrólitos, capacitam a goma welana para o uso no campo petrolífero, principalmente, como aditivo de fluidos de fraturamento hidráulico. A possibilidade de formação de interações intermoleculares fortes e estáveis, e a compatibilidade da welana em relação ao cálcio, conferem à goma aplicação potencial nas indústrias de cimento e concreto. Na verdade, as propriedades da goma

welana em solução aquosa possibilitariam sua aplicação como poderoso agente de suspensão e espessante em diversos produtos (LOPES & ANDRADE, 1995).

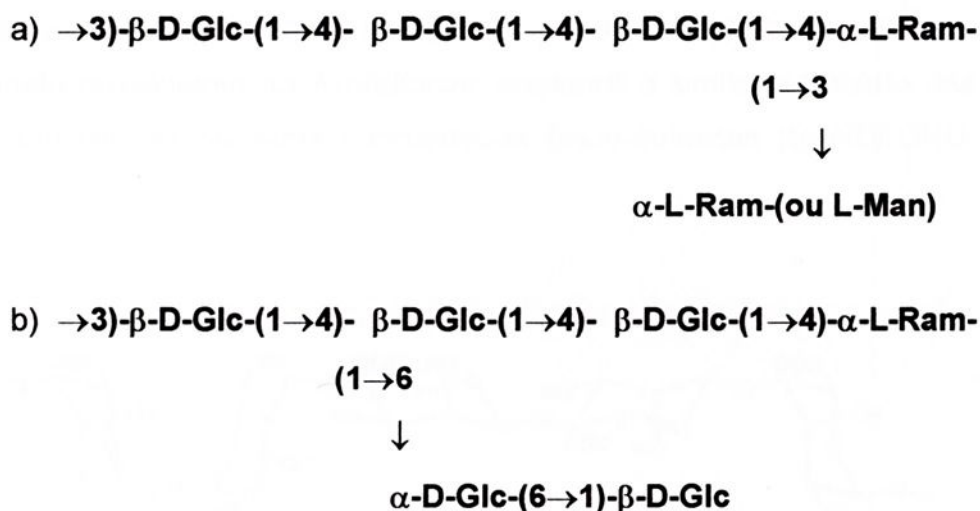


Figura 10. Estrutura química das gomas (a) welana e (b) ramsana

3.6.7. ALGINATO

De acordo com Vandamme et al. (1996), os alginatos bacterianos são produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii*, sua estrutura e aplicações assemelham-se às algas marrons *Laminaria* sp., *Macrocystis* sp. e *Ascophyllum* sp. A base desse heteropolissacarídeo é o ácido 1,4 acetil- β -D-manurônico acoplado com ácido α -L-glicurônico (Figura 11). Esses monômeros podem ser organizados em blocos de resíduos de ácido β -D-manurônico (blocos M) consecutivos, resíduos de ácido α -L-glicurônico consecutivos (blocos G), ou alternando M e G (blocos MG); a quantidade relativa de cada tipo de bloco varia entre os diferentes alginatos (ERTESVAG & VALLA, 1998).

Íons Ca^{2+} são essenciais para a gelificação. Entre suas aplicações pode-se destacar como matriz imobilizadora de células e

enzimas; cobertura de raízes, sementes e plantas para prevenir dessecação; matriz para encapsular fertilizantes, pesticidas e nutrientes; cicatrizante de tecido hipo-alérgico (VANDAMME et al., 1996).

Para a comercialização do alginato bacteriano, evita-se o uso da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, por ser patogênica ao homem. O alginato proveniente do *Azotobacter vinelandii* é similar ao obtido das algas, em relação as suas propriedades físico-químicas (SANDFORD, 1979).

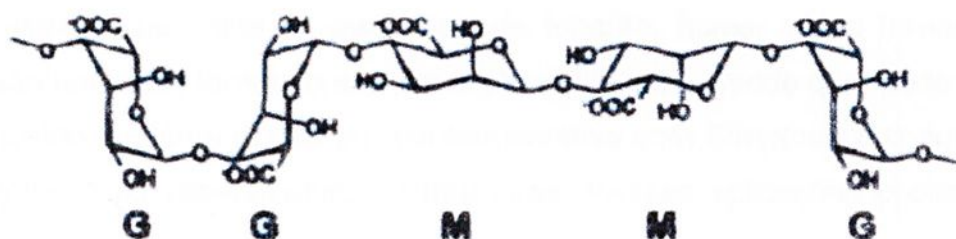


Figura 11. Estrutura química do alginato.

3.6.8. EMULSANA

A emulsana é um exopolissacarídeo polianiónico, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*. Contém como cadeia principal três aminoaçúcares N-acetilados (D-galactosamina, ácido urônico L-galactosamina e diaminohexose), com 15% de ésteres de ácido graxo. Apresenta propriedades de um biosurfactante. Este polissacarídeo é considerado parte do lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias Gram negativas, mas na fase estacionária de crescimento, liberam esterases que permitem a libertação do polissacarídeo no caldo de fermentação. É usada principalmente na emulsificação entre óleo e água, transporte de óleo em oleodutos, biorremediação em vazamentos de óleo,

formação de espuma, e remoção de urânio da água, entre outros (VANDAMME et al., 1996).

3.6.9. ÁCIDO HIALURÔNICO

O ácido hialurônico é um heteropolissacarídeo com ligações β -1-4 entre os dissacarídeos 1-3 D-glicuronosil e β -N-acetil D-glicosamina, que conferem uma estereoquímica em sua cadeia principal análoga à agarose e carragena derivada de algas (LAPASIN & PRICL, 1995). De acordo com Vandame et al. (1996), o ácido hialurônico pode ser extraído da crista do galo, pele de tubarão, humor vítreo bovino e cordão umbilical, tornando sua produção muito cara. Sendo que, pode ser produzido em larga escala por via fermentativa com *Streptococcus equi* e *Streptococcus zooepidemicus*. Entre suas diversas aplicações podemos citar:

- substituto de lágrima em cirurgias oftálmicas;
- lubrificação de articulações;
- cicatrizante de feridas e substituto do fluido sinovial;
- indústria cosmética;
- material de camada biocompatível para próteses.

3.7. FORMAS DOS POLISSACARÍDEOS

Segundo Lapasin & Pricl (1995), para entender as formas que os polissacarídeos adotam, é necessário considerar que uma cadeia polimérica contem um tipo de unidade monossacarídica e um tipo simples de conformação, e que uma cadeia de carboidrato apresenta uma sequência periódica. A conformação da ligação sugere que cada cadeia adota uma forma ordenada, essa forma será regular e periódica. Existem extensões definidas, dependendo de sua estrutura covalente; e cada



extensão corresponde aos diferentes tipos de formas das cadeias. Podem ser consideradas quatro tipos de conformações:

- Tipo A ou cadeias em fitas extendidas: Esta conformação implica que cada monômero deverá estar quase paralelo ao eixo x, essa primeira forma de fita extendida foi associada a uma função biológica estrutural. De fato, a influência dessa forma de cadeia manifesta a capacidade do polissacarídeo para formar agregados fibrosos por meio de um eficiente empacotamento, havendo fortes ligações de hidrogênio dentro e entre as camadas organizadas. Um exemplo é a ligação 1-4 do polímero β -D-glicopirranose, como é mostrada na Figura 12(a).

- Tipo B ou hélice côncava: esta conformação parece com um fio enrolado em vários segmentos de sua extensão. Os carboidratos desse tipo em solução, usualmente existem enrolados ao acaso, no estado ordenado. Ainda, na conformação ordenada estável em solução é possível que os espaços vazios possam ser preenchidos pela formação e inclusão de complexos com poucas moléculas. Alternativamente, duas ou mais hélices côncavas podem combinar-se para formar uma hélice múltipla por enrolamento mútuo. Alguns homopolissacarídeos que adotam uma conformação enovelada, usualmente agem como substâncias que armazenam energia em sistemas biológicos, ou contribuem para a geração de estruturas nos tecidos. Um exemplo é a ligação 1-3 do polímero de β -D-glicopirranose, mostrada na Figura 12(b).

- Tipo C ou fita amassada: esse tipo de conformação raramente é encontrado em produtos biológicos pois as sequências repetidas requerem formas de ligações com grandes colisões entre as unidades não consecutivas. Um exemplo é a ligação 1-2 do polímero β -D- glicopirranose, na Figura 12(c).

- Tipo D ou cadeia frouxamente ligada ou fitas flexíveis: nesta conformação em que os anéis de açúcar são separados por 3



ligações, ou pelo menos 2, como as 1-6 da β -D-glicopiranosose mostrada na Figura 12(d). Essa terceira ligação é a fonte de uma liberdade extra de rotação para a cadeia, e contribui para fixar o anéis de piranose mais afastados e daqui a provável diminuição dos choques. Como consequência, tais cadeias de polissacarídeos são caracterizadas pela alta entropia conformacional e tendem a existir em solução como fitas flexíveis ao acaso, as quais facilitam as interações bioquímicas, tais como reações enzimáticas, com água e ligações com íons.

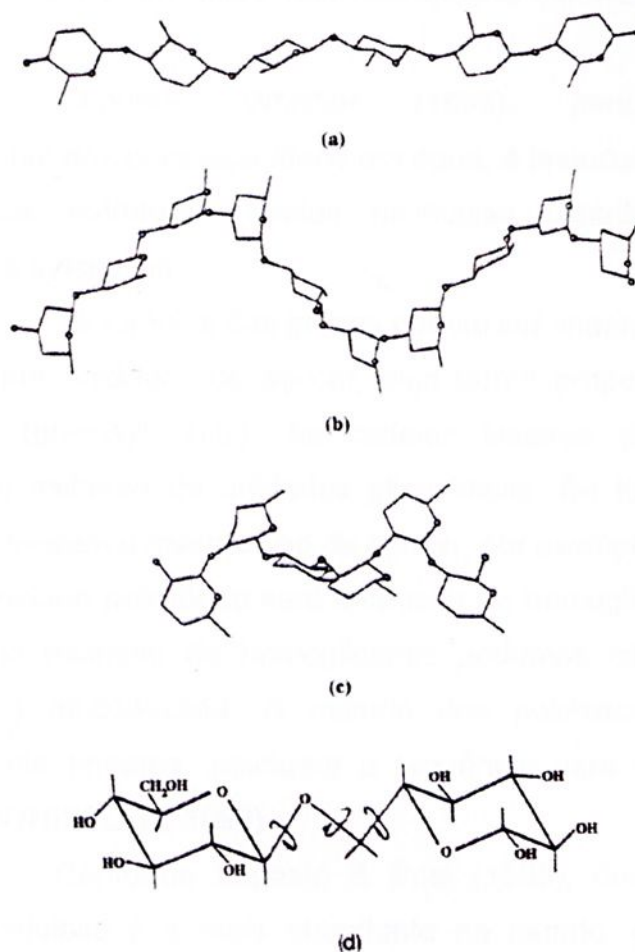


Figura 12. Conformações dos polissacarídeos, deduzidas em computador, para as ligações dos tipos a, b, c, d.

3.8. RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA MOLECULAR E AS PROPRIEDADES DOS POLISSACARÍDEOS

As características reológicas dos exopolissacarídeos são influenciadas por sua estrutura e composição, que depende de diferentes fatores, desde espécie microbiana, natureza do substrato e condições de fermentação. Como resultado da produção de exopolissacarídeos, a viscosidade e reologia do caldo de fermentação podem sofrer profundas mudanças. No início da fermentação a viscosidade é baixa e se comporta como um fluido Newtoniano e ao final do processo a viscosidade é alta e se comporta como um fluido não-Newtoniano (MARGARITIS & PACE, 1985).

Segundo Whistler (1993), para visualizar o comportamento dos polissacarídeos em água, é importante rever como as características estruturais destas moléculas contribuem para suas propriedades funcionais.

As cadeias das gomas podem ser lineares ou ramificadas, compostas por unidades de açúcar, cujo termo proposto são unidades glicosídicas (glycosyl units). As cadeias lineares podem ter várias centenas ou milhares de unidades glicosídicas. Se todas as unidades glicosídicas tiverem o mesmo tipo de açúcar, por exemplo, unidades de D-glicose, a unidade polimérica será chamada de homoglicana (ASPINALL, 1982). Como exemplo de homoglicanas podemos citar a celulose, a amilose e a amilopectina. A maioria dos polissacarídeos que são essencialmente lineares, possuem a tendência para formar estruturas helicoidais (WHISTLER, 1993).

Conforme Lapasin & Pricl (1995), dos polissacarídeos lineares a celulose é a mais abundante no mundo, pois existe como principal elemento estrutural das paredes celulares das plantas. Porém, os polissacarídeos ramificados são mais numerosos, ocorrem em uma imensa variedade de formas ramificadas e apresentam uma grande



variedade de tipos glicosídicos em sua estrutura. As glicanas lineares e ramificadas podem ser homoglicanas, entretanto é muito comum glicanas ramificadas serem compostas de dois ou mais tipos de açúcares, sendo chamadas de heteroglicanas. Como exemplo podemos citar goma guar e locuste que são galactomananas.

Whistler (1993) verificou que uma glicana linear desenvolve maior viscosidade em solução do que uma glicana ramificada com o mesmo número de unidades, particularmente a de “forma de arbustos” (Figura 13A). Quando extendidas, as moléculas colidem frequentemente, as colisões produzem energia e deste modo contribuem para a viscosidade da solução. As moléculas altamente ramificadas de peso molecular equivalente espalham-se em esferas menores que giram e colidem menos frequentemente, isso contribui para uma menor viscosidade da solução. Essas glicanas ramificadas são melhores agentes de volume do que as moléculas lineares (Figura 13B).

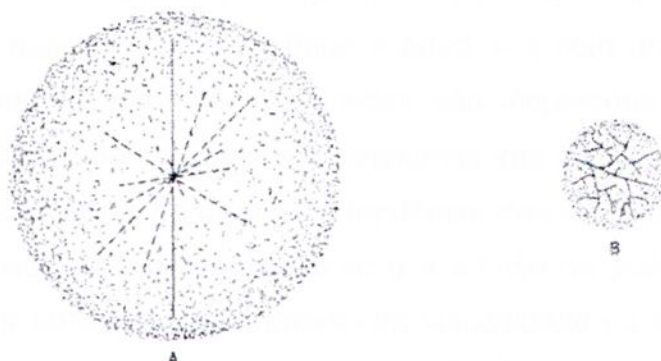


Figura 13. Espaço ocupado pelo giro de uma molécula de polissacarídeo com o mesmo peso molecular, com cadeia linear (A) e cadeia ramificada (B).

3.8.1. ESTABILIZANTES

Alguns hidrocolóides são considerados estabilizantes por possuírem propriedades significativas e poder mudar uma ampla variedade de parâmetros físicos importantes em sistemas alimentícios. As mais importantes dessas propriedades quando acrescentadas aos gêneros alimentícios são: capacidade de ligação com água, redução da taxa de evaporação, alteração da taxa de congelamento, modificação na formação de cristais de gelo, regulação de propriedades reológicas, suspensão de partículas insolúveis, estabilização de espumas e emulsões. Os hidrocolóides são acrescentados principalmente pela sua propriedade de modificar de uma forma ou de outra o comportamento da água. Para entender o grau de interação do hidrocolóide e da água (soluto/solvente), deve-se fazer a correlação de sua estrutura molecular com certos aspectos de seu comportamento macroscópico. Outros fatores também importantes em seu uso industrial, são, por exemplo sua capacidade de formar filmes interfaciais e modificar as propriedades superficiais dos materiais (BLANSHARD, 1970).

As dispersões aquosas são estabilizadas com polissacarídeos quando a fase contínua é água, e a fase dispersa pode ser sólido, líquido ou gás. As suspensões são dispersões sólidas; as emulsões são dispersões líquidas e as espumas são dispersões de gás. Em todos esses sistemas há uma forte tendência das fases dispersarem-se, desestabilizarem-se ou separarem-se e a adição de polissacarídeos apropriados para promover um aumento da viscosidade na fase aquosa pode minimizar essa tendência. Estas propriedades são aplicadas na indústria alimentícia na estabilização de suspensões, emulsões e espumas (SANDERSON, 1981).



3.8.2. GELIFICANTES

Embora todos os polissacarídeos solúveis em água produzam viscosidade em maior ou menor proporção, somente poucos possuem a capacidade de formar gel. A gelificação resulta de associações intermoleculares que dão origem a uma rede tri-dimensional macroscópica, onde a água é imobilizada. A associação pode envolver as mesmas ou diferentes espécies moleculares (REES & WELSH, 1977) e este fenômeno é produzido fisicamente por alterações de temperatura ou quimicamente por adição de reagentes apropriados. Os géis podem ser considerados como intermediários entre sólidos e líquidos, possuindo propriedades de ambos. Alguns polissacarídeos gelificantes importantes na indústria de alimentos são: o amido, a pectina, o alginato e a carragena (SANDERSON, 1981).

Os géis de polissacarídeos apresentam funções biológicas nas paredes celulares de plantas jovens, fluidos animais, tecidos conectivos e cápsulas bacterianas. Eles apresentam também usos comerciais, em gêneros alimentícios, cosméticos, indústrias de papel e têxteis (REES, 1969).

a) Estrutura secundária e terciária do polissacarídeo em solução e em gel

A idéia de estrutura primária, secundária e terciária tem essencialmente o mesmo significado para polissacarídeos, proteínas e outros biopolímeros, mas provêm de níveis de organização estrutural distintos (REES & WELSH, 1977).

A estrutura primária representa a sequência de ligações covalentes das unidades monoméricas ao longo da cadeia. As ligações covalentes entre açúcares adjacentes não são completamente flexíveis, e limitam o monômero em uma estreita faixa de orientações, com isso as cadeias de polissacarídeos podem adotar somente certas formas – a estrutura secundária – que dependem da sequência primária da estrutura.



A estrutura secundária define o arranjo geometricamente distribuído no espaço que a sequência de monômeros pode adotar. Entretanto, o maior grau de organização, com interações energeticamente favoráveis entre as formas das cadeias, pode resultar em estruturas específicas e ordenadas conhecidas com estrutura terciária. Finalmente, podem interagir entre elas e dar um alto nível de organização, que é descrito como estrutura quaternária (LAPASIN & PRICL, 1995).

Várias estruturas secundárias, helicoidal e fita pregueada podem ser agrupadas em arranjos mais elaborados, como as dupla-hélices e agregados de hélices e fitas, que podem ser considerados como estruturas terciárias ou níveis estruturais acima. No entanto, o aspecto mais relevante é a estrutura em solução, já que este é necessário para o entendimento das propriedades físicas e biológicas (REES & WELSH, 1977).

b) Géis com redes que estão entrecruzadas por hélices

Exemplos importantes desse tipo de ligação são ágar, χ -carragena, ι -carragena e furcellarana. Em suas estruturas covalentes apresentam semelhanças, pois cada uma contém sequências em que os resíduos de β -D-galactose estão ligados na posição 3 alternado-se com resíduos (que podem apresentar configuração D- ou L-) de 3,6-anidro- χ -galactose ligados na posição 4. Outro aspecto de grande importância é a diferença no conteúdo de grupos éster sulfato entre um polissacarídeo e outro (REES, 1972).

A variação entre os polissacarídeos é mostrada pelo teor de sulfato, que pode alterar a solubilidade da cadeia dos polissacarídeos, por exemplo, o substituinte SO_3^{-2} ligado pode converter compostos orgânicos insolúveis (até hidrocarbonetos) em derivados hidrosolúveis. As cadeias altamente sulfatadas podem ter maior tendência para entrar na solução, porque o contato entre o substituinte iônico e a água pode ser



maximizado e a repulsão entre os substituintes pode ser minimizado por ajuste conformacional e também é entropica e energeticamente melhor para os contra-íons misturar-se livremente com o solvente (REES, 1972).

A solução ou sol, que ocorre antes da gelificação é uma solução típica de moléculas de polímeros, mas a formação do gel envolve associação de segmentos da cadeia como mostrado esquematicamente (Figura 14), resultando em uma rede tridimensional que contém solvente em seus interstícios. As regiões associadas são conhecidas como zonas de junção e podem ser formadas por duas ou mais cadeias (MORRIS & REES, 1978).

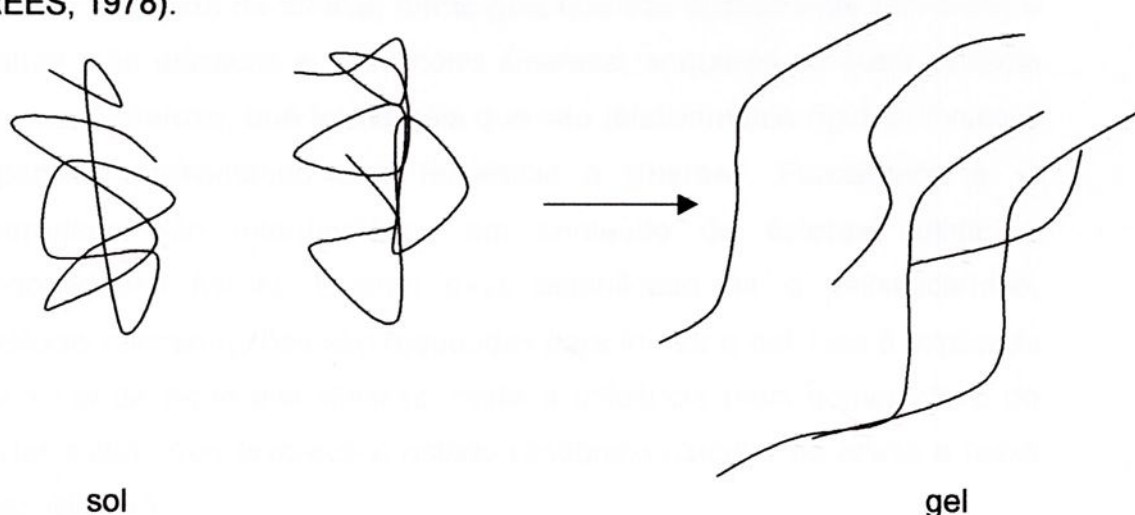


Figura 14. Mecanismo esquemático de gelificação em uma solução de polímeros.

As cadeias de polissacarídeos no estado sol apresentam uma conformação circular ao acaso, mas essa converte-se em gel quando são formadas hélices, pois ocorrem as ligações cruzadas na rede contínua. Então o gel começa a ficar progressivamente mais firme com as ligações cruzadas e portanto mais rígido. As hélices adicionais ou hélices associadas formam agregados que agem como "super-junções". Quando esses agregados são amplos e numerosos o suficiente, o gel pode perder a translucidez. Porém, um novo estágio ocorre, conhecido como sinerese,

que ocorre quando a tendência para formação de hélices ou agregados adicionais é tão forte, que a rede contrai-se com consequente liberação do líquido (REES, 1969).

De acordo com Rees & Welsh (1977), o processo total pode ser mostrado como uma mudança progressiva de um sol homogêneo para um gel compacto, frágil e opaco que está suspenso em um fluido, liberado como resultado de sua contração. Os ésteres pouco sulfatados tendem a manter cadeias solúveis ou no estado circular ao acaso e portanto inibem o processo de sinerese. Assim, ι -carragena que é a mais sulfatada da família, forma géis que são opticamente brilhantes e claros, são elásticos e não ocorre sinerese, enquanto no outro extremo temos a agarose, que forma géis que são relativamente rígidos, turvos e opacos, apresentando uma tendência à sinerese. Furcellarana e χ -carragena são intermediários em conteúdo de ésteres sulfato e propriedades físicas. Quanto mais esterificado for o polissacarídeo, maiores concentrações são requeridas para formar o gel, isso é explicado pela Lei de Ação das Massas, onde a influência mais dominante é do éster sulfato que favorece o estado randômico (circular ao acaso e baixa viscosidade).

Várias propriedades dos géis são amplamente usadas na indústria. Nesta são feitas associações entre os polissacarídeos, conhecidas como sinergismo, para obter géis mais elásticos e resistentes a sinerese quando associados a goma locusta (polissacarídeo de origem vegetal). Essa galactomanana, apresenta partes de sua cadeia principal insubstituíveis, que quando associadas as hélices de χ -carragena, furcellarana e agarose, estabiliza-se na forma estendida ou de fita pregueada, não tomando sua forma original circular ao acaso. Essas ligações favorecem a formação de géis com menor concentração de polissacarídeos (REES, 1972).



3.8.3. ESPESSANTES

Em tecnologia de alimentos, espessante é um termo relacionado com “textura”, “sensação na boca” e “corpo”. Refere-se a viscosidade, que é a resistência do fluxo de um líquido. Viscosidade é definida como a taxa de tensão de cisalhamento, onde tensão de cisalhamento é a aplicação da força e a taxa de cisalhamento é a taxa onde o líquido começa a deformar. Somente em um pequeno número de sistemas líquidos, a tensão de cisalhamento é proporcional a taxa de cisalhamento, esses são referidos como Newtonianos e são caracterizados pela viscosidade independente da taxa de cisalhamento. A maioria das soluções de polissacarídeos exibem fluxo não Newtoniano, e portanto, o aumento da taxa de cisalhamento pode resultar na diminuição ou no aumento da viscosidade, esses fluídos são descritos como pseudoplásticos e dilatantes, após remoção da força de cisalhamento, eles imediatamente reverterem para seu estado original. As soluções tixotrópicas e reopécticas apresentam cisalhamento fino (shear thinning) e cisalhamento grosso (shear thickening), mas requerem um intervalo de tempo maior para recuperarem sua viscosidade original após a remoção do cisalhamento (SANDERSON, 1981).

3.8.4. EMULSIFICANTES

Na preparação de emulsões, um emulsificante é requerido para reduzir a tensão superficial na interface, assim gotículas extremamente finas e dispersas no líquido podem ser formadas. Na maioria dos casos, polissacarídeos não funcionam como emulsificantes, mas são usados para aumentar a estabilidade das emulsões (SANDERSON, 1981).

Quando utilizados na preparação de emulsões, os hidrocolóides não são emulsificantes verdadeiros. Isto é, eles não atuam por meio de seus grupos hidrofílicos ou lipofílicos; e sim, como barreiras



físicas, estabilizando as emulsões. Nestas, a função dos hidrocolóides é, essencialmente, aumentar a viscosidade da fase aquosa diminuindo a tendência da fase dispersa coalescer, e consequentemente, a emulsão é estabilizada (GLICKSMAN, 1979)

3.9. O AMBIENTE DO SOLO

O solo é um ambiente heterogêneo, composto por fases sólida, líquida e gasosa. A sólida, é constituída por substâncias inorgânicas (areia, argila, sedimentos) e matéria orgânica (ácidos húmicos, lignina), formando agregados com ambos os tipos de componentes complexados. Esses agregados são os responsáveis pela formação dos poros presentes no solo, os quais variam em tamanho e quantidade, de acordo com o tipo de solo. Os líquidos e os gases presentes circulam entre as partículas agregadas e os microporos representam o habitat da maioria dos microrganismos encontrados nesse ambiente (SMILES, 1988).

A parte inorgânica do solo é formada por: material mineral derivado de rochas, mais ou menos alterado por decomposição; carbonato de cálcio, enquanto os compostos orgânicos são derivados de plantas ou organismos presentes no período anterior; resíduos de plantas e microrganismos recentemente adicionados ao solo. A água faz parte de uma solução de vários sais solúveis e parcialmente solúveis presentes no solo (RUSSELL, 1973).

Segundo Pelczar et al. (1996), a quantidade e os tipos de microrganismos presentes no solo dependem de muitos fatores ambientais, tais como: quantidade e tipo de nutrientes disponíveis; teor de umidade; grau de aeração; temperatura, pH e da ação do vento. A presença de raízes e a extensão do sistema radicular no solo também podem afetar o número e os tipos de microrganismos presentes.



O solo apresenta uma diversidade de microrganismos com capacidade metabólica diversa, as quais desempenham um papel importante nas características do solo através da atuação na decomposição da matéria orgânica, reciclagem de nutrientes e associações simbióticas com plantas (SALE, 1974; BRANDÃO, 1992).

As bactérias representam a maior parte da população microbiana do solo, tanto em quantidade quanto em variedade. Existe uma grande variedade de tipos nutricionais e fisiológicos de bactérias no solo e uma única condição de cultivo não favorece o crescimento de todas as células viáveis. Portanto, existem, sem dúvida, muitas espécies de bactérias do solo que ainda não foram isoladas e identificadas (PELCZAR et al., 1996; LYNCH, 1986; BRANDÃO, 1992).

De acordo com Lynch (1986) são encontrados no solo todos os tipos conhecidos de microrganismos. Em certas circunstâncias, as bactérias podem se tornar mais importantes na rizosfera. Alguns gêneros importantes de bactérias presentes no solo, são: Gram positivos, *Arthrobacter* (bastonetes/cocos), *Staphylococcus* (cocos) e *Bacillus* (bastonetes com esporos); Gram negativos, *Pseudomonas* (bastonetes), *Rhizobium* (bastonetes), *Azotobacter* (bastonetes ou células leveduriformes), *Agrobacterium* (bastonetes), *Nitrobacter* (bastonetes) e *Xanthomonas* (bastonetes).

Os microrganismos são os principais operadores das transformações químicas na biosfera; o conhecimento da composição, da interação e dinâmica entre os ecossistemas microbianos é muito pobre. Entre os ciclos biogeoquímicos de elementos vivos relevantes, principalmente carbono, nitrogênio e oxigênio, consideramos sob um ponto a criação de moléculas biogênicas pela fotossíntese. A conversão da matéria inorgânica em outras formas moleculares é feita principalmente por degradação heterotrófica. A maioria da degradação da biomassa terrestre ocorre no solo. Essa mistura heterogênea de minerais e resíduos orgânicos é inundada com vida bacteriana, mas ainda não

somos capazes de estudar a função metabólica de espécies bacterianas relevantes. Nosso problema é a demanda para cultivar esses micróbios em laboratório, pois aparentemente menos de 1% são acessíveis pelas técnicas de cultivo (FELSKE, 1999).

Dentro de extensos programas de pesquisa e desenvolvimento de processos de triagem ("screening") para a rápida seleção de microrganismos produtores de substâncias específicas (antibióticos, enzimas, polissacarídeos, entre outros) resultado de seu metabolismo, recorre-se ao isolamento em massa de populações do solo, plantas, animais, resíduos da agricultura e industriais, seguido de testes para determinar as aplicabilidades de cada isolado (CARDOSO, 1992; MELO & AZEVEDO, 1998).

A rizosfera é definida como a área do solo que encontra-se sob alguma influência da raiz de uma determinada planta, de onde são isolados um maior número de microrganismos. A população microbiana encontrada nas raízes ou ao redor das mesmas é consideravelmente maior que no solo isento de raízes; as diferenças detectadas são quantitativas e qualitativas, havendo predominância de bactérias. Seu crescimento é estimulado pelas substâncias nutritivas liberadas pelo tecido vegetal; o desenvolvimento dos vegetais é influenciado pelos produtos do metabolismo microbiano excretados para o meio exterior. (PELCZAR et al., 1980; LYNCH, 1986).

A influência das raízes de plantas na população do solo e sua vizinhança é considerável, as raízes e os rizomas das raízes pode carregar uma larga concentração de microrganismos na sua superfície (RUSSELL, 1973).

O número de microrganismos na raiz e a sua volta é muito maior do que no solo livre. A composição e diversidade da comunidade de microrganismos associados com raízes de plantas é influenciada por uma variedade de fatores como a densidade e exudados das raízes de plantas



(GERMIDA & SICILIANO, 1999). Na rizosfera as bactérias são os microrganismos predominantes. O crescimento bacteriano é estimulado por nutrientes como aminoácidos e vitaminas liberados do tecido radicular. As bactérias que requerem aminoácidos para o crescimento ocorrem em maior número na rizosfera do que no solo livre de raiz. Os produtos do metabolismo microbiano que são liberados na rizosfera estimulam o crescimento das plantas. Desta forma, uma troca de nutrientes ocorre entre o sistema radicular da planta e os microrganismos (PELCZAR et al., 1996; LYNCH, 1986).

Os microrganismos formam o mais diverso grupo de organismos do solo, no entanto muito pouco se conhece sobre eles. Até recentemente, as pesquisas tinham focado aqueles microrganismos que são cultiváveis. Entretanto, tem sido coletada uma grande quantidade de informações, tanto dos microrganismos cultiváveis quanto dos não-cultiváveis e o impacto de suas funções sobre o solo e sobre muitos processos do solo, e portanto, sobre sua produtividade. O entendimento da ecologia microbiana do solo poderá beneficiar a administração decisiva de um país, uma vez que suas transformações tornam possível que a vida continue. Portanto, o conhecimento de suas interações e funções é vital para o entendimento do solo e sua melhor sustentação (KENNEDY & GEWIN, 1997).

O uso de microrganismos em biotecnologia representa uma área em plena expansão. Entretanto, relativamente pouco se conhece sobre a diversidade de microrganismos que constituem os ecossistemas naturais ou artificiais. E esses microrganismos, praticamente desconhecidos, possuem um grande potencial para aplicações biotecnológicas (ROSADO et al., 1999).



3.10. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

As estratégias para a utilização eficiente da diversidade genética existente nos países em desenvolvimento inclui a seleção de espécies a partir de amostras de solo e plantas, empregando ferramentas biotecnológicas como técnicas de identificação de microrganismos e métodos controlados para seu cultivo (BURK et al., 1993; KNORR, 1995).

A maioria das espécies bacterianas não são conhecidas. Consequentemente o conhecimento sobre ecologia bacteriana é pobre e a expectativa sobre espécies com novas funções enzimáticas e novos produtos são altas. Portanto, vem crescendo o interesse no ramo de identificação bacteriana dentro da microbiologia (BUSSE et al., 1996).

Na identificação de bactérias, culturas puras são necessárias e devem ser obtidas com meios não seletivos no isolamento final (HOLT et al., 1994).

Durante o processo de identificação, compara-se as características de um microrganismo com as características de microrganismos já conhecidos e descritos, na tentativa de atribuir uma identidade ao isolado. Essa comparação envolve propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Características de composição química celular e caracteres genotípicos podem também ser necessários (RIBEIRO, 2000).

Há uma variedade de métodos que permitem a identificação de bactérias. Os testes bioquímicos revelam o perfil enzimático e metabólico requerido para a utilização de determinado substrato, essa ação normalmente é realizada por proteínas que foram transcritas por informações genéticas daquela espécie. A caracterização bioquímica pode ser realizada por testes bioquímicos clássicos e sistemas baseados em métodos rápidos onde são requeridos a utilização de inóculos padronizados.

Um dos vários esquemas disponíveis para a identificação é o sistema API (Appareils et Procédés d'Identification – API System S. A., France), que consiste de pequenos compartimentos contendo substratos desidratados para diferentes testes. Esse sistema é baseado no trabalho de Buisnière & Nardon (1968) os quais estabeleceram muitos dos requisitos físicos e químicos para os micrométodos.

Dentro do sistema API existem conjuntos de galerias específicas para determinados grupos bacterianos. O sistema de identificação API 20 E é designado para a família Enterobacteriaceae e outros bastonetes Gram-negativos não fastidiosos (ROBINSON et al., 1995) e o sistema API Staph é um sistema para identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* (RADEBOLD & ESSERS, 1980).

Um sistema para identificação de linhagens de *Bacillus* é o sistema API 50 CHB com testes suplementares da galeria API 20 E (LOGAN & BERKELEY, 1984; SELDIN & PENIDO, 1986). Esse sistema tem se mostrado reprodutível, produzindo uma matriz de resultados que pode ser usada na identificação assistida por computador.

Houve uma grande mudança na taxonomia bacteriana através do conhecimento do 16s RNAr para investigação filogenética de procariontes, pois a sistemática bacteriana, baseada em dados morfológicos e fisiológicos, está sendo comparada com novos resultados filogenéticos, baseados em dados do RNAr, e a disposição taxonômica muitas vezes é contraditória (BUSSE et al., 1996).

Atualmente são inúmeros os métodos utilizados na identificação bacteriana e podem-se considerar um complementar ao outro, mas há casos em que ocorrem divergências de resultados entre eles, em muitas ocasiões um tipo de teste é suficiente, mas em outros haverá necessidade da aplicação de vários, dependendo da taxa de identificação. A Tabela 1 mostra a variedade de caracteres que podem ser utilizados na sistemática bacteriana:



Tabela 1. Categorias e caracteres aplicados em sistemática bacteriana

Categorias	Exemplos
Cultural	Morfologia da colônia Cor da colônia Corpo de frutificação Micélio
Morfológica	Morfologia da célula Tamanho da célula Motilidade Tipo de flagelação Material de reserva Coloração de Gram Coloração ácida-fast
Fisiológica	Faixa de temperatura Faixa de pH Tolerância a salinidade
Bioquímica	Utilização da fonte de carbono Oxidação de carboidratos Fermentação de carboidratos Perfil enzimático
Testes inibitórios	Meio seletivo Antibióticos Tinturas
Sorológica	Aglutinação Imunodifusão
Quimiotaxonomia	Ácidos graxos Lipídios polares Ácidos micólicos Composição lipopolissacarídica PAGE de lipopolissacarídeos Diaminoácidos da parede celular Composição de aminoácidos da parede celular Açúcares da célula Açúcares da parede celular Pigmentos celulares Sistema quinona Conteúdo de poliamina PAGE das proteínas totais da célula
Genótipo	Taxa base de DNA (conteúdo de G + C) Amplificação do DNA polimórfico ao acaso Restrição (RFLP) Eletroforese (PFGE) Sonda de DNA Hibridização de DNA:DNA Hibridização DNA:rRNA Sequência do 16s rRNA Sequência da unidade β da ATP sintase Sequência GroEI (Chaperonin)

Fonte: Busse et al., 1996



3.11. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) é uma amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta sequência em um tubo de ensaio. Essa técnica começou a ser descrita no final dos anos 80 e tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências, dispensando todas as trabalhosas etapas de clonagem gênica (FARAH, 1997; POWLEDGE, 2001).

A reação em cadeia da polimerase explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde. A polimerase do DNA requer, entretanto, um “ponto de início” ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subseqüentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibridiza (se anela) à fita molde simples, o qual é denominado “primer”. Ambas as fitas simples iniciais servem de fita molde para a síntese, desde que se forneça “primers” específicos a cada uma delas. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos “primers”, que se anelam especificamente às suas sequências complementares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar (FARAH, 1997).

Segundo Passaglia & Zaha (1996) o desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA utilizando a reação em cadeia da polimerase abriu enormes perspectivas para análise de genes, diagnóstico de doenças genéticas, detecção de agentes infecciosos, entre outros exemplos.



A Figura 15 representa as etapas do ciclo da reação de PCR.

3.11.1. BASE DO MÉTODO

Na prática o que se faz é adicionar em um tubo de ensaio uma quantidade muito pequena de DNA genômico, mais os quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), a enzima polimerase do DNA, os oligonucleotídeos que servirão de “primers” e a solução tampão, que fornecerá as condições de pH e salinidade para que a síntese se processe. O tubo de ensaio é submetido a uma temperatura, geralmente 94°C por 5 minutos, para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é rebaixada de 30 a 65°C por 30 segundos quando, então, os “primers” têm a oportunidade de se anelarem às suas seqüências complementares no DNA genômico. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 72°C por 2 a 5 minutos, temperatura ideal para que a polimerase do DNA utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias. Repetindo-se esses três passos, desnaturação, anelamento e síntese, por cerca de 30 ciclos, produziremos mais de 250 milhões de cópias de uma determinada seqüência de DNA em fita dupla, uma vez que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo. Após a primeira desnaturação do DNA genômico, o tempo de aquecimento a 94°C pode ser reduzido para 30 segundos nos ciclos subseqüentes, tendo em vista que a renaturação da molécula será dificultada. Atualmente, a polimerase do DNA utilizada em PCR é proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*, a qual, na natureza, vive em águas com temperatura de 75°C, e sua polimerase do DNA (*Taq* polimerase), embora tenha como temperatura ótima a 72°C, é capaz de se manter estável mesmo a 94°C. O tubo com a reação é incubado em um aparelho que controla automaticamente as mudanças de temperatura



em cada ciclo – o termociclador. No final do processo, o DNA produzido pode ser observado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, como uma banda única que corresponde ao tamanho da sequência amplificada, a qual pode atingir até algumas kilobases. Um resultado produzido pela PCR pode ser alcançado em algumas horas ou no máximo em um dia (FARAH, 1997).

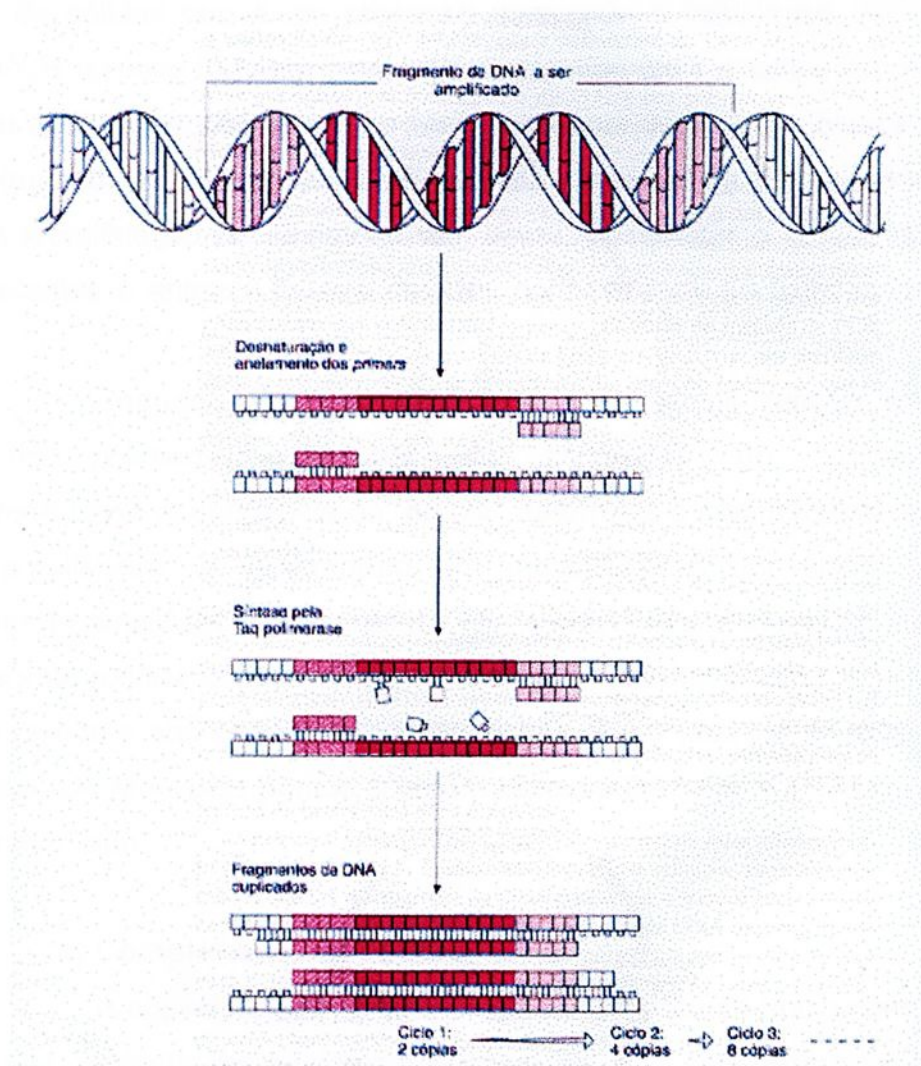


Figura 15: Reação em cadeia da polimerase. Cada ciclo consiste de desnaturação da fita molde, anelamento dos primers em cada fita alvo complementar e síntese da sequência entre os primers.

Ainda segundo Farah (1997), a principal vantagem deste método é que requer quantidades muito pequenas de DNA. Embora no laboratório utilize-se normalmente menos que 0,5 microgramas de DNA genômico, a técnica pode ser eficaz e até ser realizada a partir de uma molécula de DNA proveniente de uma única célula. A possibilidade de se amplificar um gene específico por meio do PCR, pode às vezes dispensar a cultura de células que é um processo demorado e trabalhoso. Além disso, a PCR fornece também novas oportunidades para a aplicação da tecnologia do DNA recombinante na Medicina Legal, na qual a obtenção de uma quantidade mínima de DNA, colhida na cena do crime, pode permitir a identificação do criminoso, ou, ainda, possibilitar o estudo do DNA de plantas e animais fósseis datados com dezenas de milhões de anos.

Segundo Prezioso (2001), o sucesso da reação em cadeia da polimerase depende da confecção do “primer” (oligonucleotídeos). A seqüência do “primer” determina o comprimento do produto amplificado, a temperatura de anelamento e por último o rendimento de amplificação – o produto. Um “primer” mal planejado pode resultar em pequenas quantidades do produto ou mesmo ocorrer a não produção devido a não especificidade do mesmo e /ou uma amplificação inespecífica. Os principais pontos a serem observados para a confecção de um “primer” são:

a) Comprimento do “primer”

A especificidade, a temperatura e o tempo de anelamento são em parte dependentes do comprimento do “primer”, este parâmetro é crítico para o sucesso do PCR. Normalmente os oligonucleotídeos compreendidos entre 18 e 24 bases são extremamente específicos, contanto que a temperatura de anelamento seja ótima. O comprimento do “primer” é proporcional a eficiência do anelamento: em geral, para “primers” longos, o anelamento é pouco eficiente.



b) Temperatura de anelamento (T_m)

É importante lembrar que são adicionados 2 “primers” em uma reação de PCR (Reverse e Forward), devem apresentar temperatura similar de anelamento. A temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos pode ser calculada com precisão usando cálculos termodinâmicos:

$$T_m \text{ primer} = (\Delta H) / [(\Delta S + R \ln (c/4))] - 273.15^\circ \text{C} + 16.6 \log_{10}$$

Onde H é a entalpia e S é a entropia da formação da hélice, R é a constante dos gases ideais e C é a concentração do “primer”. Quando se utiliza oligonucleotídeos entre 18 e 24 bases, pode-se calcular a T_m utilizando a fórmula denominada de Wallace, presumindo que contenha cerca de 50% de GC:

$$T_m = 2(AT) + 4(GC).$$

c) Especificidade

Como mencionado anteriormente, a temperatura de anelamento depende do comprimento do “primer”. A sequência do “primer” a ser escolhida deve ser oriunda unicamente do DNA a ser amplificado. Um “primer” confeccionado com uma sequência altamente competitiva resultará em uma mancha quando da amplificação do DNA genômico. Entretanto, pode ocorrer de algum “primer” pegar apenas uma banda da fita de DNA, e, apresentar apenas um clone de uma banda do DNA genômico.



Ainda segundo Prezioso (2001), a enzima Taq polimerase é ativada em uma ampla margem de temperatura, a extensão do “primer” ocorrerá em temperaturas mais baixas de anelamento. Em temperaturas muito baixas, não ocorre uma extensão total do “primer” pela polimerase. A temperatura ideal de anelamento está em torno de 55°C – 72°C, o que corresponde portanto a um “primer” de comprimento entre 18 e 24 pares de base, usando a fórmula de Wallace.

d) Seqüência de “primer” complementar

Os “primers” para serem confeccionados não devem apresentar absolutamente nenhuma homologia intra – específica acima de 3 pares de bases. Se um “primer” tem uma região semelhante homóloga, ocorre o “Snap back”, ou seja, o fechamento brusco do “primer”. Outro cuidado a ser observado é a homologia inter – “primer”, pois pode interferir no anelamento, e, conseqüentemente no processo de hibridização.

e) Quantidade de Guanina/Citosina na extensão do primer

A composição dos “primers” deve apresentar em torno de 45% e 55% de GC para a T_m estar em torno de 56°C – 62°C.

f) Seqüência final 3'

Tem-se estabelecido que na posição 3', essencial para o processo do PCR, utiliza-se a combinação GC pois proporciona o que se denomina de “GC clamp”, que é uma forte ligação.

3.11.2. Aplicações gerais da técnica de PCR

A reação em cadeia da polimerase pode promover a amplificação de regiões específicas do genoma ou de DNA



Métodos moleculares vêm sendo empregados principalmente na identificação filogenética de microrganismos. A diversidade microbiana e sua quantificação pode ser interpretada por diferentes caminhos dependendo de perspectivas ecológicas e taxonômicas. O uso do PCR para amplificar os genes 16S RNA ribossômico, com a vantagem de poder usar primers específicos e assim níveis de hierarquia taxonômica podem ser alcançados, como gênero e espécie. O sucesso desta técnica depende do processo de extração do DNA e uso de primers específicos (O'DONNELL, 1994).

Segundo Passaglia & Zaha (1996) quando se dispõe de dados da seqüência de nucleotídeos de um segmento de DNA a ser analisado, é relativamente fácil definir-se "primers" para a amplificação. Quando não se conhece a seqüência de nucleotídeos do gene, a ser analisado no organismo em estudo, mas existem dados de seqüência de nucleotídeos de um gene relacionado de outros organismos, também é possível conseguir-se amplificação. Nesse caso, a comparação da seqüência deduzida de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes dos diferentes organismos permite a seleção de regiões conservadas. Conhecendo-se os códons mais utilizados para cada aminoácido no organismo em estudo, é possível selecionar um conjunto de "primers" em que os oligonucleotídeos apresentem diferenças em uma ou poucas bases, geralmente na terceira base de um códon. Dessa forma, a chance de anelamento correto com o gene em estudo é aumentada.

A utilização da seqüência ribossomal 16S para finalidades filogenéticas é explicada pelo fato destes genes serem conservados pelos bilhões de anos de divergência evolutiva. Sendo que a maioria dos procariotas apresentam três rRNA, chamados de 5S, 16S e 23S. Os segmentos 5S foram estudados extensivamente, mas normalmente é muito pequeno para assegurar uma boa conclusão filogenética. Enquanto,



os segmentos 16S e 23S do RNAr são suficientemente grandes para serem usados com esta finalidade (OLSEN, 2000).

O valor de S é expresso em unidades de Svedberg (S), que é caracterizado pelo movimento da partícula em direção ao fundo de um tubo durante o processo de ultracentrifugação analítica. O valor de S aumenta com o peso molecular da partícula, mas não é proporcional a ele, pois a forma da partícula também afeta a velocidade de sedimentação (CAMPBELL, 2000).

De acordo com o mesmo autor, a maioria das pesquisas são feitas em sistemas procarióticos utilizando a bactéria *Escherichia coli*. Um ribossomo de *E. coli* tem o coeficiente de sedimentação típico de 70S, quando este se dissocia produz uma subunidade leve, de 30S e uma subunidade pesada de 50S. A subunidade de 30S contém um rRNA de 16S e 21 proteínas diferentes. A subunidade 50S contém um rRNA de 5S, um rRNA de 23S e 34 proteínas diferentes.



4. CAPÍTULO I: PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO

4.1. INTRODUÇÃO

As gomas hidrossolúveis ou hidrocolóides são polissacarídeos que podem ter origem vegetal, animal, marinha ou microbiana.

Polissacarídeos de origem microbiana produzidos por fermentação, geralmente são produtos capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações. Devido, fundamentalmente, a essa propriedade ímpar, esta classe de biopolímeros tem sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista o seu alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais (GARCIA-CRUZ, 2001).

Atualmente é produzido um grande número de polissacarídeos bacterianos que apresentam diferente composição química, tamanho e estrutura molecular. Análises estruturais complexas combinadas com estudos reológicos revelaram que há muita variação entre estes mesmos. Alguns têm mostrado extraordinárias propriedades funcionais, que podem representar vantagens tecnológicas a serem exploradas para diferentes produtos comerciais (De VUYST & DEGEEST, 1999).

Apesar da intensa pesquisa nesta área, poucos biopolímeros são utilizados para consumo humano, uma vez que passam por rigorosos critérios toxicológicos para serem liberados e devem adequar-se à severa legislação alimentar. Apenas três biopolímeros foram liberados pelo FDA para uso em alimentos: xantana, gelana e dextrana (PSZCZOLA, 1993).



O mercado exige produtos que proporcionem boa viscosidade em solução e possam gelificar. A utilização desses agentes durante a elaboração de um alimento não somente afeta suas características sensoriais, particularmente a textura, mas também desempenha um papel importante no comportamento físico durante sua preparação, transformação e armazenamento (PASQUEL, 1999).

Visando selecionar variedades de microrganismos que produzam polissacarídeos em quantidade e com propriedades economicamente interessantes, vem sendo realizadas pesquisas em diversas universidades e segmentos industriais, pois poucos são o microrganismos estudados completamente (GONÇALVES, 1989).

Entretanto a produção de polissacarídeos bacterianos muitas vezes é baixa e instável, as informações sobre biossíntese, organização molecular e condições de fermentação são escassas e a cinética da formação de polissacarídeos é pobremente descrita. Portanto, sendo seu processo difícil, há necessidade de utilizar espécies melhoradas ou fazer modificações durante o processo de produção que possam aumentar a produtividade. Para isto é necessário promover modificações nos processos produtivos (envolvendo enzimas e/ou tecnologia fermentativa), isolar novos microrganismos produtores e, portanto, classificá-los taxonômica e filogenicamente (BUSSE et al., 1996).



4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a produção de exopolissacarídeos utilizando glicose e sacarose como fontes de carbono;
- Estudar a produção de exopolissacarídeos utilizando nitrato de sódio e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio;
- Verificar o efeito do pH e da temperatura;
- Verificar o efeito de diferentes fatores de crescimento (ácido succínico, pirúvico e α -cetoglutárico).



4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

4.3.1.1. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

As amostras da rizosfera foram coletadas de plantas encontradas na Reserva Ecológica do Noroeste Paulista, escolhidas aleatoriamente, com o mínimo de terra possível. Essas amostras foram coletadas a uma profundidade de 15 cm em relação à superfície do solo, com o auxílio de uma pinça e uma tesoura desinfetadas em álcool 70%. Em seguida, foram colocadas dentro de um frasco fechado, previamente esterilizado, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável e, imediatamente, levadas ao laboratório para o processamento das mesmas, devidamente identificadas.

Foram pesados 10 g das raízes com a terra remanescente e lavados com 90 mL de água destilada estéril. A partir dessa, foram feitas diluições decimais seriadas até diluição 10^{-15} , das quais, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL, que foi semeada em superfície com auxílio de uma alça de Drigalsky em placas de Petri contendo meio Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas a 30°C por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A cada 24, horas as culturas que cresciam formando colônias isoladas, gomosas e brilhantes foram selecionadas e novamente semeadas em placas de Petri contendo PCA para a purificação da cultura.



4.3.1.2. OBTENÇÃO DA CULTURA PURA

O método utilizado para obtenção da cultura pura foi o de esgotamento em estrias superficiais em placa de Petri contendo PCA. Para a avaliação da pureza da cultura foram feitos esfregaços em lâminas de microscópio e a seguir, coradas pelo método de Gram. Desta forma, puderam ser observadas as características microscópicas das bactérias isoladas. A descrição da técnica de coloração de Gram está detalhada no Anexo I.

4.3.1.3. MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a manutenção e a propagação das bactérias, as culturas purificadas foram semeadas por esgotamento em estrias superficiais, em tubos contendo PCA inclinado, incubadas a 30°C durante 24 horas e, depois, mantidas na geladeira à temperatura de 7°C. As bactérias selecionadas permaneceram neste meio até a data de serem repicadas para a realização das provas bioquímicas necessárias a cada uma delas. As culturas foram armazenadas sob camada de óleo mineral em um outro tubo contendo PCA inclinado e foram usadas como culturas de estoque.

4.3.2. PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO

4.3.2.1. MICRORGANISMOS

Para a produção dos polissacarídeos microbianos foram utilizadas as três bactérias que apresentaram colônias gomosas, maior viscosidade e produção de polissacarídeos no caldo de fermentação.



4.3.2.2. MEIO BASE

O meio base empregado para a produção dos biopolímeros consistiu de uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, como proposto por Souw e Demain (1979) com algumas modificações. O meio consta de (g/L):

KH_2PO_4	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
Ácido Cítrico	2,0
H_3BO_3	0,006
ZnO	0,006
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0024
CaCO_3	0,2

O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH e/ou HCl (antes da esterilização).

4.3.2.3. MEIOS DE PRODUÇÃO

Os meios de produção foram obtidos pela adição de soluções esterilizadas das fontes de carbono ao meio base, previamente esterilizado, de modo a fornecer a concentração desejada da fonte de carbono. As fontes de carbono testadas foram glicose e sacarose.

4.3.2.4. PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

A bactéria foi inoculada por esgotamento em tubos inclinados de PCA, que foram incubados por 24 h a 30°C. Após a incubação, foi feita a suspensão da cultura pela adição de 2,0 mL de água destilada estéril. Esta suspensão de células foi transferida para frascos



Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de produção e incubado a 30°C e 200 rpm durante 24 h. A cultura desenvolvida foi usada como pré-inóculo

4.3.2.5. PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Em uma cubeta de espectrofotômetro foram adicionados 3 mL do meio base (utilizado como branco) e em outra cubeta foram adicionados 3 mL do meio base mais gotas do caldo de cultura obtido no item 4.3.2.4, até que a leitura da absorbância obtivesse valor de 0,3 no comprimento de onda de 650 nm. Através de uma regra de três sabemos o quanto é adicionado deste inóculo em cada Erlenmeyer contendo o meio para a produção de polissacarídeo.

4.3.2.6. PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO

As diferentes formulações dos meios de produção foram inoculadas como descrito em 4.3.2.5 com cada bactéria e incubadas a 30°C, durante 96 h a 200 rpm.

4.3.2.7. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO

Para a otimização dos parâmetros de fermentação foram testados diferentes valores de pH, temperatura, concentração de fatores de crescimento (ácido succínico, pirúvico e α -cetoglutárico) e concentração das fontes de nitrogênio (KNO_3 , NaNO_3), em substituição ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



4.3.2.8. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO CALDO DE FERMENTAÇÃO

As características do caldo de fermentação foram determinadas utilizando um viscosímetro Fungilab S.A. o spindle TL 5 a 100 rpm. O pH foi determinado no caldo de fermentação utilizando um potenciômetro.

4.3.2.9. SEPARAÇÃO

As células foram separadas por centrifugação a 12000 rpm durante 30 min. A seguir, a solução foi concentrada por evaporação a vácuo e os polissacarídeos foram precipitados do caldo de fermentação com três volumes de etanol e um volume de acetona, depois da remoção do sobrenadante, o polissacarídeo obtido foi colocado para secar em estufa vácuo a 45°C até atingir peso constante. Finalmente foi calculado o rendimento (gramas do polissacarídeo por 100 gramas da fonte de carbono).

4.3.2.10. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

A determinação do crescimento celular foi feita através da determinação do peso seco das células obtidas na etapa anterior, as quais foram transferidas para uma placa de Petri, procedendo-se também à secagem em estufa a vácuo a 45°C até peso constante.



4.3.3. DETERMINAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS RESIDUAIS NO CALDO DE FERMENTAÇÃO

4.3.3.1. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DOS AÇÚCARES RESIDUAIS NO CALDO DE FERMENTAÇÃO.

Para a determinação do açúcar residual, utilizado como fonte de carbono, no sobrenadante do caldo de fermentação (logo após separação das células) foi utilizado o método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959). Para esta determinação foi feita uma curva padrão utilizando glicose. As leituras foram feitas num espectrofotômetro a 540 nm.

4.3.3.2. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS RESIDUAIS NO CALDO DE FERMENTAÇÃO

Para verificar a presença de proteínas no sobrenadante do caldo de fermentação foi realizado o Método de Bradford (1976). Para esta determinação foi feita uma curva padrão utilizando soro albumina bovina. As leituras foram feitas num espectrofotômetro a 595nm.



4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS

A seleção das bactérias produtoras foi baseada na determinação dos parâmetros de fermentação de 6 bactérias diferentes. O critério para escolha foi primeiramente maior viscosidade do caldo de fermentação, e a seguir a maior produção de polissacarídeo. O crescimento celular foi determinado pelo peso celular seco, este último não é um parâmetro decisivo, uma vez que a produção independe do maior ou menor crescimento (EVANS et al., 1978).

Como pode ser observado na Tabela 2, os caldos de fermentação que apresentaram as maiores viscosidades foram aquelas obtidos dos caldos de cultivo das bactérias 24A, 39A e 24F.

Na Tabela 3 estão representados a produção de polissacarídeo e peso celular seco, no período de 96 h de incubação. A maior produção de polissacarídeo foi observada nas amostras 18E, 24A e 39A. Podemos observar também que as bactérias 24F e 18E apresentaram o mesmo peso celular seco, mas a produção de polissacarídeo da amostra 18E foi superior ao da 24F.

De acordo com a análise dos resultados acima foram selecionadas as bactérias 18E, 24A e 39A para as etapas posteriores do trabalho.



Tabela 2. Viscosidade do caldo de fermentação* para seleção das bactérias produtoras durante o período de incubação de 48, 72 e 96 h a 200 rpm e 30°C

Bactérias	Viscosidade (cp)		
	48h	72h	96h
7F	0,5	0,4	0,5
20F	0,5	0,4	0,6
24F	0,7	0,7	0,7
18E	0,4	0,4	0,5
24A	4,5	9,3	10,7
39A	1,2	3,2	6,8

* Meio base contendo 2% de glicose

Tabela 3. Produção de polissacarídeo e determinação do peso celular seco das bactérias produtoras, após 96 h de incubação a 200 rpm e 30°C, utilizando meio base acrescido de glicose a 2%

Bactérias	Polissacarídeo (g/L)	Peso celular seco (g/L)
7F	8,0	0,4
20F	6,8	0,4
24F	5,2	1,4
18E	11,0	1,4
24A	11,6	3,4
39A	7,0	1,8

4.4.2. PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO

A produção do polissacarídeo foi realizada com as bactérias 18E, 39A e 24A no meio proposto por Souw & Demain (1979), adicionado da fonte de carbono (glicose e/ou sacarose) e incubadas a 30°C em um shaker rotatório a 200 rpm durante um período de até 120 h, para selecionar o tempo ideal de fermentação. Após, foram testados diferentes concentrações de glicose e sacarose e foi selecionada a concentração que produziu maior rendimento. Estes parâmetros de fermentação foram determinados para todas as bactérias.

Após a seleção da concentração e da fonte de carbono de maior rendimento, foi realizada a produção de polissacarídeo nesta fonte. Foi determinado o efeito da variação da concentração e da fonte de nitrogênio. Para isto foram utilizados nitrato de sódio e nitrato de potássio, em substituição ao sulfato de amônio.

Foi testado o efeito dos ácidos carboxílicos (pirúvico, succínico e α -cetoglutarico) no meio de produção contendo as concentrações ideais das fontes de carbono e nitrogênio, para cada bactéria.

Também foi testado o efeito da temperatura na faixa de 20 a 40°C e do pH no intervalo de 5 a 8.

4.4.2.1. SELEÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO

As bactérias 18E, 39A e 24A foram cultivadas nas condições descritas acima, no meio base acrescido com 2% de glicose. Foi determinada viscosidade, pH, peso celular seco, produção de polissacarídeo, açúcares residuais e teores de proteína no caldo de fermentação. Estas determinações foram realizadas a cada 24 h, até 120 h.



Foi observado no caldo de cultivo da bactéria 18E, que a viscosidade aparente foi baixa e praticamente constante durante todo o período. Em relação a produção do polissacarídeo, foi verificada sua presença somente nas últimas 48 h e o rendimento máximo (34,5%) foi em 96 h de incubação. O pH decresceu de 7,0 para 5,15 durante o período de fermentação; a maior produção de polissacarídeo ocorreu em 5,21 (Figura 16A).

Os resultados obtidos para a bactéria 39A estão representados na Figura 16B. Nesta mesma pode ser observado que a viscosidade, o peso celular seco e a produção de polissacarídeo aumenta constantemente até o período de fermentação atingir 96 h, após ocorre um decréscimo. O pH diminui até 6,2 quando ocorre maior produção de polissacarídeo.

A Figura 16C mostra o comportamento da bactéria 24A, este é semelhante ao observado para a bactéria 39A. Nesta Figura, verifica-se que a viscosidade e peso celular seco aumentaram até o período de 96 h, logo após decresceram. Quanto à produção de polissacarídeo, foi observado que ocorreu um pequeno aumento no período de 96 h. O pH do caldo de fermentação diminuiu durante todo o período de incubação até 4,5. Segundo Hofvendahl et al. (1999), o pH apresenta uma relação direta com alguns parâmetros de fermentação, como: formação de produtos e taxa de crescimento celular, uma vez que, a síntese dos produtos pela bactéria podem alterar o pH e inibir o crescimento.

O tempo de incubação para as bactérias 18E, 39A e 24A foi 96 h. Resultados similares foram obtidos por Gandhi et al. (1997), que produziu polissacarídeo utilizando *Bacillus megaterium* e observou maior produção de polissacarídeo no tempo de 96 h.



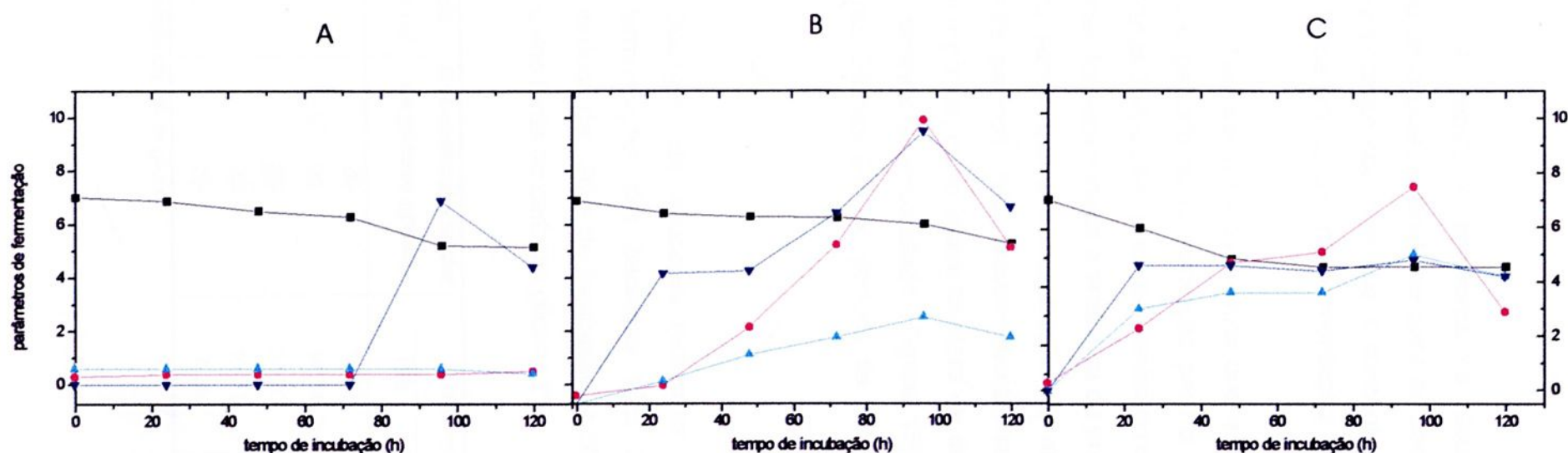


Figura 16. Parâmetros de fermentação obtidos para as bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), incubadas a 30°C e 200 rpm durante um período de 120 h, utilizando meio base acrescido de glicose a 2% (■ pH; ● viscosidade (cp); ▲ peso celular seco (g/L); ▼ polissacarídeo (g/L)).

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a determinação de açúcares redutores para as bactérias 18E, 39A e 24A. Nesta Tabela pode-se observar que a concentração de glicose residual diminui em todos os caldos de fermentação ao longo de período de incubação.

Na Tabela 5 observamos que o teor de proteína aumenta durante todo o período de fermentação para a bactéria 18E, enquanto para as bactérias 39A e 24A, pode ser verificado que em ambos os caldos de fermentação foi determinada a presença de proteína no período de 72, 96 e 120 h, sendo que a concentração da mesma foi crescente no decorrer deste período. Isto, provavelmente, se deve a lise celular e liberação de enzimas, como liases capazes de degradar o polissacarídeo e portanto, diminuir a viscosidade (Figura 16), este fato também foi observado nas últimas 24h do período de incubação por CONTI et al. (1994).

Tabela 4. Dosagem de açúcares redutores residuais no caldo de fermentação* das bactérias 18E, 39A e 24A, durante o período de 120 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose 2%.

Tempo de incubação (h)	Concentração inicial de glicose (g/mL)	Concentração final de glicose (g/L)		
		18E	39A	24A
24	20	14,91	17,50	11,95
48	20	14,31	9,71	10,25
72	20	14,30	6,82	10,21
96	20	11,71	5,22	10,20
120	20	7,38	5,88	9,91

* Meio base contendo 2% de glicose



Tabela 5. Dosagem de proteínas no caldo de fermentação* das bactérias 18E, 39A e 24A durante o período de 120 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose a 2%.

Tempo de incubação (h)	Concentração de proteína (mg/L)		
	18E	39A	24A
24	3,67	0	0
48	4,07	0	0
72	4,93	0,51	0,36
96	5,66	0,63	1,63
120	6,06	1,01	2,46

* Meio base contendo 2% de glicose

4.4.2.2. SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO

A glicose é a fonte de carbono usual para produção de goma xantana, entretanto, em 1979, Souw e Demain obtiveram bons rendimentos e altas viscosidades nas fermentações desenvolvidas com *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459, utilizando sacarose como fonte de carbono. Devido a grande disponibilidade e baixo custo da sacarose no mercado nacional, era interesse em verificar sua utilização como fonte de carbono para a produção de polissacarídeos, em substituição a glicose.

Durante a seleção da fonte de carbono, no presente experimento, foram utilizadas as concentrações 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% de glicose e sacarose para determinação dos parâmetros de fermentação, pois a grande maioria dos pesquisadores têm apontado estas concentrações como as que apresentam os melhores rendimentos (LEACH et al., 1957; LILLY et al. 1958; KANG et al. 1982; JEANES et al., 1976; SOUW & DEMAINE, 1979). Outros autores também observaram que

concentrações maiores do que 5% da fonte de carbono promovem uma redução na eficiência da conversão desta em polissacarídeo (KOVACS & KANG, 1977).

A Figura 17A, mostra que o aumento da massa celular da bactéria 18E é diretamente proporcional ao aumento da concentração de sacarose e inversamente proporcional ao aumento da concentração da glicose. A Figura 18A, mostra que a quantidade de polissacarídeo não variou de forma significativa com o aumento da concentração de sacarose. Observa-se também que esta fonte de carbono foi superior a glicose na produção de polissacarídeo. De todas as concentrações testadas o maior rendimento de polissacarídeo foi obtido com 1% de sacarose (Figura 19A).

Em relação a bactéria 39A, a Figura 17B mostra que a massa celular aumentou proporcionalmente com a concentração da fonte de carbono, até a concentração de 4%. Nestas concentrações, a glicose favoreceu o aumento da massa celular mas não a produção do polímero (Figura 18B), enquanto, a sacarose, além de favorecer o aumento da massa celular estimulou a produção do biopolímero até 4%. No entanto, o maior rendimento foi obtido nas menores concentrações de ambas as fontes (Figura 19 B). Os resultados obtidos mostram que a fonte de carbono utilizada para o crescimento não é necessariamente a mesma que produz o melhor rendimento, uma vez que, a polimerização e formação do polissacarídeo, poderão seguir vias metabólicas diferentes da via utilizada para o crescimento celular (OKABE et al., 1981; MARGARITIS & PACE, 1985).

A bactéria 24A, apresentou crescimento celular, determinado pelo peso celular seco, proporcional ao aumento da concentração das fontes de carbono (glicose e sacarose) até 4%, como pode ser verificado na Figura 17C. A proporcionalidade verificada no crescimento celular não ocorreu na produção de polissacarídeo, onde temos maior produção deste na concentração de 3% de sacarose (Figura



18C). Como o rendimento é obtido através do quociente de polissacarídeo produzido por fonte de carbono adicionada, o maior rendimento foi obtido na concentração de 1% de sacarose, ou seja, na mais baixa, como pode ser confirmado na Figura 19C.

Este comportamento também foi observado por Okabe et al. (1981), durante a síntese de alginato por *Azotobacter vinelandii* que sugere que a via metabólica para síntese de material celular para crescimento compete com a síntese do polissacarídeo.

Em geral, nas Figuras 17, 18 e 19 podemos observar que à medida que aumenta a concentração da fonte de carbono, tende a aumentar a massa celular, não ocorre aumento proporcional na produção de polissacarídeo e consequentemente o rendimento diminui. Este mesmo comportamento foi observado por Gandhi et al. (1997) durante a produção de polissacarídeo com *Bacillus megaterium* onde obtiveram melhores rendimentos com 30g/L de sacarose. Vários outros autores também conseguiram uma boa produção do polissacarídeo em baixas concentrações da fonte de carbono (OKABE et al., 1981; KAWAI et al., 1991; VERMANI et al., 1995).

A Figura 20 A e B, mostra um aumento progressivo da viscosidade do caldo de fermentação das bactérias 18E e 39A em relação à concentração da fonte de carbono, pode-se observar também que as viscosidades nas concentrações 2, 3 e 4% de glicose foram superiores às respectivas com sacarose. Apesar da produção de polissacarídeo ter sido maior com a sacarose, a viscosidade do caldo de fermentação foi maior com glicose. A justificativa para este fato, está diretamente relacionada a conformação da molécula do polissacarídeo no caldo de fermentação, que é dada pela composição qualitativa e quantitativa de grupos substituintes da cadeia lateral do polímero (MARGARITIS & PACE, 1985).

A bactéria 24A apresentou um comportamento distinto em relação a sua viscosidade no caldo de fermentação (Figura 21). O caldo de fermentação contendo glicose apresentou viscosidade crescente em



relação ao aumento da concentração até 4% e sua determinação foi nas mesmas condições das outras amostras, utilizando 100 rpm no viscosímetro. Quanto a fonte de carbono sacarose o comportamento reológico foi diferenciado, pois o caldo de fermentação apresentou uma viscosidade maior e sua determinação só foi possível diminuindo a rotação para 12 rpm no viscosímetro.

A Figura 22 (A, B e C), mostra o pH do caldo de fermentação das bactérias 18E, 39A e 24A. O pH do caldo de fermentação da bactéria 18E foi dependente da concentração e da fonte de carbono, uma vez que, com sacarose foi alcalino, enquanto que, com glicose foi ácido (Figura 22A). Em relação aos caldos de fermentação das bactérias 39A e 24A, o pH diminuiu com o aumento da concentrações de glicose e sacarose, entretanto, foi mais ácido no caldo de fermentação contendo sacarose para a bactéria 39A e praticamente foi o mesmo em relação as fontes de carbono no caldo da bactéria 24A (Figura 22 B e C).

Este comportamento também foi observado por Souw & Demain (1979) quando testaram diferentes fontes de carbono durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*.



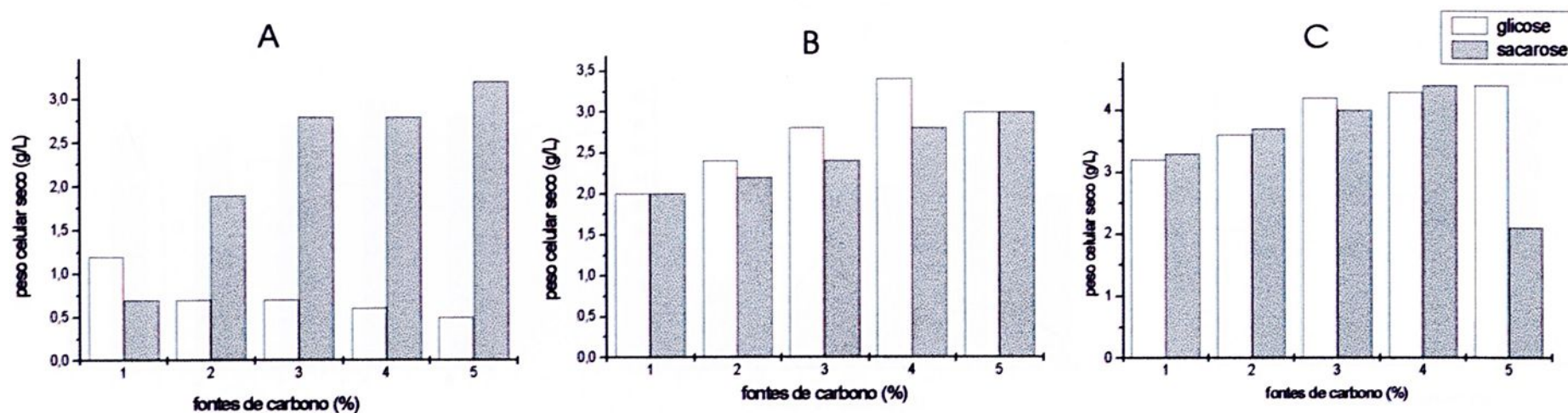


Figura 17. Peso celular seco das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h.

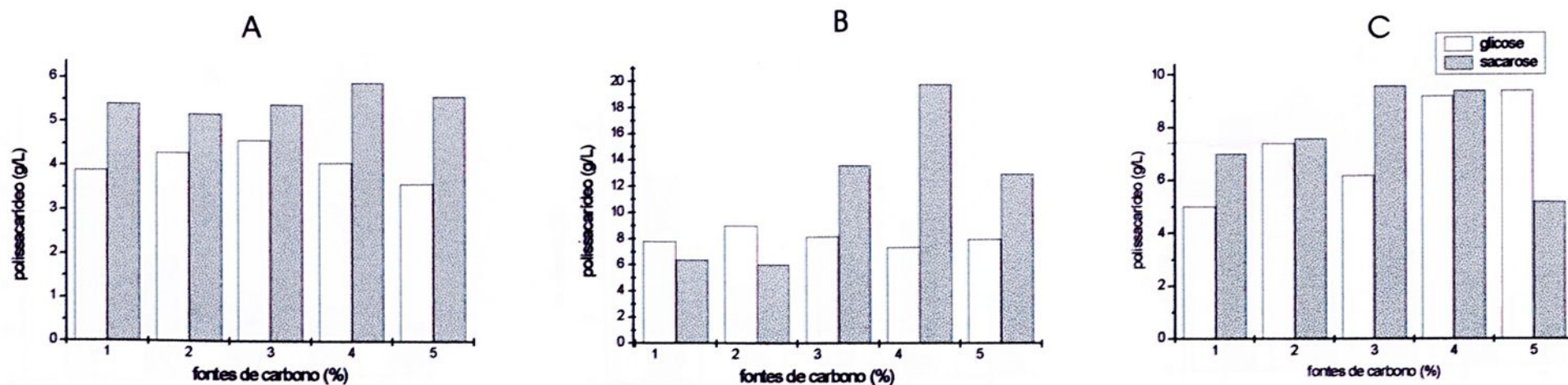


Figura 18. Produção de polissacarídeo das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h.

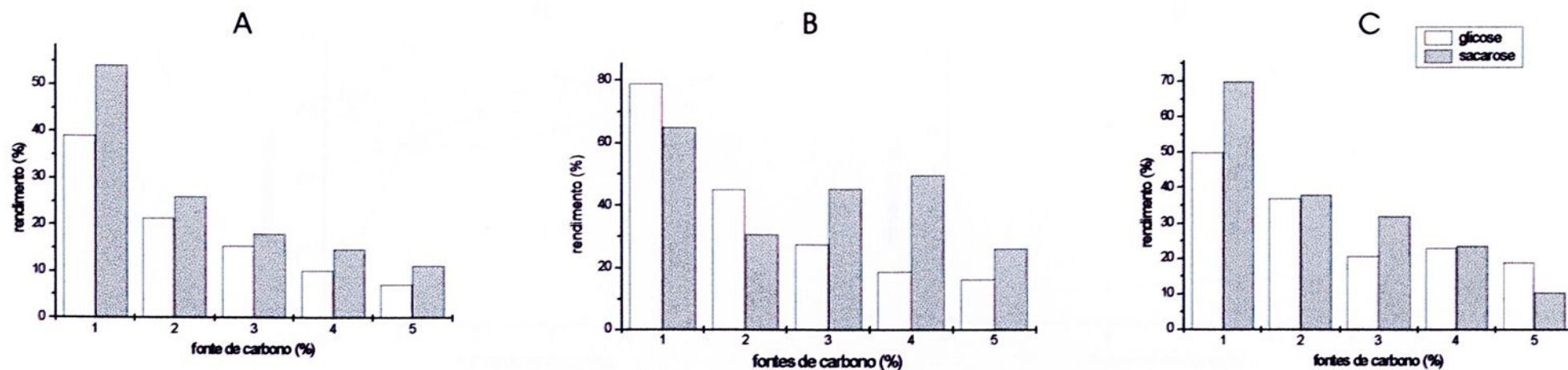


Figura 19. Rendimento da produção de polissacarídeo das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h.

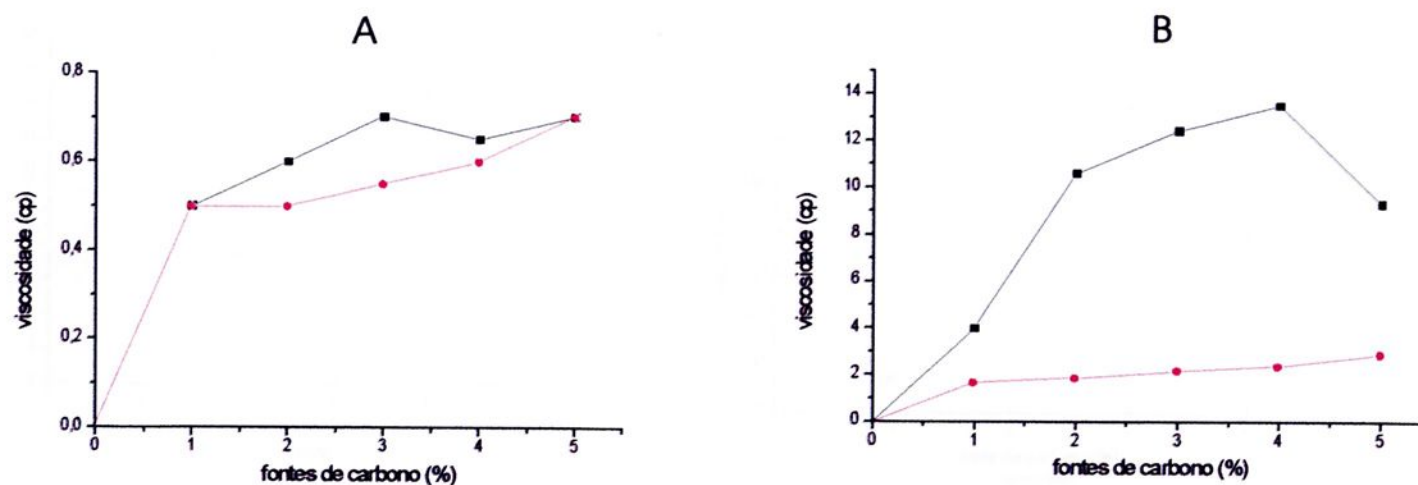


Figura 20. Viscosidade do caldo de fermentação em relação as fontes de carbono das bactérias 18E (A) e 39A (B), incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h (■ glicose; ● sacarose).

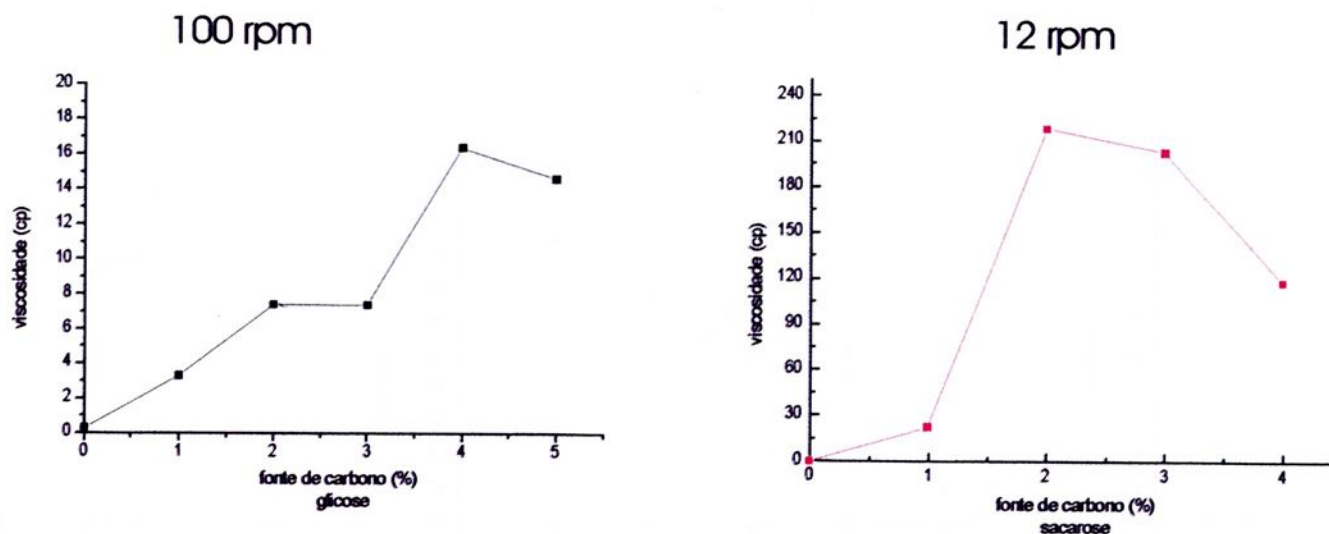


Figura 21. Viscosidade do caldo de fermentação em relação as fontes de carbono da bactéria 24A, incubada à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h, em 100 e 12 rpm (■ glicose; ■ sacarose).

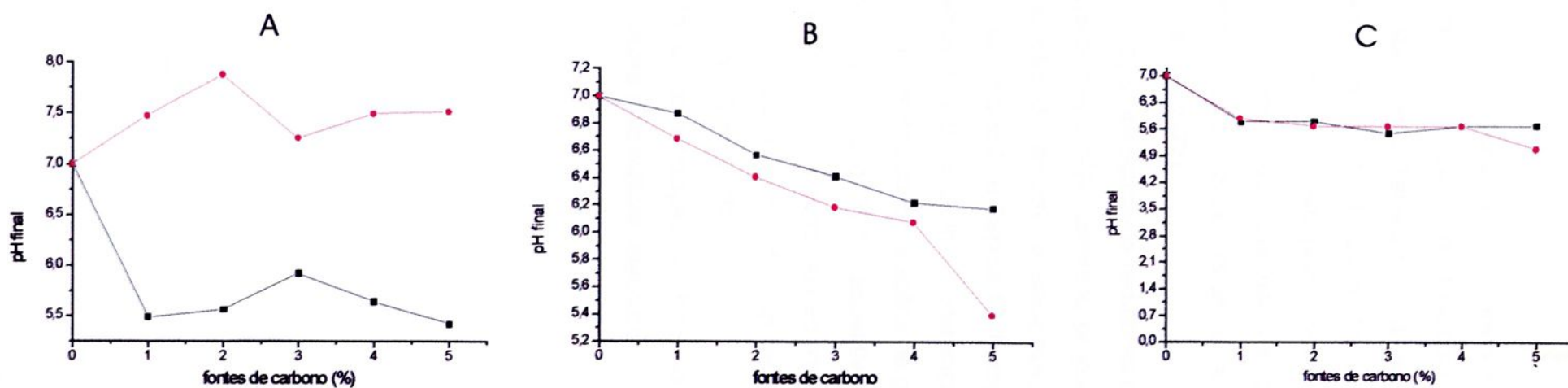


Figura 22. Variação do pH do caldo de fermentação das bactérias 18E (A), 39A (B) e 24A (C), em relação as fontes de carbono, incubadas à 30°C e 200 rpm durante o período de 96 h (■ glicose; ● sacarose).

Em relação a bactéria 18E, na Tabela 6, o teor de glicose residual aumentando a medida em que aumenta a concentração desta no caldo de fermentação. Esta mesma Tabela mostra que o teor de açúcar redutor residual no caldo de fermentação aumentou até a concentração de 4% de sacarose. Em 5% diminuiu, isto pode ser explicado pelo maior crescimento celular nesta concentração o que não implicou em uma maior produção de polissacarídeo. Este mesmo comportamento foi observado no trabalho de Kovacs & Kang (1977)

A concentração de açúcares redutores residuais no caldo de fermentação da bactéria 39A e 24A aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de glicose e sacarose, como pode ser verificado nas Tabela 8 (bactéria 39A) e Tabela 10 (bactéria 24A).

As Tabelas 7 e 9 mostram a presença de proteína no caldo de fermentação nas diferentes concentrações de glicose e sacarose utilizadas pelas as bactérias 18E e 39A, respectivamente. Este fato provavelmente deve-se a eliminação de enzimas ao meio de cultura, onde estas enzimas realizariam o acoplamento das unidades de açúcar que formam o polissacarídeo (VALLA et al., 2001).

No caldo de fermentação da bactéria 24A não foram detectadas proteínas residuais pelo método utilizado.



Tabela 6. Dosagem de açúcares redutores residuais do caldo de fermentação da bactéria 18E, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.

Glicose Inicial (g/L)	Açúcar residual (g/L)
10	4,28
20	10,09
30	15,57
40	21,66
50	27,24
Sacarose Inicial (g/L)	
10	0,57
20	0,88
30	16,64
40	31,59
50	16,46

Tabela 7. Dosagem de proteínas do caldo de fermentação da bactéria 18E, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.

Glicose (%)	Proteína (mg/L)	Sacarose (%)	Proteína (mg/L)
1	1,17	1	4,87
2	0,33	2	4,15
3	1,41	3	2,57
4	1,33	4	2,50
5	3,15	5	2,98

Tabela 8. Dosagem de açúcares redutores residuais do caldo de fermentação da bactéria 39A, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.

Glicose Inicial (g/L)	Açúcar residual (g/L)
10	1,46
20	5,45
30	11,06
40	13,76
50	19,72
Sacarose inicial (g/L)	
10	2,03
20	6,93
30	13,01
40	18,69
50	23,93

Tabela 9. Dosagem de proteínas do caldo de fermentação da bactéria 39A, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.

Glicose (%)	Proteína (mg/L)	Sacarose (%)	Proteína (mg/L)
1	0,26	1	0,12
2	0,50	2	0,22
3	1,04	3	1,54
4	0	4	0,21
5	0	5	0,37

Tabela 10. Dosagem de açúcares redutores residuais do caldo de fermentação da bactéria 24A, após 96 h de incubação, a 30°C e 200 rpm utilizando como fonte de carbono glicose e sacarose.

Glicose Inicial (g/L)	Açúcar residual (g/L)
10	0,03
20	3,58
30	14,15
40	18,81
50	26,73
Sacarose inicial (g/L)	
10	0,19
20	2,21
30	4,96
40	17,02
50	36,33

Com o aumento da concentração das fontes de carbono, foi observado um aumento gradual da massa celular, mas isto não refletiu em aumento na produção de polissacarídeo e conseqüentemente no rendimento. Este comportamento tem sido observado por vários pesquisadores, os quais verificaram que o crescimento não é apenas dependente da fonte de carbono utilizada, mas também, deve estar envolvido um outro fator nutricional (SOUW & DEMAINE, 1979; KAWAI et al., 1992; GANDHI et al., 1997; VERMANI et al., 1995). Portanto, foi verificado o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de fermentação.

4.4.2.3. SELEÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Foram testadas como fontes nitrogênio NaNO_3 e KNO_3 nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 mM, em substituição ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração de 15 mM do meio base utilizado baseado no trabalho de Souw & Demain (1979) como a ideal para a produção de polissacarídeos microbianos. Estas fontes não estimularam o crescimento da bactéria 18E.

Nas Figuras 23 e 24 estão representados os resultados obtidos das fontes de nitrogênio (NaNO_3 e KNO_3) para as bactérias 39A e 24A, respectivamente. Pode ser observado que o aumento do teor de nitrogênio não promoveu o aumento na produção de polissacarídeo e sim aumento da massa celular até 30 mM e posteriormente começa a decrescer. Portanto, pode-se dizer que excesso de nitrogênio inibe a produção de polissacarídeo estimulando o crescimento, enquanto baixas concentrações promovem o efeito contrário. Portanto, a melhor produção do polissacarídeo ocorre sob limitação de nitrogênio o que esta de acordo com vários autores (SUTHELAND, 1972; MARGARITIS & PACE, 1985; SUTHERLAND, 1994; VERMANI et al., 1995; GANDHI et al. 1997; SAMAIN et al., 1997).

Nas Tabelas 11 e 12 pode ser observado que, das fontes de nitrogênio testadas, o NaNO_3 e o KNO_3 apresentaram melhores rendimentos que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Portanto, ambas as fontes podem substituir o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Em relação a concentração dos açúcares residuais (Figuras 23 e 24), pode-se observar que o açúcar do meio de fermentação diminuiu com o aumento na concentração das duas fontes de nitrogênio, acompanhado de um aumento proporcional do crescimento celular nessas concentrações. É importante destacar que, o teor de açúcar residual foi mais alto nas menores concentrações das fontes de nitrogênio, onde obtivemos maior rendimento e produtividade, indicando uma boa



produção de polissacarídeo no menor crescimento celular, portanto o açúcar não consumido pelas bactérias é utilizado para polimerização das unidades do polissacarídeo.

Na Tabela 11, o pH do caldo de fermentação da bactéria 39A, variou de 7,9 até 8,7 com o aumento das concentrações das duas fontes de nitrogênio e a viscosidade do caldo manteve-se praticamente homogênea. Foi utilizado um caldo de fermentação contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como controle, neste a viscosidade foi maior e o pH diminuiu até 5,8. No controle o pH teve um papel importante, pois em um pH mais baixo o polissacarídeo pode apresentar uma estrutura química diferente das condições anteriores e assumir uma conformação em solução que favoreceria o aumento de viscosidade, uma vez que, pequenas mudanças na estrutura podem alterar as propriedades físicas destas macromoléculas (SUTHERLAND, 1997).

O rendimento do caldo de fermentação da bactéria 39A obtido com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi 48% e para NaNO_3 70%, apesar disto, a viscosidade obtida para o sulfato de amônio foi 4 vezes maior. Observa-se, portanto que, pequenas diferenças na composição do caldo de fermentação podem originar produtos com diferentes propriedades físico-químicas (Tabela 11).

Na Figura 24 estão representados os resultados obtidos durante a produção do polissacarídeo pela bactéria 24A. A maior produção de polissacarídeo foi obtida nas menores concentrações da fonte de nitrogênio, 5 e 10 mM para NaNO_3 , e 10 e 20 mM para KNO_3 . A maior viscosidade foi observada na menor concentração de nitrogênio e a medida que aumenta esta concentração a viscosidade diminui. O açúcar residual diminui a medida que aumenta o teor de nitrogênio, portanto, a bactéria é estimulada para crescimento, uma vez que, houve aumento do peso celular seco. O pH permaneceu acima de 7,0.

Alguns autores encontraram este mesmo tipo de comportamento no crescimento e na produção de exopolissacarídeos por



Azotobacter vinelandii (VERMANI et al. 1995), onde a maior produção de polissacarídeo ocorreu na menor concentração de KNO_3 (0,10 g/l) e com aumento da concentração das fontes de nitrogênio com NaNO_3 e KNO_3 aumentou o crescimento celular. O mesmo ocorreu na produção de xantana por *Xanthomonas campestris* e, neste experimento, o nitrato de sódio e o nitrato de amônio foram mais efetivos (os rendimentos foram maiores) do que o sulfato de amônio na concentração de 7,5 mM para produção de xantana (SOUW & DEMAINE, 1979).

Na Figura 24, podemos verificar que caldo de fermentação contendo a bactéria 24A apresentou diminuição da viscosidade com o aumento da concentração das fontes de nitrogênio. Na Tabela 12, podemos observar que o maior rendimento foi obtido com NaNO_3 a 10 mM, mas a viscosidade foi maior na concentração de NaNO_3 5 mM, onde foi obtido o menor valor de pH (7,10), o qual aumentou com o incremento da concentração das duas fontes de nitrogênio. Segundo Margaritis & Pace (1986), o pH ótimo para crescimento e produção de polissacarídeos está na faixa de 6,0 a 7,5. Quando o pH do meio de produção começa a ficar mais ácido ou alcalino o rendimento e a produção de polissacarídeo diminuem (KAWAI et al., 1992).

Muitas enzimas responsáveis pela conversão de produtos do metabolismo até o polissacarídeo final são sensíveis as variações de pH, e muitas vezes o pH é alterado pelo efeito do próprio produto eliminado no meio de cultura. Este fato foi verificado com a enzima lactato desidrogenase, sensível a variações de pH, cuja ativação é mediada pela frutose 1,6-difosfato, que é reduzida, causando aumento do pH (HOFVENDAHL et al., 1999).



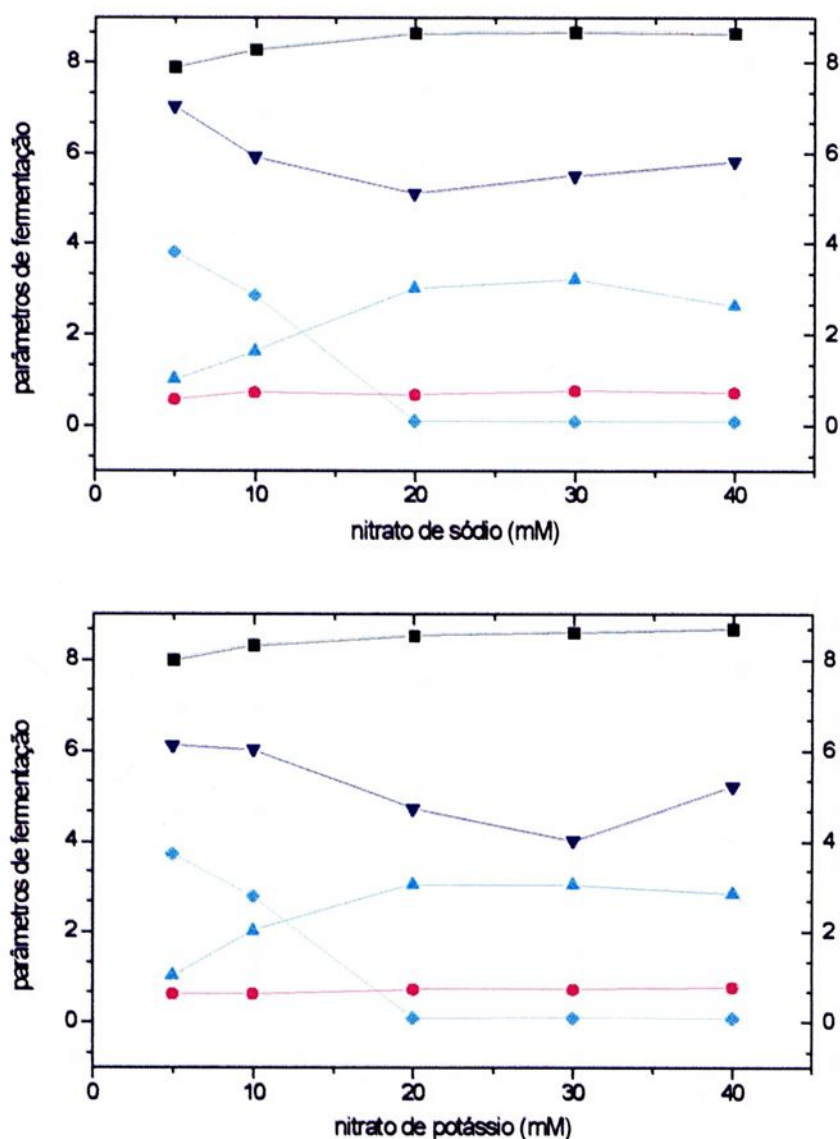


Figura 23. Parâmetros de fermentação obtidos para a bactéria 39A na seleção de fontes de nitrogênio, incubada a 30°C e 200 rpm durante um período de 96 h (■ pH; ● viscosidade (cp); ▲ peso celular seco (g/L); ▼ polissacarídeo (g/L); ◆ açúcar residual (g/L)).

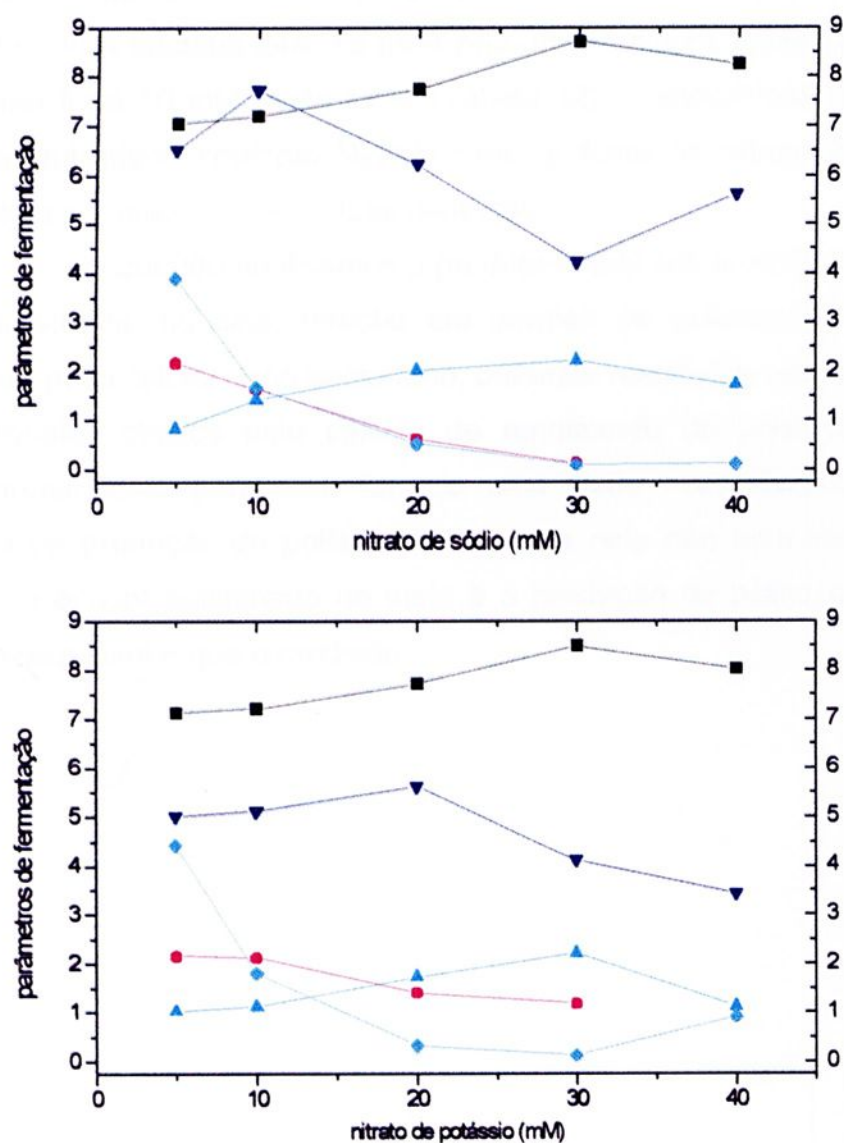


Figura 24. Parâmetros de fermentação obtidos para a bactéria 24A na seleção de fontes de nitrogênio, incubada a 30°C e 200 rpm durante um período de 96 h (■ pH; ● viscosidade (cp); ▲ peso celular seco (g/L); ▼ polissacarídeo (g/L); ◆ açúcar residual (g/L)).

Nas Tabelas 11, podemos verificar que a bactéria 39A apresentou maior rendimento e produtividade na concentração de 5 mM de NaNO_3 . Já a bactéria 24A, foi mais produtiva a 5 mM, porém o maior rendimento foi a 10 mM desta fonte (Tabela 12). É importante destacar que a produtividade confirma NaNO_3 como a fonte de nitrogênio mais adequada a ser utilizada pelas duas bactérias.

Quando analisamos o produto obtido sob o ponto de vista da produtividade, ou seja, relação em gramas de polissacarídeo por gramas de peso celular seco bacteriano, obtemos resultados nem sempre iguais aqueles obtidos pelo cálculo de rendimento do polissacarídeo convencional. Esse parâmetro fornece uma visão mais detalhada do processo de produção do polissacarídeo, pois nele não está envolvido somente o açúcar adicionado ao meio e a produção de polissacarídeo, mas a massa celular que o produziu.



Tabela 11. Parâmetros de fermentação na produção de polissacarídeos pela bactéria 39A, em meio contendo glicose a 1%, adicionado de diferentes concentrações da fonte de nitrogênio e incubado a 30°C, por 96 h e 200 rpm.

NaNO ₃ (mM)	pH	Viscosidade (cp)	Peso celular seco (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade *
5	7,9	0,55	1,0	70	7,0
10	8,3	0,70	1,6	59	3,7
20	8,6	0,65	3,0	51	1,7
30	8,7	0,75	3,2	55	1,7
40	8,6	0,70	2,6	58	2,2
KNO ₃ (mM)					
5	8,0	0,60	1,0	61	6,1
10	8,3	0,60	2,0	60	3,0
20	8,5	0,70	3,0	47	1,6
30	8,6	0,70	3,0	40	1,3
40	8,7	0,75	2,8	45	1,6
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)					
15 mM	5,8	2,3	1,4	48	3,4

* g polissacarídeo / g peso celular seco



Tabela 12. Produção de polissacarídeos pela bactéria 24A, em meio contendo glicose a 1%, adicionado de diferentes concentrações da fonte de nitrogênio e incubado a 30°C, por 96 h e 200 rpm.

NaNO ₃ (mM)	pH	Viscosidade (cp) 20 rpm	Peso celular seco (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade *
5	7,1	215,35	0,8	65	8,1
10	7,2	163,05	1,4	77	5,5
20	7,7	59,55	2,0	62	3,1
30	8,7	12,30	2,2	42	1,9
40	8,2	-	1,7	56	3,3
KNO₃ (mM)					
5	7,1	213,50	1,0	50	5,0
10	7,2	208,30	1,1	51	4,6
20	7,7	138,35	1,7	56	3,3
30	8,5	1,55	2,2	41	1,9
40	8,0	-	1,1	34	3,1
(NH₄)₂SO₄ (mM)					
15 mM	6,0	41,9	2,9	30	1.0

* g polissacarídeo / g peso celular seco

4.4.2.4. SELEÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH

O pH e a temperatura são os fatores que mais afetam o crescimento e a formação de produtos microbianos. Na otimização de processos fermentativos é importante determinar a temperatura ótima para crescimento microbiano junto com o pH ótimo. Esses fatores nem sempre estão diretamente relacionados, quer dizer, um crescimento ótimo



em um pH ótimo, nem sempre ocorre a maior formação de polissacarídeos (ESGALHADO et al., 1994).

Após as condições de cultivo, em função do tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio terem sido otimizadas, foi pesquisado o efeito do pH inicial do meio de fermentação e da temperatura de incubação sobre a produção de polissacarídeo. As condições de pH iniciais foram de 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

Foi testado o efeito da temperatura na faixa de 20 a 40°C. Estas temperaturas foram escolhidas, devido a encontrar-se dentro da faixa de crescimento das bactérias mesofílicas.

A Figura 25 mostra a influência da temperatura sobre os parâmetros de fermentação das bactérias 18E, 39A e 24A.

Podemos observar que a variação da temperatura de incubação sobre o caldo de fermentação da bactéria 18E não teve muito efeito nos parâmetros de fermentação (pH final, viscosidade e massa celular), pois estes sofreram ligeiras variações (Figura 25). A temperatura influenciou a produção de polissacarídeo e consequentemente o rendimento, pois houve maior produção de polissacarídeo na temperatura de 35°C, onde obtivemos um rendimento de 47%. A concentração de açúcar residual no caldo de fermentação permaneceu entre 7 e 8 g/L, não sofrendo grandes variações.

Em relação a bactéria 39A podemos observar que a temperatura de incubação não afetou a viscosidade do caldo de fermentação, pois este permaneceu praticamente constante com a variação da temperatura. A massa celular bacteriana foi maior na temperatura de 25°C, entretanto, a produção de polissacarídeo só aumentou até 30°C, onde foi obtido um rendimento de 49%. O pH do caldo de fermentação diminuiu com o aumento da temperatura de incubação. A concentração de açúcar residual permaneceu praticamente constante (Figura 25).



Para a bactéria 24A, a temperatura influenciou a massa celular, a qual foi maior a 25°C. A maior produção de polissacarídeo, e consequentemente, o maior rendimento ocorreu na temperaturas de 25 e 30°C. A maior viscosidade foi obtida a 30°C. O pH do caldo de fermentação sofreu pouca variação com o aumento da temperatura de incubação. A menor concentração de açúcar residual no caldo de fermentação foi obtida a 25°C.

Em um trabalho realizado por Vermani et al. (1995), sobre a produção de polissacarídeo por uma linhagem de *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460, eles obtiveram uma temperatura ótima de crescimento de 25°C, enquanto que para a síntese do polissacarídeo foi de 30°C. Portanto, em nosso experimento, a temperatura mostrou ser um fator importante para o crescimento e produção do polissacarídeo, e verificamos que a temperatura ideal para o crescimento foi diferente da temperatura ideal para a produção do polissacarídeo, que por sua vez, variou conforme a cultura utilizada.



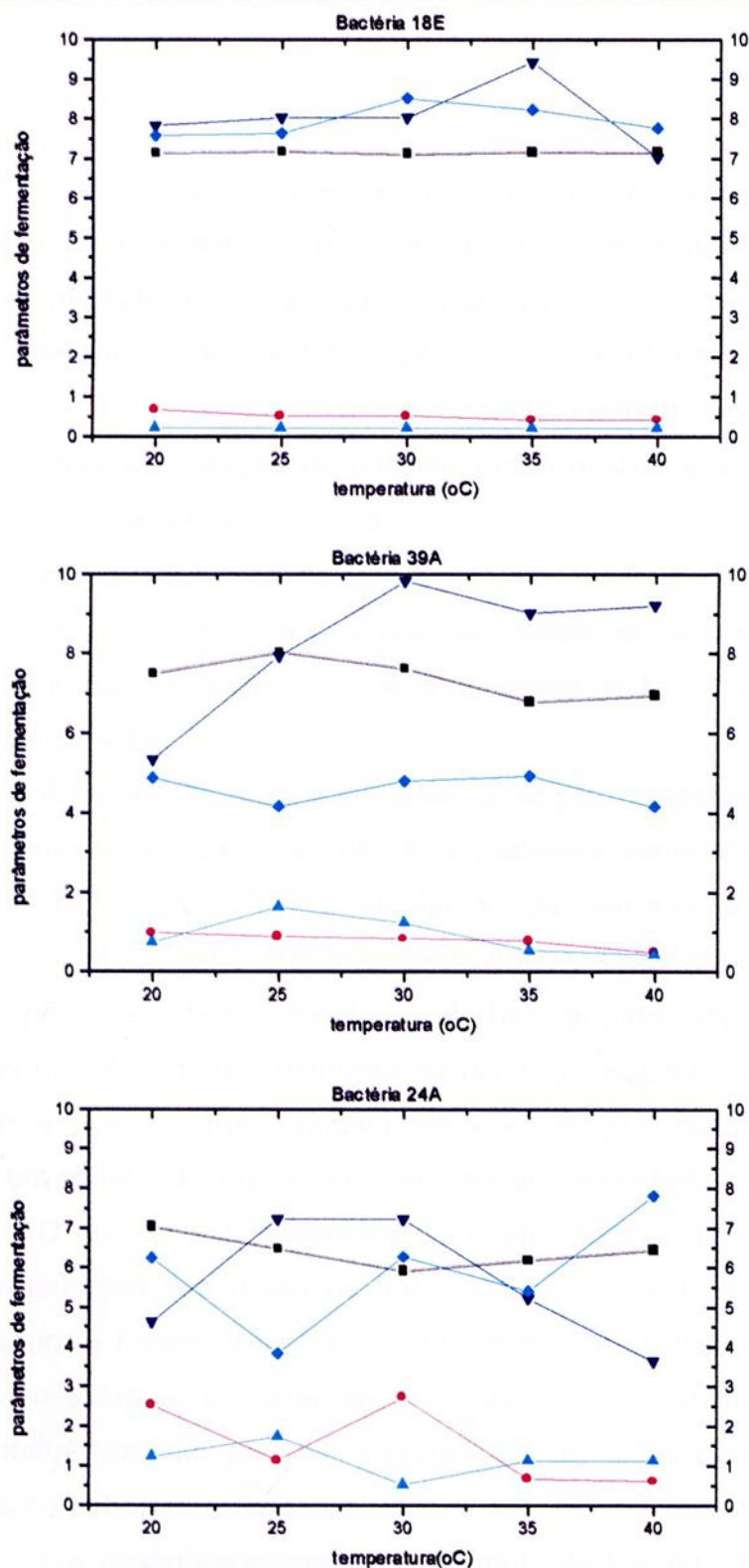


Figura 25. Parâmetros de fermentação obtidos para as bactérias 18E, 39A e 24A, variando a temperatura de incubação, a 200 rpm durante um período de 96 h (■ pH; ● viscosidade (cp); ▲ peso celular seco (g/L); ▼ polissacarídeo (g/L); ◆ açúcar residual (g/L)).

Como pode ser observado na Figura 26, houve melhor produção de polissacarídeo em pH próximo da neutralidade. Para a bactéria 18E o pH indicado para melhor produção de polissacarídeo foi 6,0; enquanto para a bactéria 39A foi o pH 7,0 e para a bactéria 24A foi na faixa de 7,0 – 8,0, o que esta de acordo com Margaritis & Pace (1985), que verificaram que a produção de polissacarídeo ocorre apenas numa faixa estreita de pH que vai de 6,0 – 7,5.

Em nosso experimento podemos verificar que o pH influenciou muito pouco a massa celular em todas as bactérias. Foi observado apenas uma variação mínima dos valores ao final do período de incubação (Figura 26).

A Figura 26, mostra a influência do pH na viscosidade do caldo de fermentação da bactéria 18E, aqui podemos verificar que não houve variação ao final do tempo de incubação. Já com a bactéria 39A, ocorreu um ligeiro decréscimo com o aumento do pH, e por último, com a bactéria 24A, pode ser observado que o pH teve grande influência na viscosidade, principalmente nos extremos de pH, 6,0 e 8,0, indicando que possivelmente o polissacarídeo estava ionizado, e que assumiu uma conformação em solução favorável para uma maior viscosidade.

O teor de açúcar residual foi praticamente constante nos caldos de fermentação das bactérias 18E e 39A. Para a bactéria 24A foram obtidos teores baixos nos pH 6,0 e 8,0, nestes foram determinadas as maiores viscosidades no caldo de fermentação, confirmando neste caso, uma influência do pH na viscosidade do polissacarídeo e possivelmente na estrutura química do mesmo (SUTHERLAND, 1994).

Em nosso experimento, o exemplo da bactéria 24A, é o mais elucidativo para confirmar a necessidade de realizar testes em relação as condições de fermentação de acordo com a aplicabilidade do produto final, pois neste caso se a necessidade for um polissacarídeo com maior rendimento, a temperatura poderia ser 25 e 30°C enquanto o pH selecionado seria 7,0 ou 8,0. Se o objetivo do produto fosse a maior



viscosidade em solução, a temperatura ótima seria 30°C e o pH ideal seria 6.0. Resultados semelhantes foram obtidos por Esgalho et al. (1994), quando verificaram o efeito do pH e temperatura no crescimento celular e produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*. Eles ainda destacaram que durante os processos de otimização é desejável maximizar mais um parâmetro do que outro.



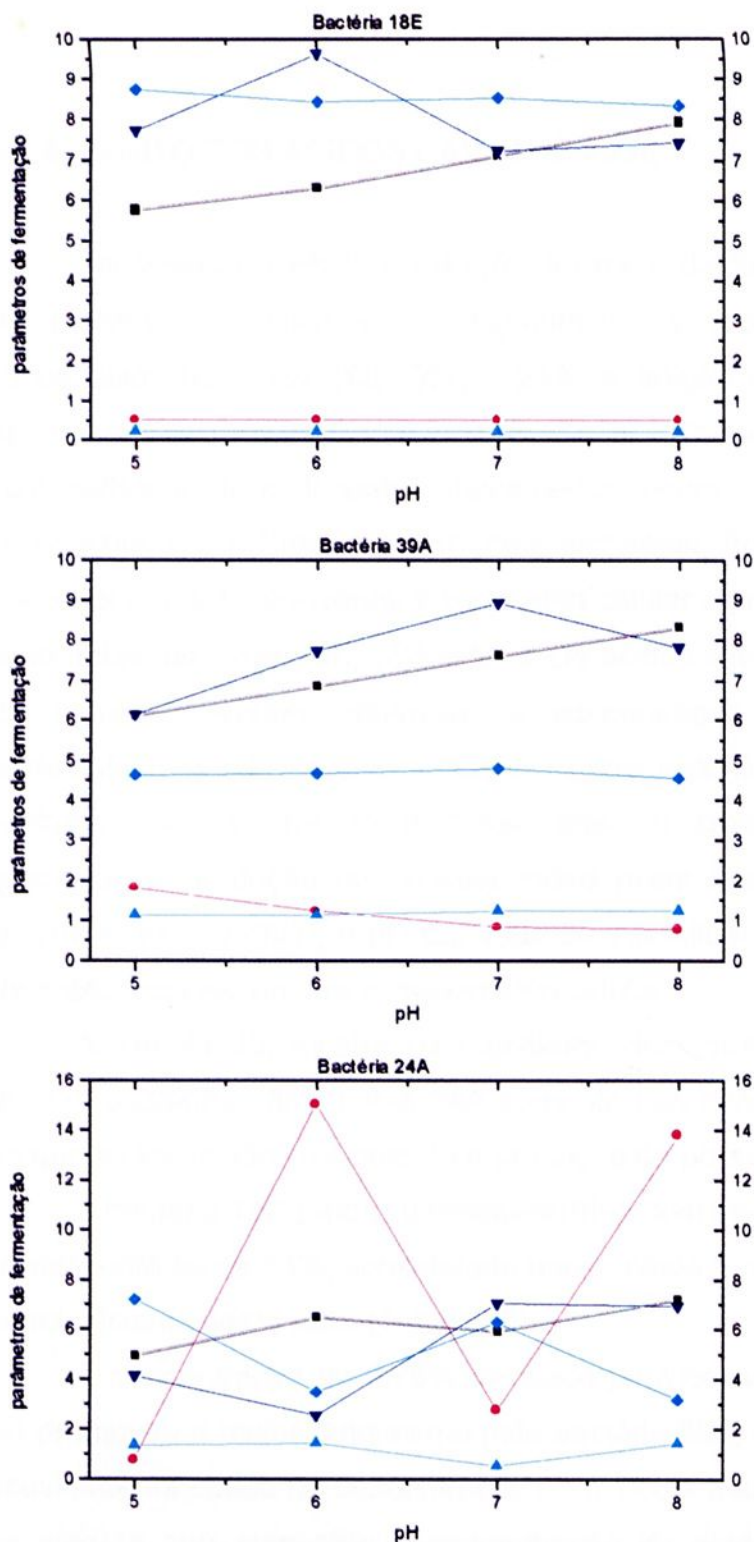


Figura 26. Parâmetros de fermentação obtidos para as bactérias 18E, 39A e 24A, incubadas a 30°C e 200 rpm durante um período de 96 h, variando o pH inicial do caldo de fermentação (■ pH final; ● viscosidade (cp); ▲ peso celular seco (g/L); ▼ polissacarídeo (g/L); ◆ açúcar residual (g/L)).

4.4.2.5. EFEITO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Foi testado o efeito da adição ao meio de fermentação dos ácidos pirúvico, succínico e α -cetoglutárico na produção de polissacarídeos pelas bactérias 18E, 39A e 24A. A adição dos ácidos carboxílicos, nas concentrações 0,1; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5%, ao meio de produção não melhorou os rendimentos previamente obtidos com o meio contendo as concentrações ótimas de carbono e nitrogênio. Apesar disto, o ácido pirúvico foi o que proporcionou crescimento celular e produção de polissacarídeo pelas bactérias 18E, 39A e 24A. Os ácidos succínico e α -cetoglutárico somente tiveram influência na concentração de 0,1%. Provavelmente este resultado deve-se ao efeito do abaixamento do pH no meio de cultura, pois um pH muito baixo afeta o crescimento e consequentemente, a produção de polissacarídeo pelas bactérias. De acordo com Triveni et al. (2001), o pH por volta de 7,0 influencia mais a produção de polissacarídeo do que o crescimento celular.

A Tabela 13, mostra os resultados dos parâmetros de fermentação das bactérias 18E, 39A e 24A somente nas concentrações de ácido em que foi verificado crescimento e produção de polissacarídeo.

A bactéria 18E produziu polissacarídeo com ácido pirúvico a 0,1%. O rendimento foi de 14%, considerado baixo, desta forma o ácido pirúvico não foi eficiente neste caso (Tabela 13).

A concentração de 0,75% de ácido pirúvico no caldo de fermentação promoveu o maior rendimento pela bactéria 39A, entretanto, a maior viscosidade foi obtida na concentração de 0,1%. A massa celular diminuiu na medida que aumentou a concentração de ácido pirúvico. Observa-se também que, a quantidade de açúcar residual aumenta com a diminuição do crescimento e o pH alcança os menores valores do processo.

Na Tabela 13, verificamos os resultados da influência do ácido pirúvico no caldo de fermentação da bactéria 24A, o aumento da



concentração de ácido pirúvico estimulou o crescimento, e aumentou a produção de polissacarídeo até a concentração de 0,75%. O maior rendimento foi de 58%, nesta mesma concentração. Em concentrações acima, a viscosidade diminuiu. Os ácidos succínico e α -cetoglutarico influenciaram a produção de polissacarídeo apenas na concentração de 0,1%, mas com valores menores de rendimento.

Dos ácidos carboxílicos testados, apenas o ácido pirúvico teve influência na produção e viscosidade do caldo de cultura. A menor concentração foi mais eficiente para todas as bactérias. Nas bactérias 18E e 39A, concentrações acima da ótima inibem o crescimento. A bactéria 24A foi a menos afetada, já que é capaz de suportar altas concentrações destes ácidos, provavelmente porque o pH do meio com ácido pirúvico permanece em torno da neutralidade (6,96 – 7,73).



Tabela 13. Efeito do teor de ácido pirúvico na produção de polissacarídeos pelas bactérias 24A, 39A e 18E, incubadas a 30°C, por 96 h e 200 rpm.

Bactéria	Ácido Pirúvico (%)	pH	Viscosidade (cp)	Peso celular seco (g/L)	Polissacarídeo (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade *	Açúcar residual (g/L)
24A	0,1	7,65	24,8	0,9	3,4	34	3,8	3,88
	0,5	7,73	24,6	1,0	3,2	32	3,2	4,61
	0,75	7,66	21,3	0,9	5,8	58	7,2	4,06
	1,0	6,96	15,7	1,7	4,4	44	2,6	3,78
	1,5	7,46	17,8	2,0	5,4	54	2,7	4,31
39A	0,1	7,18	21,1	0,8	2,0	20	2,5	7,67
	0,5	4,60	1,15	0,4	4,2	42	10,5	11,95
	0,75	4,23	0,65	0,4	4,6	46	9,2	15,25
18E	0,1	7,06	15,2	0,9	3,2	32	3,6	8,78

* g polissacarídeo / g peso celular seco



5. CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.

5.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da biota bacteriana dos diferentes ambientes é importante para poder fazer uso racional dos produtos que os microrganismos possam oferecer como subproduto de seu metabolismo (DEMAIN, 2000).

A aplicação de métodos moleculares na caracterização da comunidade microbiana na natureza vem permitindo uma expansão significativa do conhecimento sobre a diversidade microbiana. As seqüências de DNA dos microrganismos isoladas do meio ambiente são raramente idênticas às seqüências de organismos isolados e cultivados, sugerindo que o nosso conhecimento da estrutura filogenética da biosfera microbiana com base no isolamento e cultivo é seriamente limitado (CANHOS et al., 1999).

A caracterização bioquímica ideal utilizando esquemas de identificação não é sempre possível, particularmente gênero e espécie não susceptíveis de serem caracterizados pelos testes bioquímicos tradicionais. Para muitos gêneros e espécies a identificação não pode ser baseada apenas em poucos testes, mas num conjunto dado pela aplicação de uma bateria inteira destes. Estes esquemas estão baseados em um ou mais caracteres ou num padrão de caracteres constantes que todos os membros de um grupo de microrganismos apresentam (DE VUYST & DEGEEST, 1999).

Em geral, as características escolhidas para o esquema de identificação devem ser menos complexas que aquelas usadas para classificação, pois neste estão envolvidas grande número de

características bioquímicas e valores homólogos de DNA. A prova genética representa a mais nova tecnologia para identificação definitiva das bactérias. A técnica é baseada na detecção de uma porção específica de material genético de um microrganismo. A prova consiste de um pequeno fragmento de DNA que tem uma sequência de nucleotídeos única de cada espécie ou gênero. Alguns métodos químicos e moleculares têm imenso potencial na qualificação da diversidade microbiana em amostras ambientais; em particular o 16 S RNAr tem-se mostrado muito promissor em relação as bactérias (O'DONNELL et al., 1994). Portanto, esta etapa do trabalho tem como objetivo a identificação das bactérias utilizadas para a produção de polissacarídeos através de métodos bioquímicos tradicionais e técnicas de Biologia Molecular.



5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as bactérias utilizadas durante o estudo utilizando:
 - Testes bioquímicos e de produção de exoenzimas;
 - Técnicas de coloração;
 - Esquemas de kits para identificação bacteriana;
 - Técnicas de Biologia Molecular.



5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

As amostras da rizosfera foram coletadas de plantas encontradas na Reserva Ecológica do Noroeste Paulista, escolhidas aleatoriamente, com o mínimo de terra possível. Essas amostras foram coletadas a uma profundidade de 15 cm em relação à superfície do solo, com o auxílio de uma pinça e uma tesoura desinfetadas em álcool 70%. Em seguida, foram colocadas dentro de um frasco fechado, previamente esterilizado, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável e, imediatamente, levadas ao laboratório para o processamento das mesmas, devidamente identificadas.

Foram pesadas 10 g das raízes com a terra remanescente e lavadas com 90 mL de água destilada estéril. A partir dessa, foram feitas diluições decimais seriadas até diluição 10^{-15} , das quais, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL, que foi semeada em superfície com auxílio de uma alça de Drigalsky em placas de Petri contendo o meio Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas a 30°C por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A cada 24 horas as culturas que cresciam formando colônias isoladas, gomosas e brilhantes foram selecionadas e novamente semeadas em placas de Petri contendo PCA para a purificação da cultura.

5.3.2. OBTENÇÃO DA CULTURA PURA

O método utilizado para obtenção da cultura pura foi o de esgotamento em estrias superficiais em placa de Petri contendo PCA. Para a avaliação da pureza da cultura foram feitos esfregaços em lâminas de microscópio e a seguir, coradas pelo método de Gram. Desta forma, puderam ser observadas as características microscópicas das bactérias



isoladas. A descrição da técnica de coloração de Gram está detalhada no Anexo I.

5.3.3. MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a manutenção e a propagação das bactérias, as culturas purificadas foram semeadas por esgotamento em estrias superficiais, em tubos contendo PCA inclinado, incubadas a 30°C durante 24 horas e, depois, mantidas na geladeira à temperatura de 7°C. As bactérias selecionadas permaneceram neste meio até a data de serem repicadas para a realização das provas bioquímicas necessárias a cada uma delas. As culturas foram armazenadas sob camada de óleo mineral em um outro tubo contendo PCA inclinado e foram usadas como culturas estoque.

5.3.4. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias, previamente isoladas de amostras de solo, foram identificadas através das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de acordo com Bergey's (1984). A descrição dos testes bioquímicos, produção de exoenzimas e técnicas de coloração de Gram e esporos utilizados encontra-se detalhada no anexo I.

Foi utilizada também a fermentação de açúcares que compõem as galerias do Kit API 50 CH para a caracterização do gênero *Bacillus*. A maneira de execução e análise do teste encontra-se no anexo II.

A identificação foi complementada, até espécie, através de técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que vem sendo empregada recentemente em análises de bactérias isoladas do solo. Os

protocolos utilizados para execução das técnicas estão detalhados no Anexo III.



5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS

A maior parte dos pesquisadores são da opinião de que a classificação bacteriana apresenta considerável dificuldade devido a grande diversidade biológica. Esta ampla divergência da divisão taxonômica está refletida nos diferentes sistemas de classificação propostos (SHEWAN et al., 1960) e as respostas têm sido das mais variadas devido a disparidade dos testes discriminatórios. Para evitar esta variação e dificuldades durante a construção do esquema de identificação, e para que nossos resultados sejam compatíveis aos obtidos por outros laboratórios, foi necessário padronizar o tamanho do inóculo, a temperatura de incubação, a duração do período de incubação de alguns testes e a composição do meio de cultura durante toda a pesquisa.

De acordo com Pelczar (1996), ao determinar as características de um microrganismo, ele deve estar em cultura pura, na qual todas as células da população são idênticas, por terem sido originadas de uma mesma célula. Para observação da cultura pura faz-se uso de corantes. Através da coloração obtém-se um contraste entre a célula e o meio, permitindo uma melhor visualização de sua morfologia. A morfologia estuda o tamanho, forma (coco, bastonete e espiral) e arranjo das células (em cadeia, pares, tétrades).

Dentre as colorações utilizadas para o estudo das células bacterianas, destaca-se a coloração de Gram, que é um dos procedimentos mais importantes e utilizados para caracterizar as bactérias. Elas foram divididas em dois grandes grupos em função de sua capacidade de reter (Gram positivas) ou perder (Gram negativas) o



corante primário (cristal violeta) da coloração de Gram, após descoloração com álcool (Bergey's, 1984).

As culturas bacterianas ao crescerem num meio de cultura sólido padrão ou específico formam diversos tipos de colônias que diferem em aspecto, coloração, elevação, consistência, odor e opacidade, e que podem fornecer informações relevantes na identificação de um microrganismo (Pelczar, 1980).

Nesta pesquisa as 3 bactérias selecionadas foram isoladas do solo, mais precisamente da rizosfera das plantas: Comiguinguém-pode (*Dieffenbachia amoena*) bactérias denominadas 24A e 39A e Flamboyant (*Delonix regia*) bactéria 18E. As características morfológicas das colônias e as características morfo-tintoriais da célula bacteriana estão apresentadas na Tabela 14.

Foram determinadas algumas características bioquímicas e enzimáticas destas mesmas bactérias e os resultados estão demonstrados nas Tabelas 15 e 16.

Com base nos resultados obtidos acima, as bactérias foram agrupadas nos gêneros apresentados nas Tabelas 17 e 18. A porcentagem de similaridade indica a possibilidade delas pertencerem com maior ou menor probabilidade a um determinado gênero. Entretanto, foi necessário realizar testes bioquímicos mais detalhados para confirmação destes resultados na tentativa de estabelecer sua espécie. Estes testes podem identificar, com certa aproximação, vários outros gêneros como pode ser verificado nestas mesmas Tabelas, pois a similaridade fenotípica de diferentes gêneros fazem a identificação de novos isolados difícil e desta forma haverá menor ou maior probabilidade de pertencer aos gêneros descritos ou até mesmo outros gêneros não descritos.

Os testes bioquímicos mencionados acima são de rotina para o início da caracterização de um microrganismo desconhecido e, posteriormente deve-se realizar testes específicos para obter uma



identificação mais precisa. No entanto, dentre os diversos testes foram escolhidos aqueles em que, a partir dos resultados obtidos, as culturas selecionadas no experimento poderiam ser agrupadas em porcentagem de similaridade dentro de um determinado gênero de microrganismos catalogados no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey's (COWAN et al., 1974).

Tabela 14. Características morfológicas das colônias e características morfo-tintoriais das bactérias isoladas, semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 h.

Bactéria	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia
					**			
24A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	Gram -	Bastonete
39A	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Pequena	Viscosa	Gram -	Bastonete
18E	Butirosa*, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Granulosa*	Gram +	Bastonete Esporulado

* levemente; ** pequena (< 1mm), média (> 1 e < 2mm)

Tabela 15. Características bioquímicas e motilidade das bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras* de raízes, com 24h de crescimento a 30°C, semeadas em PCA.

Bactéria	TSIA	LIA	Citrato	Nitrato	Indol	Motilidade
24A	-	+	-	+	-	-
39A	-	+	+	+	-	-
18E	b: Vermelho ba: Amarela	+	-	+	-	+

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); E, *Delonix regia* (Flamboyant);

b = Bisel; ba = Base.

Tabela 16. Atividade enzimática das bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras* de raízes, com 24h de crescimento à 30°C em PCA.

Bactéria	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Amilase	Lecitinase	Protease
24A	-	+/-	-	-	+	-
39A	-	+	-	-	-	-
18E	+	-	+	+	+	+

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Cornigo-ninguém-pode); E, *Delonix regia* (Flamboyant);

Tabela 17. Porcentagem de semelhança (de acordo com as características observadas) entre os gêneros das bactérias Gram positivas isoladas e o Bergey's Manual (1994).

Bactéria*	<i>Arthrobacter</i> (%)	<i>Bacillus</i> (%)	<i>Terrabacter</i> (%)
18E	00,0	84,2	00,0

* Amostras: E, *Delonix regia* (Flamboyant).

Tabela 18. Porcentagem de semelhança (de acordo com os testes bioquímicos realizados) entre os gêneros das bactérias Gram negativas isoladas e o Bergey's Manual (1994).

Bactéria*	<i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>
24A	61,5	93,0	70,0
39A	84,6	74,6	83,3

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Cornigo-ninguém-pode).

Para a bactéria 18E, pertencente ao gênero *Bacillus*, foram realizadas provas bioquímicas complementares descritas no Anexo I. Estas foram utilizadas para determinar a espécie que possuísse perfil bioquímico semelhante. Os resultados foram comparados com tabelas presentes no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, onde foi

estabelecida, em porcentagem, a probabilidade desta bactéria pertencer à espécie selecionada. Este resultado também foi comparado com os resultados obtidos utilizando o Sistema de identificação API 50 CHB (técnica descrita no Anexo II).

Os resultados dos testes bioquímicos mais específicos da bactéria 18E estão demonstrados na Tabela 19. De acordo com o perfil bioquímico da bactéria estudada, comparando com o perfil da espécie, foi possível estabelecer um índice em porcentagem de semelhança, onde a bactéria 18E (*Bacillus*) possui a possibilidade de 79,4% de pertencer à espécie *Bacillus cereus*, entretanto, a possibilidade de pertencer a outras espécies próximas também é alta devido aos testes executados (Tabela 20), desta forma houve a necessidade de aplicar testes mais específicos. Estes problemas são comuns, pois *Bacillus* pertencem a um taxon amplo, que contém em sua maioria bastonetes aeróbios formadores de endosporos. Em termos de proporção de bases do DNA são equivalentes a algumas famílias de bactérias (PRIEST, 1981). Além disso, algumas espécies são mal definidas, existindo espécies relatadas como complexas ou espectros no qual o limite da espécie particular é difícil ou impossível de identificar. Até mesmo em espécies bem estabelecidas há considerável variação entre linhagens. Esses esquemas de testes clássicos, usando poucos caracteres, frequentemente não permite identificação de linhagens atípicas e intermediárias, contrariando os excelentes trabalhos de Gordon (1973). Mesmo assim, há espaço para novos testes que possam melhorar a taxonomia do gênero e o estudo de novos isolados é particularmente importante (ENCINAS et al., 1995).



Tabela 19. Provas bioquímicas da bactéria 18E para identificação da espécie do gênero *Bacillus* comparadas com o Manual Bergey's de Sistemática Bacteriana (1984):

PROVAS BIOQUÍMICAS	RESULTADOS
Catalase	+
Oxidase	-
Teste Voges-Proskauer (VP)	+
PH em caldo VP:	
< 6	+
> 7	-
Produção de ácido com:	
D-Glicose	+
Sacarose	+
Maltose	+
Lactose	-
D-Manitol	-
Produção de gás com glicose	-
Hidrólise de:	
Caseína	+
Gelatina	+
Amido	+
Utilização de:	
Citrato	+
Propionato	-
Degradação da Tirosina	+
Desaminação da Fenilalanina	-
Lecitinase	+
Redução de nitrato para nitrito	+
Formação de Indol	-
Crescimento em pH:	
6.8	+
5.7	+
Crescimento em NaCl:	
2%	+
5%	+
7%	-
10%	-
Crescimento a:	
5°C	-
10°C	-
30°C	+
40°C	+
50°C	-
55°C	-
65°C	-

Tabela 20: Porcentagem de semelhança, de acordo com as características bioquímicas observadas entre as espécies do gênero *Bacillus* e o Manual Bergey de Sistemática Bacteriana (1984).

ESPÉCIES	PORCENTAGEM
<i>B. cereus</i>	79,4
<i>B. anthracis</i>	73,5
<i>B. circulans</i>	73,5
<i>B. thuringiensis</i>	73,5
<i>B. mycoides</i>	70,6
<i>B. coagulans</i>	67,6
<i>B. subtilis</i>	67,6
<i>B. alvei</i>	64,7
<i>B. laterosporus</i>	64,7
<i>B. licheniformis</i>	64,7
<i>B. firmus</i>	61,8
<i>B. pumilus</i>	61,8
<i>B. brevis</i>	58,8
<i>B. polymyxa</i>	58,8
<i>B. larvae</i>	55,9
<i>B. macerans</i>	55,9
<i>B. megaterium</i>	55,9
<i>B. pantothenicus</i>	55,9
<i>B. stearothermophilus</i>	55,9
<i>B. globisporus</i>	52,9
<i>B. alcalophilus</i>	50,0
<i>B. macquariensis</i>	50,0
<i>B. sphaericus</i>	50,0
<i>B. badius</i>	44,1
<i>B. lentus</i>	44,1
<i>B. marinus</i>	44,1
<i>B. popilliae</i>	44,1
<i>B. azotoformans</i>	41,2
<i>B. fastidiosus</i>	41,2
<i>B. lentimorbus</i>	41,2
<i>B. insolitus</i>	35,3
<i>B. schlegelii</i>	35,3
<i>B. pasteurii</i>	32,3
<i>B. acidocaldarius</i>	9,4

Além dos métodos bioquímicos clássicos, há métodos rápidos de caracterização bioquímica que requerem a utilização de inóculos padronizados. Um dos vários esquemas disponíveis para a identificação é o sistema de identificação API (Appareils et Procédes d'Identification – API System S.A., France), que consiste de pequenos compartimentos contendo substratos desidratados (Anexo II). O sistema API utilizado foi o 50 CHB, direcionado para a identificação de *Bacillus*, e apresenta sistema computacional para auxiliar a identificação. No anexo II, as figuras 34 e 35 mostram o esquema para a realização do sistema de identificação API 50 CHB e o seu gabarito para marcar resultados, respectivamente.

Após a interpretação dos resultados dos testes do sistema de identificação API 50 CHB por uma matriz computacional, obtivemos um perfil bioquímico compatível com *Bacillus cereus*, sendo que a porcentagem de identificação (%id) foi no valor de 91,9%, isto é uma estimativa de quão próximo o perfil corresponde ao conjunto de reações mais típicas para o taxon estabelecido em relação a todos os outros taxons no banco de dados. O índice de tipicidade (T) foi de 0,85, este índice fornece uma estimativa de quão próximo o perfil corresponde ao conjunto de reações mais típicas para o taxon estabelecido. Seu número varia de 0 a 1 e é inversamente proporcional ao número de testes atípicos (Figura 33).

Os resultados da interpretação do sistema API 50 CHB para o gênero *Bacillus* esta representado na Figura 33 do Anexo II, onde a porcentagem de identificação e o índice de tipicidade para *Bacillus cereus* foram considerados uma boa identificação de acordo com os padrões do fornecedor.

As galerias do sistema API 50 CHB foram utilizadas para traçar o perfil bioquímico de fermentação de carboidratos das bactérias 39A e 24A, apesar destas não pertencerem ao gênero *Bacillus*, onde após a leitura dos resultados, foram comparados com os respectivos

gêneros no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Os resultados estão demonstrados na Tabela 21, para as bactérias 39A e 24A, respectivamente. De acordo com esses resultados não foi possível estabelecer um gênero específico e houve a necessidade de aplicar novos testes, pois os resultados são controversos. Desta forma, foi necessário recorrer as técnicas de biologia molecular.



Tabela 21. Resultados da fermentação de carboidratos para as bactérias 39A e 24A.

n	CARBOIDRATOS	RESULTADOS	
		39A	24A
1	Glicerol	-	+
2	Eritritol	-	-
3	D-Arabinose	-	+
4	L-Arabinose	-	+
5	Ribose	-	+
6	D-Xilose	-	+
7	L-Xilose	-	-
8	Adonitol	-	+
9	β -Metil-xiloside	-	+
10	Galactose	-	+
11	D-Glicose	+	+
12	D-Fructose	+	+
13	D-Manose	-	+
14	L-Sorbose	-	+
15	Raminose	-	+
16	Dulcitol	-	+
17	Inositol	-	+
18	Manitol	-	+
19	Sorbitol	-	+
20	α -Metil-D-manoside	-	-
21	α -Metil-D-glicoside	-	+
22	N-Acetil-glicosamina	+	-
23	Amigdalina	-	+
24	Arbutina	+	+
25	Esculina	+	+
26	Salicina	+	+
27	Celobiose	+	+
28	Maltose	+	+
29	Lactose	-	+
30	Melibiose	-	+
31	Sacarose	-	+
32	Trealose	+	+
33	Inulina	-	-
34	Melezitose	-	-
35	D-Rafinose	-	+
36	Amido	+	-
37	Glicogênio	+	-
38	Xilitol	-	+
39	β -Gentiobiose	-	+
40	D-Turanose	?	+
41	D-Lixose	-	+
42	D-Tagatose	-	+
43	D-Fucose	-	+
44	L-Fucose	-	+
45	D-Arabitol	-	+
46	L-Arabitol	-	+
47	Gluconato	+	-
48	2 Ceto-gluconato	-	-
49	5 Ceto-gluconato	-	-

5.4.2. CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA POR MÉTODOS MOLECULARES

A utilização da seqüência ribossomal 16S para finalidades filogenéticas é explicada pelo fato destes genes serem conservados pelos bilhões de anos de divergência evolutiva. Sendo que a maioria dos procariotas apresentam três rRNA, chamados de 5S, 16S e 23S. Os segmentos 5S foram estudados extensivamente, mas normalmente são muito pequenos para assegurar uma boa conclusão filogenética. Entretanto, os segmentos 16S e 23S do RNAr são suficientemente grandes para serem usados com esta finalidade (OLSEN, 2000).

De acordo com Canhos et al. (1999), as espécies bacterianas são definidas filogeneticamente, empregando-se para tal a relação evolutiva entre seqüências de genes conservados, notadamente o RNA ribossômico 16S (RNAr 16S) e o grau de similaridade entre os genomas dos organismos (homologia de DNA:DNA).

Desta forma foi realizada a amplificação e o sequenciamento do DNA ribossomal (DNAr) 16S através da metodologia de PCR. As seqüências parciais de DNAr 16S das bactérias 18E, 39A e 24A, foram verificadas com o aplicativo "BLAST search" do Programa BioEdit, e comparadas com as seqüências depositadas na base de dados do GenBank. Após o alinhamento destas respectivas seqüências, foi criada uma seqüência consenso de cada bactéria, onde as seqüências parciais de DNAr 16S das bactérias apresentavam os seguintes tamanhos: 18E possuía 1263 pb (Figura 27); 39A possuía 888 pb (Figura 28) e a 24A possuía 1048 pb (Figura 29).

Após obter as seqüências correspondentes, estas foram alinhadas e foi feita uma árvore filogenética entre os organismos que possuíam seqüências semelhantes.

A seqüência DNAr 16S analisada indica que o isolado 39A é membro do gênero *Mesorhizobium*. A seqüência parcial de DNAr



mostrou que o isolado é um *Mesorhizobium* sp, como pode ser visualizado no dendograma gerado pelo método de Parcimônia Máxima (Figura 30)

A sequência parcial de DNAr 16S da bactéria 18E analisada indica que o isolado apresenta-se no grupo dos *Bacillus*: *B. pseudomycoides*; *B. mycoides*; *B. cereus* 1, 2 e 3; *B. anthracis* 1 e 2; *B. thuringiensis* 1 e *Bacillus* sp 1, 2 e 3. A bactéria 18E apresenta semelhança filogenética com esses microrganismos descritos e que apresentavam suas sequências parciais de DNAr 16S depositada no GenBank. Esse resultado pode ser visualizado na Figura 31.

As sequências parciais de DNAr 16S da bactéria 24A, também foram analisadas, mostrando este isolado mais relacionado a *Agrobacterium larrymoorei*; *Bradyrhizobium japonicum* 1 e 2; *Agrobacterium tumefaciens* 1, 2 e 3; *Agrobacterium* sp e *Rhizobium* sp.

A região do DNAr sequenciada foi o 16S, muito utilizada para inferir filogenia, mas no caso das bactérias trabalhadas essa região estava muito conservada, ou apresentava poucas variações não sendo possível diferenciar os gêneros em alguns casos e muito menos espécies. Seria necessário escolher outra região do DNA que não fosse muito conservada ou que pudesse apresentar maiores variações nos pares de bases e que pudesse diferenciar as bactérias e desta forma classificá-las. A região sugerida seria a dos espaços intergênicos, que possuem um maior grau de variação.



Figura 27. Sequência parcial DNAr 16S da bactéria 18E.

```

AATGGATTTAGAGCTTGCTNNTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGC
ATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCT-
GACGGAGCAACNCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTGACACTGA
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCCCCCCGTAAACGATG
AGTGCTA-
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAAA
GATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC-
TTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTC
GGATTGTAGGCTGCAA

```

Figura 28. Sequência parcial DNAr 16S da bactéria 39A.

```

TGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAACCGTAGAAGA
AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAT
TACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAA
CCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGGTAGTCTCGAGTCCGGAAGAGGTGAGTGGAATTCGAGT
GTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGCGCAAGGCGGCTCACTGGTCCG
GTAAGTACGCTGAGAAGGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTTGGCAGGTTTACCTGTCGGGTGGCGCAGCTAACGCAT
TAAGCTTCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTTGA
CATCCCGGTGCGGTTTCCAGAGATGGATTCTT-
CAGTTCGGCTGGACCCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTCAAGTTGGGCACT
CTAAGGGGACTTGCCGGTGATAAGCCNAGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGG
CCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAA

```


Figura 29. Sequência parcial DNAr 16S da bactéria 24A.

```
TGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGA
AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAA
TACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAA
CTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAATCCGAGTG
TAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATT
ACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTTCGGTGGCGCAG
CTAACGCATTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA
GCTCTTGACATTCGGGGTATGGGCATTGGAGACGATGTCCTTCAGTTAGGCTGGCCCCAGAA
CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATA
AGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGG-
CAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAA
CTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTNTACACACCGNCCGTNANACCATGGGA
```

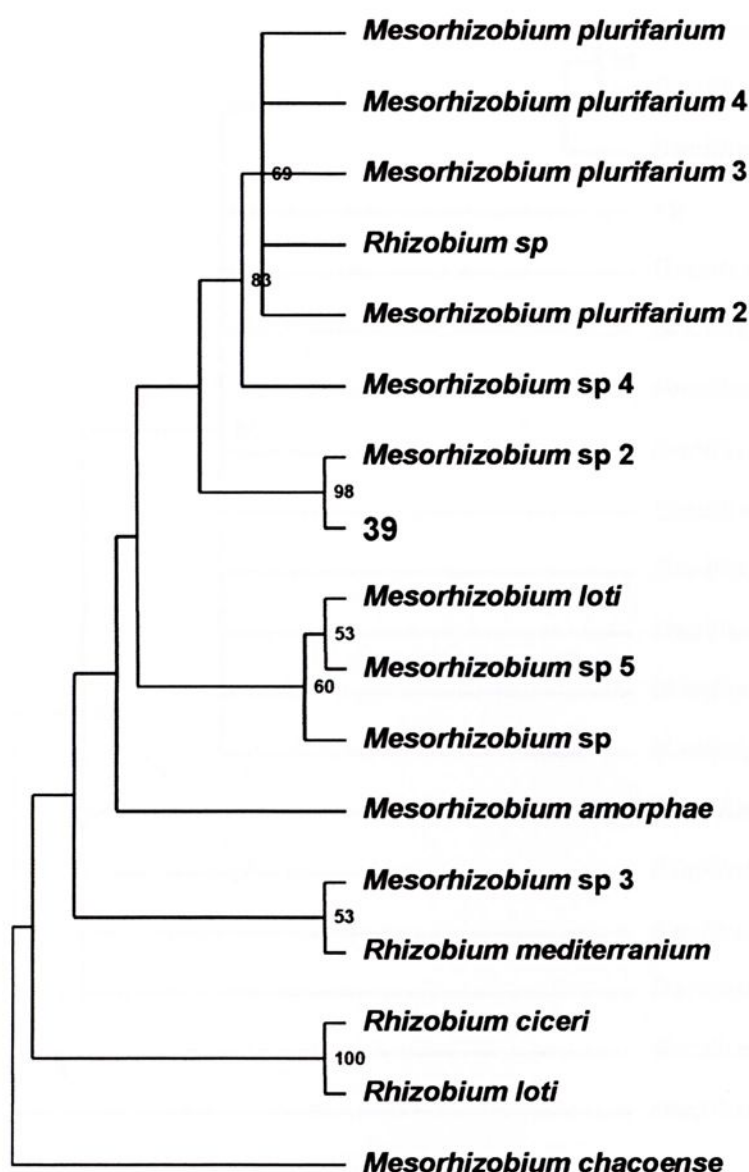


Figura 30. Árvore mais parcimoniosa resultante da análise de parcimônia de 31 caracteres informativos de 16S de 17 espécimes de *Rhizobium* ou *Mesorhizobium*. Passos = 61, CI = 0,8033, RI = 0,8554. Os números à frente dos ramos indicam o suporte de Bootstrap de 100 réplicas, cada uma com 100 buscas heurísticas, realizadas no PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000) que foram omitidos quando menores do que 50%. 39 corresponde a bactéria 39A. Os demais microrganismos tiveram suas seqüências 16S retiradas do GenBank (www3.ncbi.nlm.nih.gov) e correspondem, de cima para baixo na árvore, aos códigos de acesso: AJ 295079, Y 14161, Y 14158, X 68389, AJ 295080, AJ 295081, AF 156710, Y 14160, Z 94807, AFO 41444, AFO 41442, AF 479641, L 38825, UO 7934, U 50165, AJ 278249.

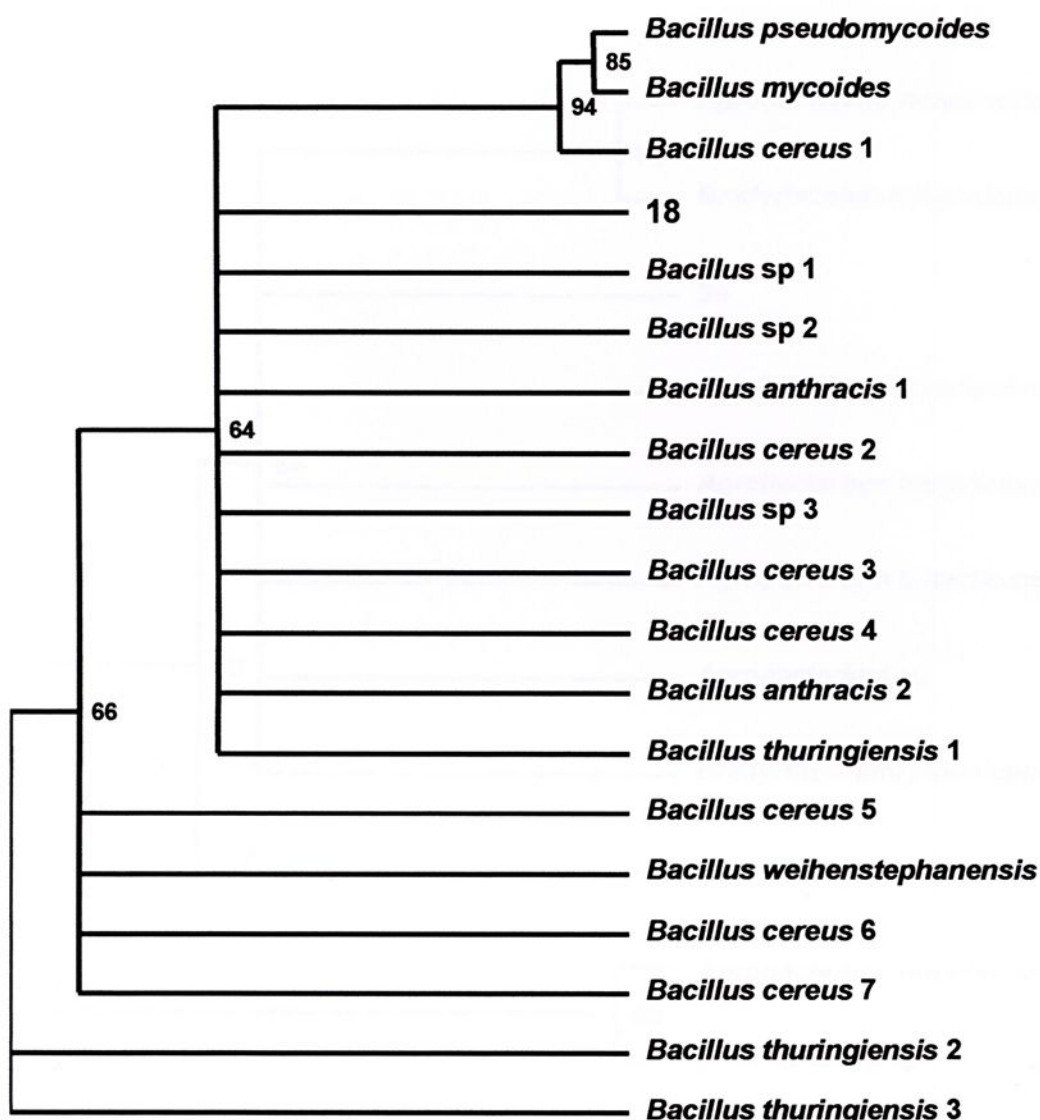


Figura 31. Árvore de consenso estrito entre as 88 árvores mais parcimoniosas resultantes da análise de parcimônia de 10 caracteres informativos de 16S de 19 espécimes de *Bacillus*. Passos = 69, CI = 0,9167, RI = 0,9412. Os números à frente dos ramos indicam o suporte de Bootstrap de 100 réplicas, cada uma com 100 buscas heurísticas, realizadas no PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000), que foram omitidos quando menores do que 50%. 18 corresponde a bactéria 18E. Os demais microrganismos tiveram suas seqüências 16S retiradas do GenBank (www3.ncbi.nlm.nih.gov) e correspondem, de cima para baixo na árvore, aos códigos de acesso: AFO 13121, AF 155957, AJ 288157, Y 15466, AF 417874, AF 390088, AF 363442, AF 290561, AF 290551, AF 206326, AF 176321, AF 155955, ABO 50630, ABO 21199, AJ 310100, AF 155952, Z 84594, Z 84585.

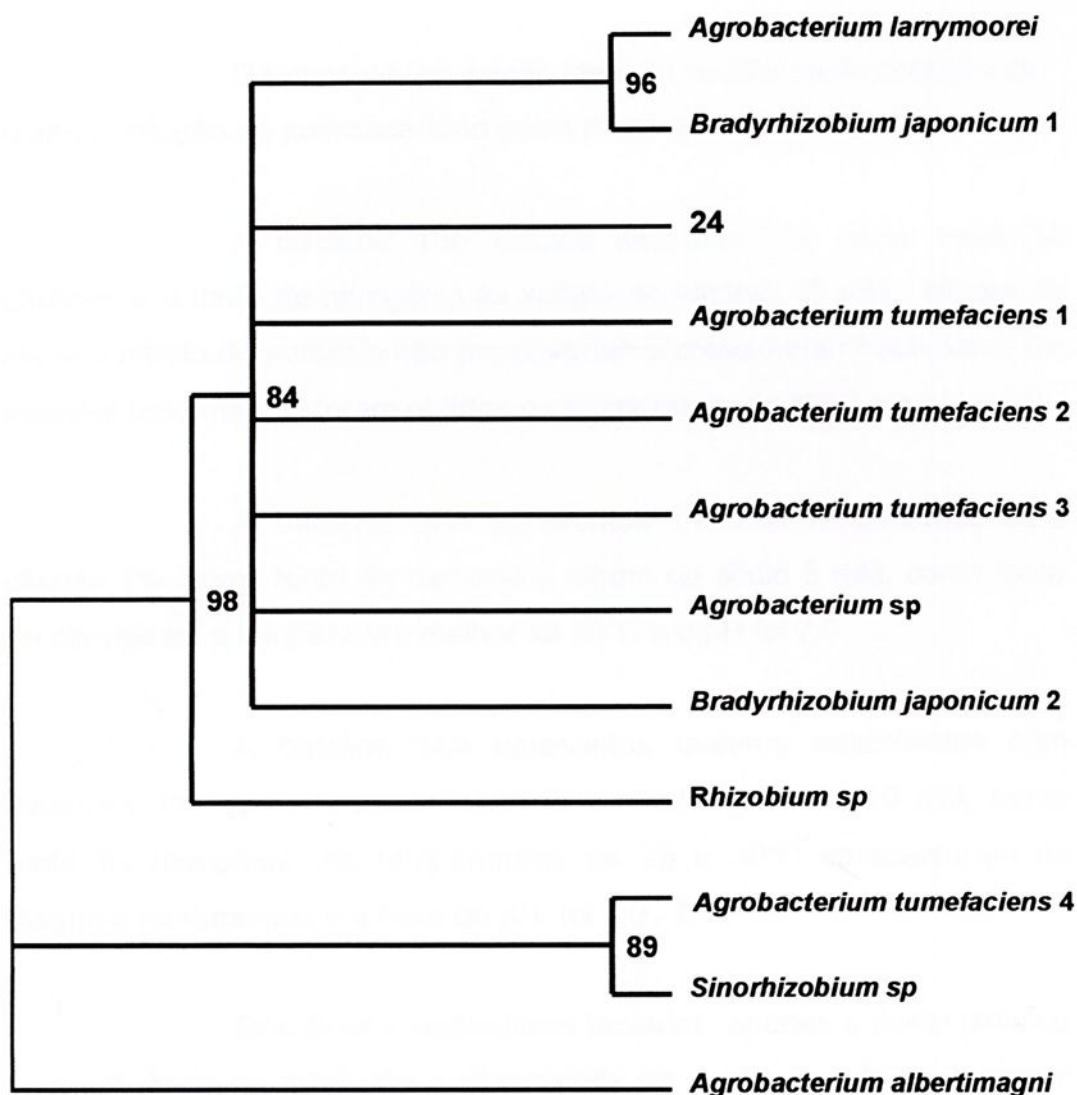


Figura 32. Árvore de consenso estrito entre as duas mais parcimoniosas resultantes da análise de parcimônia de 28 caracteres informativos de 16S de 12 espécimes de *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium*. Passos = 59, CI = 0,7561, RI = 0,7872. Os números à frente dos ramos indicam o suporte de Bootstrap de 100 réplicas, cada uma com 100 buscas heurísticas, realizadas no PAUP* 4.0b4a (Swofford, 2000) que foram omitidos quando menores do que 50%. 24 corresponde a bactéria 24A. Os demais microrganismos tiveram suas seqüências 16S retiradas do GenBank (www3.ncbi.nlm.nih.gov) e correspondem, de cima para baixo na árvore, aos códigos de acesso: Z 30542, AF 239848, AJ 389903, AJ 389902, AJ 389901, AJ 130720, AF 239847, AF 195069, 388030, AF 357225, AF 316615.

6. CONCLUSÕES

O tempo de incubação ideal foi de 96h para obtenção da maior produção de polissacarídeo pelas bactérias 18E, 39A e 24A.

A bactéria 18E utilizou sacarose 1% como fonte de carbono e a fonte de nitrogênio foi sulfato de amônio 15 mM. Nitrato de sódio e nitrato de potássio não promoveram o crescimento bacteriano. Os maiores rendimentos foram obtidos na temperatura de 35°C e o pH = 6,0.

A bactéria 39A apresentou maiores rendimentos com glicose 1%, como fonte de carbono e nitrato de sódio 5 mM, como fonte de nitrogênio; a temperatura melhor foi 30°C e o pH foi 7,0.

A bactéria 24A apresentou maiores rendimentos com sacarose 1%, como fonte de carbono e nitrato de sódio 10 mM, como fonte de nitrogênio. As temperaturas de 25 e 30°C apresentaram os mesmos rendimentos e a faixa de pH foi 7,0 - 8,0.

Dos ácidos carboxílicos testados, apenas o ácido pirúvico teve influência na produção e viscosidade do caldo de cultura. A menor concentração foi mais eficiente para todas as bactérias.

A bactéria 18E apresentou 91,9% de possibilidade de acordo com o sistema de identificação API 50 CHB e 79,4% de acordo com os testes bioquímicos clássicos do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática, de ser classificado como *Bacillus cereus*.

Os métodos de biologia molecular indicaram que a sequência DNAr 16S da bactéria 18E apresentou 64% de similaridade com as seguintes espécies do gênero *Bacillus*: *B. pseudomycoides*; *B.*



mycoides; *B. cereus* 1, 2 e 3; *B. anthracis* 1 e 2; *B. thuringiensis* 1 e *Bacillus* sp 1, 2 e 3.

A sequência DNAr 16S da bactéria 39A mostrou 98% de similaridade com *Mesorhizobium* sp2.

A bactéria 24A analisada, apresentou 84% de similaridade com as com as sequências parciais de DNAr 16S das bactérias: *Agrobacterium larrymoorei*; *Bradyrhizobium japonicum* 1 e 2; *Agrobacterium tumefaciens* 1, 2 e 3; *Agrobacterium* sp e *Rhizobium* sp.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPINAL, G. O. Classification of Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**, vol. 2. Academic Press London. 1982. cap. 1. P. 1-9.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A. & IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 145-152, 1998.

BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. R. KRIEG ed., Baltimore, USA: Williams & Wilkins. 1984. v.1. 964 p.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1994. 787.

BLANSHARD, J. M. V. Stabilisers – their structure and properties. **Journal Science Food. Agriculture**. v. 21, p. 393-399, august 1970.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n.72, p.248-254, 1976.

BRANDÃO, E.M. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira da Ciência do Solo (SBCS), Campinas, 360p, 1992.

BUISSIÈRE, J. & NARDON, P. Microméthode d'identification des bactéries. I. Intérêt de la quantification des caractères biochimiques. **Annales de le Institut Pasteur (Paris)**, v. 115, p. 218-231. 1968.

BURK, D.L., BAROVSKY, K. & MONROY, G.H. Biodiversity and Biotechnology. **Science**, v.260, p.1900, 1993.



BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M. & LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CAMPBELL, M. K. Ácidos nucléicos: de que modo a estrutura tranfere informação. In:___ **Bioquímica**, 3 ed. Editora Artes Médicas Sul Ltda. 2000. cap. 7. p. 247-273.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.; VAZOLLER, R. F. & PELLIZARI, V. H. Diversidade no domínio bactéria. In: JOLY, C. A. & BICUDO, C. E. M. (Org.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo: 1. microrganismos & vírus**. Vanderlei Perez Canhos & Rosana Filomena Vazoller – São Paulo: FAPESP, 1999. p. 1-14.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo. In:___ **Microbiologia do solo**. CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. & NEVES, M. C. P. 1992. p. 33-39.

CONTI, E.; FLAIBANI, A.; O'REGAN, M. & SUTHERLAND, W. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. **Microbiology**, v. 140, p. 125-1132, 1994.

COTTRELL, I.W.; KANG, K.S. & KOVACS, P. Xanthan gum. In: **Handbook of water-soluble gums and resins**. ed. Davidson, R., p. 24, Mc Graw Hill, New York, 1980.

COWAN, S. T.; HOLT, J. G.; LISTON, J.; MURRAY, R. G. E.; NIVEN, C. F.; RAVIN, A. W. & STAINER, R. Y. In:___ **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, 8 ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins. 1974. cap. 13. p. 1105-1127.



CRESCENZI, V. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. **Biotechnology Prog.**, n. 11, p. 251-259, 1995.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Tibtech**. v. 18, p. 26-31, 2000.

DE VUYST, L. & DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology**, v.23, n.2, p.153-177, 1999.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GÓMEZ, J.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. & OTERO, A. Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages. **Meat Science**, v. 42, n. 2, p. 127-131, 1995.

ERTESVAG, H. & VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.

ESGALHADO, E. M.; ROSEIRO, C. J. & COLLAÇO, A. M. T. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 667-671, 1994.

EVANS, C. G. T.; YEO, R. G. & ELLWOOD, D. C. Continuous culture studies on the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas juglandis*. In: **Microbial Polysaccharides and Polysaccharases**. London: Academic Press. R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday and D. C. Ellwood. 1978. cap. 2.

FARAH, S.B. DNA no diagnóstico das doenças humanas. In: **DNA – Segredos & Mistérios**, São Paulo: Editora Sarvier. 1997. Cap. 5.



FELSKE, A. Reviewing the DA001-files: a 16S rRNA chase on suspect #X99967, a *Bacillus* and Dutch underground activist. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 77-93, 1999.

FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Food additives permitted in food for human consumption: Xanthan gum. Federal Register 34(53) Part 121:5376. March 19, 1969.

GANDHI, H. P., RAY, R. M. & PATEL, R. M. Exopolymer production by *Bacillus* species. **Carbohydrate Polymer**, v. 34, p. 323-327, 1997.

GARCIA-CRUZ, C. H. Uso de hidrocolóides em alimentos: revisão. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 87, p. 19-29, agosto 2001.

GERMIDA, J. J. & SICILIANO, S. D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland, **Fems Microbiology Ecology**, v.29, Iss 3. p. 263-272, 1999.

GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in product applications. In:____ **Polysaccharides in Foods**. Ed. Blanshard, J. M. V. and Mitchell, J. R. Butterworths, London. 1979. p.185.

GLICKSMAN, M. Food applications of gums. In:____ **Food Carbohydrates**. ed. Linneback, D.R. & Inglett, G.E., AVI Publ., Westport, Connecticut, p. 270, 1982.

GONÇALVES, J. F. Unicamp estuda os microrganismos do vegetal para produzir o espessante: goma xantan brasileira sai da mandioca. **Química e Derivados**, p. 52-58, agosto/1989.



GORDON, R. E. The genus *Bacillus*. In: **Handbook of Microbiology**, v. 1. Cleveland: The Chemical Rubber Co. Press. 1973. P. 71-88.

HOFVENDAHL, K.; VANNIEL, E. W. & HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 669-672, 1999.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. & WILLIAMS, S. T. The nature of bacterial identification schemes. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. cap. 2. p. 3-5.

JANSSON, P. E.; KEENE, L. & LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Res.**, n. 45, p. 275-282, 1975.

JEANES, A.. New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, p. 34-40, may/1974.

JEANES, A.R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M.C.; SILMAN, R.W. & KNUTSON, C.A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459: Procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. **ARS-NC-51 Agriculture Research Service**, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., 1976.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T. & COTTRELL, W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.5, p.1086-1091, 1982.



KANG, K. J. & PETTITT, D. J. Biosynthesis of Extracellular Polysaccharides (Exopolysaccharides). In: **Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives**, 3. ed. Ed. Roy L. Whistler & James N. BeMiller: Academic Press. 1993. cap 3. p. 341-397.

KAWAI, H., ISOBE, Y., HORIBE, M., TOKUDA, J., TOKUNO, I. ENDO, K., & KAWAI, F. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from soil. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, n. 6, p. 853-857, 1992.

KENNEDY, A.C. & GEWIN, V.L. Soil microbial diversity: Present and future considerations. **Soil science**, v. 162, Iss 9, p. 607-617, 1997.

KNORR, D. Improving food biotechnology resources and strategies in developing countries. **Food Technology**, v.49, n.1, p.91, 1995.

KOBOLI, H. & REILLY, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroids* dextranase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 1055-1069, 1980.

KOVACS, P. & KANG, K.S. Xanthan gum. In: **Food Colloids**. Ed. Graham, H.D. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, p. 500-521, 1977.

LAPASIN, R. & PRICL, S. The polysaccharides: sources and structure. In: **Rheology of Industrial Polysaccharides. Theory and Applications**. 1.ed. Ed. Blackie Academic & Professional. 1995. cap. 1. p. 1-133.

LEACH, J.G.; LILLY, V.G.; WILSON, H.A. & PURVIS Jr, M.R.. Bacterial polysaccharides, the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. **Phytopathology**, v.47, p.113-120, 1957.



LILLY, V.G.; WILSON, H. A. & LEACH, J.G.. Bacterial polysaccharides. II. Laboratory scale production of polysaccharides by species of *Xanthomonas*. **Applied Microbiology**, v. 6, p.105-108, 1958.

LOGAN, N. A. and BERKELEY, R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API system. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1871-1882, 1984.

LOPES, L. & ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, n. 703, p. 19-23, out/dez 1995.

LOPES, L., ANDRADE, C. T. & MANO, E. B. O valor das gomas para a indústria. **Ciência Hoje**, v. 12, n. 71, p. 65-67, março/1991.

LYNCH, J. M. **Biotecnologia do Solo: Fatores microbiológicos na produtividade Agrícola**, São Paulo: Ed. Manole Ltda. 1986. 209p.

MADI, N. B.; McNEIL, B. & HARVEY, M. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 102-107, 1997.

MARGARITIS, A. & PACE, G. W. Microbial polysaccharides. In: **Comprehensive Biotechnology**. Canadá: Ed. M. Moo-Young. University of Waterloo. 1985. cap. 49. p. 1005-1044.

MARTINS, L. O.; BRITO, L. C. & SÁ-CORREIA, I. Roles of Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 12, p. 794-799, 1990.



MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analitical Biochemistry**. v.31, p. 426-428, 1959.

MORRIS, E. R. & REES, D. A. Principles of biopolymer gelation. Possible models for mucus gel structure. **British Medical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 49-53, 1978.

NAKAO, Y.; KONNO, A.; TAGUCHI, T.; TAWADA, T.; KASAI, H.; TODA, J. & TERASAKI, M. Curdlan: properties and application to foods. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 769-776, 1991.

O'DONNELL, A.G.; GOODFELLOW, M. & HAWKSWORTH D.L. Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. **Philosoph. Trans. Royal Soc. London Series B-Biological Sciences** 345:65-73. 1994.

OKABE, E.; NAKAJIMA, M.; MUROOKA, H. & NISIZAWA, K. Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, n. 1, p. 1-7, 1981.

OLSEN, G. **Molecular Phylogeny Frontier – Web Warrior-Macintosh**. Illinois: University of Illinois. 2000. Disponível em: <<http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/ClassAndPhylo/molPhylogeny.html>>. Acesso em: 21 set. 2000.

PASQUEL, A. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 86-97, jan-jun/1999.



PASSAGLIA, L.M.P. & ZAHA, A., Técnicas de DNA Recombinante. In:____ **Biologia Molecular Básica**, p. 307-331, 1996.

PELCZAR, M., REID, R. & CHAIN, E. C. S. **Microbiologia**, v. 2. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil. 1980. 1072 p.

PELCZAR, M. J. Jr., CHAIN, E. C. S. & KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e Aplicações**. v. 1 e 2, São Paulo: Makron Books. 1996. p. 524-514.

PEÑA, C.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A. & GALINDO, H. Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 390-398, 2000.

POWLEDGE, T.M. **The Polymerase Chain Reaction**. Disponível em: <<http://www.faseb.org/opa/bloodsupply/pcr.html>>. Acesso em: 01 jun. 2001.

PREZIOSO, V.R. **General Notes on Primer Design in PCR**. Disponível em: <http://www.eppendorfsi.com/PCR_appl_primer.html>. Acesso em: 01 jun. 2001.

PRIEST, F. G. DNA homology in the genus *Bacillus*. In:____ **The aerobic endospore-forming bacteria: Classification and identification**. London: Academic Press, Edited by R. C. W. Berkeley & M. Goodfellow. 1981. p. 33-57

PSZCZOLA, D. E. Gellan gum wins IFT's Food Technology Industrial Achievement award. **Food Technology**, september: 94, 1993.



RADEBOLD, K. & ESSERS, L. Zur beurteilung des API-Staph-System für die routinemäßige identifizierung von Staphylokokken. **Ärztliche Laboratorium**, v. 26, p. 236-238, 1980.

REES, D. A. Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Advances Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 267-332, 1969.

REES, D. A. Polysaccharide gels. **Chemistry and Industry**, v. 19, p. 630-636, august 1972.

REES, D. A. & WELSH, E. J. Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v. 16, p. 214-224, 1977.

RIBEIRO, S. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da tribo Attini.** 2000. 141 f. Tese (Doutorado Ciências Biológica) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro – SP. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.

ROBINSON, A.; McCARTER, Y. S. & TETREAU, J. Comparison of crystal enteric/nonfermenter system, API 20 E system and vitek automicrobic system for identification of Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 364-370, 1995.

ROSADO, A. S., DUARTE, G. F. & MENDONÇA-HAGLER, L. C. **A moderna microbiologia do solo: Aplicações de técnicas de biologia molecular**, 20p, 1999.



RUSSELL, E. W. **Soil Conditions and Plant Growth**. 10.ed. Ed. Longman. 1973. 849p.

SALE, A. J. **Fundamental Principles of Bacteriology**. 7.ed. Ed. Mc Graw Hill. 1974.

SAMAIN, E.; MILAS, M.; BOZZI, L.; DUBREUCQ, G. & RINANDO, M. Simultaneous production of two different gel-forming expolysaccharides by na *Alteromonas* strain originating from deep sea hydrothermal vents. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 235-241, 1997.

SANDERSON, G. R. Polysaccharides in Food. **Food Technology**. p. 50-57, july 1981.

SANDERSON, G. R. & CLARK, R. C. Laboratory produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. **Food Technology**, v. 37, n. 4, p. 63-70, 1983.

SANDFORD, P. A. Exocellular, microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 36, p. 265-313, 1979.

SELDIN, L. & PENIDO, E. G. C. Indentification of *Bacillus azotofixans* using API tests. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 52, p. 403-409, 1986.

SHEWAN, J. M.; HOBBS, G. & HODGKIAS, W. A determinative scheme for the identification of certain genera of bacteria with special reference to the Pseudomonadaceae. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 379-390, 1960.



SILVEIRA, I. A.; OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; CARVALHO, D. & PILON, L. Aspectos gerais positivos e negativos da utilização de marcadores PCR-RAPD na identificação de microrganismos. **Boletim SBCTA**, v. 34, n. 2, jul.-dez. 2000, p. 77-83.

SMILES, D. E. Aspects of the physical environment of soils organisms. **Biol. Fertil. Soil**, v.6, p.204-215, 1988.

SOUW, P. & DEMAINE, A. L.. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Appl. Environm. Microbiology**, v.37, n.6, 1186, 1979.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbiology and Physiology**, v. 8, p. 143-213, 1972.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of Extracellular Polysaccharides (Exopolysaccharides). In:___**Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives**, 3. ed. Ed. Roy L. Whistler & James N. BeMiller, Academic Press. 1993. cap. 4. p. 69-85.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12, p. 393-448, 1994.

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides – structural subtleties and their consequences. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 9, p. 1911-1917, 1997.

TRIVENI, R.; SHAMALA, T. R. & RASTOGI, N. K. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 787-795, 2001.

VALLA, S.; LI, J. P.; ERTESVAG, H.; BARBEYRON, T. & LINDAHL, U. Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. **Biochemistry**, v. 83, p. 819-830, 2001.

VANDAMME, E. J.; BRUGGEMAN, G.; DE BAETS, S. & VANHOOREN, P. T. Useful polymers of microbial origin. **Agro-Food-Industry-hi-tech**, n.7, v. 5, p. 21-25, 1996.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M. & KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for na exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 6, p. 599-602, 1995.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polymer**, n. 33, p. 139-144, 1997.

ZHANG, J. & GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 407-421, 1999.

WHISTLER, R. L. Introduction to industrial gums. In: **Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives**, 3. ed. Ed. Roy L. Whistler and James N. BeMiller, Academic Press. 1993. cap. 1. p. 1-52.

WONG, T. Y. Effects of calcium on sugar transport in *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 89-92, 1993.



8. ABSTRACT

FARIA, L. H. G. B. Taxonomic characterization and polysaccharides production using isolated bacteria of soil samples. 2002. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Campus de São José do Rio Preto–SP. Brasil.

The gums hydrosoluble or hydrocolloids are polysaccharides of vegetable, animal, marine or microbial origin. The largest problem of the use of extracted hydrocolloids of natural sources is the shortage and the possibility of exhaustion of the same ones. With the progress of the technology, the use of these it has increased a lot and with that its natural sources are more and more explored, being verified the need of seek alternative sources of production, in a way of rationalize its use. In that sense, the bacteria represent a great alternative of producing source. Three producing bacterial cultures of polysaccharides were selected and were determined its nutritional characteristics and incubation time for a optimal production. Specific biochemical tests were also accomplished for its identification. During the polysaccharides production the cultures were incubated in a medium base containing a carbon source (glucose or sucrose), a nitrogen source (NaNO_3 , KNO_3 or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and mineral salts. The cultures were incubated in a "shaker" rotating to 200 rpm, 30°C for 96 h. There after, the cells were separate for centrifugation to 12000 rpm for 30 minutes and dried until constant weight. The supernatant was precipitated with a mixture of alcohol-acetone (3:1 v/v) and dried until constant weight. The carbon source selected for the bacteria 18E was the 1% sucrose; the nitrogen source was a 15 mM ammonium sulfate, and sodium nitrate and potassium nitrate were not suitable due to the absence of bacterial growth; the selected temperature was 35°C and the pH was 6,0; in agreement with the largest obtained yields. The bacteria 39A

presented larger yields with 1% glucose as carbon source and 5 mM sodium nitrate as nitrogen source; the optimum temperature was 30°C and the pH was 7,0. The bacteria 24A presented larger yields with 1% sucrose, as carbon source and 10 mM sodium nitrate as nitrogen source. The temperature of 25°C and 30°C presented the same yields and the pH range selected was 7,0-8,0. The morphologic and biochemical characteristics of the microorganism polysaccharides producing were determined for its properly identification. The bacterium 18E presents 91,9% of possibility in agreement with the identification system API 50 CHB it can be classified as *Bacillus cereus*. Molecular Biology Techniques of the bacteria 18E indicates that the isolated microorganism presents 64% of similarity with the following species of the genera *Bacillus*: *B. pseudomycoides*; *B. mycoides*; *B. cereus* 1, 2 and 3; *B. anthracis* 1 and 2; *B. thuringienis* 1 and *Bacillus* sp 1, 2 and 3. The bacterial 39A of similarity with *Mesorhizobium* sp 2. While the bacteria 24A analyzed, presents 84% of similarity with the partial sequences of the following bacteria: *Agrobacterium larrymoorei*; *Bradyrhizobium japonicum* 1 and 2; *Agrobacterium tumefaciens* 1, 2 and 3; *Agrobacterium* sp and *Rhizobium* sp.

Key words: polysaccharide, optimization, fermentative process, bacteria taxonomy, PCR.



ANEXO I



I. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

1. Testes bioquímicos

1.1. Reação de Voges-Proskauer

Através da fermentação butilienoglicol, realizada por algumas bactérias, a descarboxilação do ácido pirúvico leva a formação de acetoína, um produto neutro. Em pH alcalino e em presença de ar, a acetoína é oxidada a diacetil metilcarbinol, que reage com a creatina da peptona do meio de cultura e forma um composto róseo.

Inocular em tubos contendo caldo Voges-Proskauer (VP) em triplicata, e verificar a produção de acetil-metil carbinol após 3, 5 e 7 dias; misturando 3 mL de hidróxido de sódio 40% (p/v) com a cultura e acrescentar solução de alfa naftol 5% (em álcool absoluto). Observar a produção de coloração vermelha após 30-60 minutos a temperatura ambiente indica prova positiva.

1.2 Verificação de pH em caldo Voges-Proskauer

Após 7 dias de incubação no caldo VP, o pH é medido utilizando um potenciômetro e expressando o resultado em valores <6 e >7 . Para esta prova é utilizado o mesmo meio da prova anterior sem a adição dos reagentes.

1.3. Crescimento em pH 5,7 e 6,8

Inocular em ágar Sabouraud inclinado e caldo Sabouraud com pH 5,7; e em caldo nutriente pH 6,8, com uma alçada de cultura crescida em caldo nutriente. Verificar o crescimento em todos os tubos por mais de 2 semanas de incubação.



1.4. Crescimento em cloreto de sódio

Esta prova é utilizada para verificar a capacidade de crescimento em concentrações crescentes de sal.

Inocular em tubos contendo 3 mL de caldo nutriente acrescido de 2, 5, 7 e 10% (p/v) de cloreto de sódio com alçadas de cultura crescida em caldo nutriente e incubar em posição inclinada para melhorar a aeração.

Observar o crescimento nas várias concentrações de cloreto de sódio após 7 e 14 dias de incubação.

1.5. Crescimento em temperaturas máximas e mínimas

Prova utilizada para verificar a habilidade de crescimento em intervalos de 5°C. Inocular em ágar nutriente inclinado e incubar na temperatura apropriada.

O resultado positivo é dado através do crescimento das culturas:

- depois de 3 dias a temperatura de 55°C;
- depois de 5 dias a 30-50°C;
- depois de 14 dias de 20-25°C;
- depois de 21 dias a temperatura abaixo de 20°C.

1.6. Redução de Nitratos

Este teste é utilizado para determinar a habilidade de um organismo em reduzir nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) ou ao gás nitrogênio (N_2). Estas reações ocorrem normalmente sob condições anaeróbicas, onde o organismo obtém o seu oxigênio do nitrato. Todas as enterobactérias, exceto certos biótipos de *Enterobacter agglomerans* e *Erwinia* reduzem nitratos.

Inocular a cultura no meio de nitrato com uma alça carregada de cultura do organismo isolado. Incubar em temperatura



adequada. Após o crescimento, acrescentar ao tubo com a cultura 10 gotas de uma mistura (v/v) dos reagentes para a reação (A e B, anexo II). Agitar suavemente.

O aparecimento de um halo róseo, dentro de 1 minuto, equivale a um teste positivo. O resultado negativo é representado pela ausência de coloração, o que indica que os nitratos não foram reduzidos ou foram reduzidos a produtos diferentes dos nitritos, como amônia, nitrogênio ou óxido nitroso. Visto que os reativos detectam somente nitritos é necessário utilizar o teste da redução do zinco, que consiste em: acrescentar ao tubo, já contendo os reagentes A e B uma pitada de zinco. Agitar levemente e fazer a leitura entre 5 a 10 minutos. O aparecimento da cor rósea indica a presença de nitratos residuais e confirma a reação negativa verdadeira. Para controle da reação é utilizada *Escherichia coli* como controle positivo e como controle negativo *Acinetobacter calcoaceticus*.

1.7. Prova do Indol

O Indol, um benzil pirrol, é um dos produtos metabólicos de degradação do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptofano com a produção de indol, ácido pirúvico e amônia. A prova do indol está baseada na formação da cor vermelha quando o indol reage com o dimetilaminobenzaldeído (Kovac's). Inocular a cultura em caldo triptofano e incubar à temperatura adequada. Colocar de 3 a 5 gotas do reagente de Kovac's por tubo e observar imediatamente se há ou não o aparecimento da cor vermelho-violeta.

O desenvolvimento da cor vermelha na superfície de contato indica a presença de indol e a prova positiva. Os microrganismos usados como controle são: *Escherichia coli* (controle positivo) e *Klebsiella sp* (controle negativo).



1.8. Utilização do Citrato

O citrato de sódio é um sal de ácido cítrico, um composto orgânico simples que constitui um dos metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, muitos organismos são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Um organismo que é capaz de realizar esta reação, também utiliza sais de amônia como única fonte de nitrogênio, que são degradados em amônia. Esta amônia alcaliniza o meio, o que é evidenciado pela cor azul.

Semear em uma única estria na superfície do tubo de ágar citrato e incubar à temperatura adequada por 24 horas.

A prova positiva é representada pelo desenvolvimento de cor azul escuro entre 24 e 48 horas, indicando que o organismo teste foi capaz de utilizar o citrato contido no meio, com a formação de produtos alcalinos. A prova também é positiva na ausência da cor azul se houver crescimento visível de colônias ao longo da estria de inoculação. Essa interpretação pode ser confirmada incubando-se o tubo por 24 horas adicionais, quando geralmente desenvolve-se a cor azul. Para controle da reação é utilizado *Enterobacter aerogenes* como controle positivo e *Escherichia coli* como controle negativo.

1.9. Utilização de Propionato

Apresenta o mesmo procedimento de execução e análise dos resultados da prova bioquímica de utilização de citrato, mas o sal utilizado é o propionato.

1.10. Produção de ácido

Prova utilizada para verificar a produção de ácido através da utilização de carboidratos.

Inocular em caldo contendo diferentes açúcares a serem testados, tubo de Durham e indicador de pH.

Observar o crescimento e a produção de ácido e gás,



evidenciado pela mudança de cor do indicador e a retenção de bolhas no tubo, por um período de 7 a 14 dias.

1.11. Desaminação da Fenilalanina

A fenilalanina quando utilizada pelo microrganismo é convertida em ácido fenilpirúvido, podendo assim ser evidenciado pelo cloreto férrico.

Incubar as culturas em duplicata no ágar fenilalanina inclinado, por 7 dias, então acrescentar 5 gotas de cloreto férrico 10% sobre o crescimento de uma das duplicatas.

O resultado positivo será evidenciado pelo aparecimento de uma coloração verde embaixo do crescimento do microrganismo. Em testes negativos, repetir a segunda cultura após 21 dias de incubação.

1.12. Decomposição da Tirosina

Inocular em duplicata placas com ágar tirosina com um traço do inóculo e incubar a temperatura adequada para o microrganismo. Examinar após 7 dias o aparecimento de um halo claro ao redor do crescimento é considerado positivo. Resultados negativos realizar novo exame em 14 dias.

2. Estudo de produção de exoenzimas:

2.1. Hidrólise de amido

Princípio: O amido pode ser hidrolizado por muitos microrganismos devido à ação de exoenzimas hidrolíticas denominadas amilases. A molécula de amido é clivada formando dissacarídeos como a maltose. A detecção da hidrólise do amido é feita com o reagente lugol que dá uma coloração azul na presença de amido.



Procedimento: Dividir a placa e inocular por picada cada cultura para o teste. Incubar na temperatura de crescimento.

Interpretação: Observar após o crescimento, zonas claras ao redor da picada. Adicionar o reagente de lugol. O teste é positivo quando são formadas zonas claras ao redor da picada. O *Bacillus megaterium* é utilizado como controle positivo e como controle negativo - zonas azuis ao redor da picada – utiliza-se *Bacillus sphaericus*.

2.2. Hidrólise de caseína

Princípio: A caseína pode ser hidrolizada pelas proteases dos microrganismos. O método depende da incubação do microrganismo sobre a superfície da placa com o meio de caseína 1%, ou skim milk 1%.

Procedimento: Dividir a placa e inocular por picada cada cultura para o teste. Incubar à temperatura de crescimento.

Interpretação: Organismos capazes de hidrolisar caseína produzem zonas claras ao redor do crescimento. Os organismos que não são capazes de hidrolisar a caseína podem não apresentar crescimento. Como controle positivo é utilizada a bactéria *Bacillus megaterium* e como controle negativo *Bacillus macerans*.

2.3. Hidrólise de gelatina

A gelatina é um complexo derivado do colágeno animal e gelifica em torno de 28 a 30°C. A gelatina pode ser liquefeita pelas enzimas proteolíticas extracelulares.

Princípio: As gelatinases são enzimas proteolíticas capazes de hidrolizar a gelatina, destruindo sua capacidade para formar gel. As bactérias que produzem gelatinase podem ser detectadas observando-se a liquefação de meios de cultura ou substratos que contenham gelatina, após a inoculação do organismo em estudo e incubação durante período adequado.



Procedimento: Inocular as culturas no meio de gelatinase ou em placas de ágar gelatinase, e incubar na temperatura de 22° ou 37°C. Após a incubação por 24 horas, deixar na geladeira por algumas horas. A liquefação do meio corresponde à uma prova positiva. Em caso de endurecimento do meio, voltar para incubadora e deixar durante 7 dias. Repetir a operação diariamente

Interpretação: A presença de enzimas proteolíticas liquefarão a gelatina, e o meio ficará liquefeito, após colocar o tubo teste sob refrigeração. Para controle da reação é utilizado como controle positivo *Bacillus megaterium* e como controle negativo - *Pseudomonas putida*.

2.4. Lecitinase

Princípio: Este teste mostra a presença da enzima lecitinase e a fermentação do manitol.

Procedimento: inocular a cultura na placa por estriamento ou picada e incubar a temperatura adequada.

Interpretação: A presença de colônias amarelas significa a fermentação do manitol. A lecitina presente na gema de ovo é degradada em produtos insolúveis que se acumulam como um precipitado farinhoso ao redor das colônias (Lecitinase positiva). Para controle da reação é utilizado como controle positivo *Bacillus cereus*.

2.5. Citocromo oxidase

Os Citocromos são hemoproteínas que contêm ferro e funcionam como última ligação da cadeia respiratória aeróbia transferindo 2 elétrons (hidrogênio) para o oxigênio com a formação de água, através de uma série de etapas onde a energia liberada é armazenada na célula sob forma de ATP.

O sistema citocromo oxidase é encontrado em organismos dos grupos aeróbio, microaerófilos e anaeróbio facultativo. O



teste é diferencial e muito útil em estudos preliminares de linhagens suspeitas de pertencer ao grupo das enterobactérias (todas negativas) e de outros grupos como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* e *Pasteurella* (positivas).

Princípio: A oxidase utiliza reagentes como o dicloridrato de p-fenilenodiamina, que atuam como aceptores artificiais de elétrons substituindo o oxigênio. Esse reagente é incolor no estado reduzido, mas na presença de citocromo oxidase e oxigênio atmosférico se oxida formando o azul de indofenol.

Procedimento:

1. Técnica direta em placa: adicionam-se diretamente 2 a 3 gotas de reativo às colônias bacterianas que cresceram em placas.

2. Técnica indireta em tiras de papel, na qual adicionam-se algumas gotas do reativo em uma tira de papel filtro e faz-se um esfregaço da cultura. Há discos e tiras de oxidase comerciais impregnadas com os reativos.

Interpretação: As culturas bacterianas que possuem atividade citocromo oxidase desenvolvem em 10 segundos uma cor azul no local de inoculação. Para controle da reação é utilizada *Pseudomonas aeruginosa* como controle positivo e como controle negativo *Escherichia coli*.

2.6. Catalase

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Excluindo os estreptococos a maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias decompõe o H_2O_2 através de peroxidases semelhantes à catalase.

Princípio: O peróxido de hidrogênio forma-se como um dos produtos finais do metabolismo oxidativo ou aeróbio dos carboidratos. Se deixado acumular, é letal para as células bacterianas. A presença da enzima pode ser detectada pela adição de H_2O_2 a 3% sobre a cultura.



Procedimento:

Método em tubo: Com a alça, transferir o inóculo de uma cultura de 24 horas para os tubos contendo 1mL de água destilada. Adicionar de 3 a 5 gotas de água oxigenada a 3%.

Prova de lâmina: Com uma agulha de inoculação ou alça, transferir células do centro de uma colônia isolada para a superfície de uma lâmina de vidro. Adicionar de 3 a 5 gotas de água oxigenada a 3%. Recomenda-se que o organismo não seja adicionado ao reativo, especialmente, se forem utilizadas alças de inoculação que contenham ferro, porque podem produzir reações falso-positivas.

Interpretação: Observar a formação de bolhas de gás oxigênio. A reação é quase que imediata. Algumas bactérias lácticas podem apresentar pseudo catalase, isto ocorre quando crescem em meio contendo baixa concentração de glicose. Para evitar a pseudo catalase, adiciona-se 1% de glicose ao meio. Uma outra alternativa é semear a bactéria numa placa e adicionar 1 gota de água oxigenada 3% sobre as colônias. Para controle da reação é utilizado *Bacillus subtilis* como controle positivo e como controle negativo *Streptococcus sp.*

3. Técnicas de coloração

3.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é utilizada para identificar os microrganismos Gram positivos dos Gram negativos. Também é possível verificar a pureza da colônia estudada. Durante a realização desta técnica deve-se usar culturas com até 24 horas, as quais são submetidas aos seguintes reagentes: cristal violeta, lugol, álcool e safranina. As células que se corarem de roxo são Gram positivas e as que se corarem de rosa são Gram negativas.



3.2. Coloração de esporos

Alguns grupos de microrganismos têm a habilidade de formar endosporos nas células. Os esporos são estruturas de resistência. Culturas velhas são submetidas aos seguintes reagentes: verde de malaquita e safranina, os esporos se colorem de verde e as células vegetativas de rosa.

ANEXO II



ANEXO I I

SISTEMA API

(Analytical Profile Index / Biolab-Mérieux)

O sistema de identificação API 50 CH possui 49 galerias que permite realizar o estudo do metabolismo de hidratos de carbono utilizados pelos microrganismos (Tabela 22). O primeiro tubo sem princípio ativo serve como controle negativo. Os tubos seguintes contém uma quantidade definida de substrato desidratado, pertencente a família dos hidratos de carbono e seus derivados (heterosídeos, poliálcoois e ácidos urônicos). Esses substratos podem ser metabolizados por diferentes vias:

- Assimilação: ocorre o crescimento do microrganismo na cúpula quando o substrato é utilizado como única fonte de carbono presente;

- Oxidação: ocorre a mudança de coloração na cúpula, devido a uma produção de ácido em aerobiose, revelada pelo indicador de pH do meio de cultura;

- Fermentação: ocorre a mudança de coloração na cúpula, devido a uma produção de ácido em anaerobiose, revelada pelo indicador de pH do meio de cultura.

A galeria API 50 CH só pode ser utilizada para estudar uma das três vias. O meio de cultura empregado é escolhido de acordo com o metabolismo a estudar e as exigências do grupo bacteriano correspondente.

O meio API 50 CHB (Tabela 23) é indicado para a identificação do gênero *Bacillus* e permite realizar o estudo de fermentação de 49 açúcares da galeria API 50 CH. O microrganismo é colocado em uma suspensão no meio (API 50 CHB) e depois inocula-se em cada tubo da galeria (API 50 CH). Durante a incubação, o catabolismo dos açúcares produz ácidos orgânicos que mudam a coloração do



indicador de pH. Os resultados obtidos constituem o perfil bioquímico da linhagem e serve para sua identificação e biotipagem.

Normalmente os resultados obtidos são suficientes para identificar as bactérias.

A preparação da tira ou galeria, do inóculo e a inoculação da tira seguiram as recomendações do fabricante.

Nas tabelas de identificação das galerias API foram fornecidas porcentagens de identificação que dizem respeito a capacidade de fermentação dos açúcares e derivados, por um determinado microrganismo, isto é, para cada teste existe uma análise percentual compreendida entre 0% e 100%.

As identificações para o gênero *Bacillus* foram realizadas utilizando-se o serviço de banco de dados da fornecedora. Os perfis foram listados juntamente com a informação dos valores dos índices de percentagem de identificação e de tipicidade.

A percentagem de identificação (%id) representa uma estimativa de quão próximo o perfil obtido está do taxon em relação a todos os outros taxons na base de dados.

O índice T representa uma estimativa de quão próximo o perfil corresponde a maioria do grupo de reações típicas para cada taxon. Seu valor varia entre 0 e 1 sendo inversamente proporcional ao número de testes atípicos.

Comparando o perfil obtido com os perfis da tabela, é considerada a espécie mais provável e correspondente ao menor número de testes discordantes.



Tabela 22. Composição das tiras ou galerias do API 50 CH

API 50 CH				
Tira 1	Tira 2	Tira 3	Tira 4	Tira 5
Tubo/substrato	Tubo/substrato	Tubo/substrato	Tubo/substrato	Tubo/substrato
0 controle negativo	10 GALactose	20 α -Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 α -Methyl-D-Glucoside	31 Sucrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acethyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARABinose	13 MaNNose	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D FUCose
4 L ARABinose	14 SorBose	24 ARButin	34 MeLeZitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RAFfinose	45 D ARabitol
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicin	36 Starch	46 L ARabitol
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcoGen	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitrol	28 MALtose	38 XyLiToI	48 2-Keto-Gluconate
9 β -Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENtiobiase	49 5-Keto-Gluconate

Tabela 23. Composição do meio API 50 CHB

Sulfato de amônio	2,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Triptona	1,0 g
Vermelho fenol	0,18 g
Base Mineral (Cohen-Bazire)	10 mL
Tampão fosfato pH 7,8	1000 mL



Reference : Luisa

Date : 01/08/2001

EXCELLENT IDENTIFICATION TO THE GENUS

Strip : API 50 CHB

V3.0

Read on: 01/08/2001

Profile : -+---+--- -+----- -+-----+--- -+---+--- ?-----+---

0 - GLY + ERY - DARA- LARA- RIB + DXYL- LXYL- ADO - MDX - GAL -
 GLU + FRU + MNE - SBE - RHA - DUL - INO - MAN - SOR - MDM - MDG -
 NAG + AMY - ARB + ESC + SAL + CEL + MAL + LAC - MEL - SAC - TRE +
 INU - MLZ - RAF - AMD + GLYG+ XLT - GEN - TUR ? LYX - TAG - DFUC-
 LFUC- DARL- LARL- GNT + 2KG - 5KG -

----- Significant taxa ----- % Id. --- T -- Tests against -----

Bacillus cereus	1	91.9	0.85	0
Bacillus mycoides		6.1	0.74	2
Bacillus anthracis		1.8	0.66	2

Next choice

Brevi.laterosporus	0.1	0.38	3
--------------------	-----	------	---

POSSIBILITY OF *Bacillus thuringiensis*
 IMPORTANT ! "PRESUMPTIVE IDENTIFICATION"

Bacillus cereus 1 : 0 test(s) against

Bacillus mycoides : 2 test(s) against

GLYCEROL	(GLY)	15 %	GLUCONATE	(GNT)	14 %
----------	--------	------	-----------	--------	------

Bacillus anthracis : 2 test(s) against

SACCHAROSE	(SAC)	99 %	GLUCONATE	(GNT)	24 %
------------	--------	------	-----------	--------	------

Next choice

Brevi.laterosporus : 3 test(s) against

HYDROLYSE AMIDON	(AMD)	12 %	GLYCOGENE	(GLYG)	12 %
GLUCONATE	(GNT)	0 %			

COMPLEMENTARY TESTS :

		ADH
Bacillus anthracis	:	2 %
Bacillus cereus	:	63 %
Bacillus mycoides	:	62 %

Figura 33. Resultado da identificação da bactéria 18E (*Bacillus*) através da matriz computacional do sistema de identificação API 50 CHB.

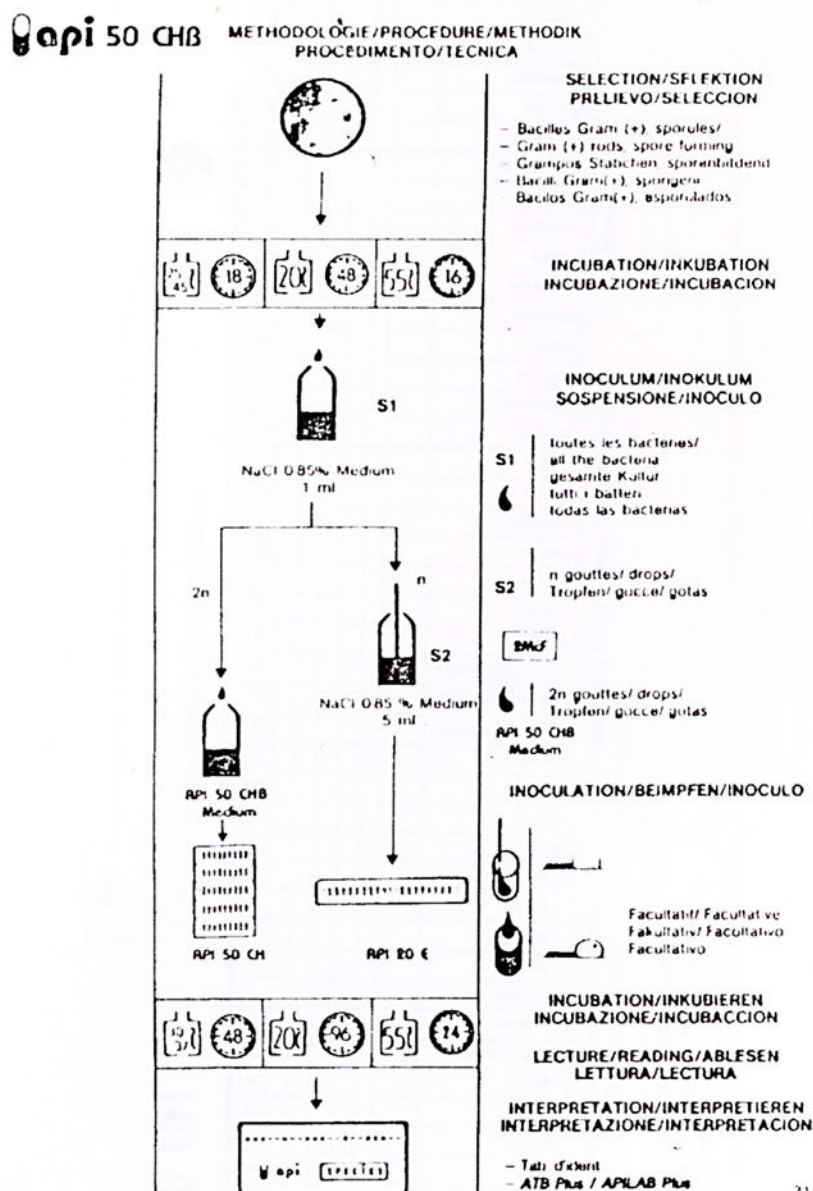


Figura 34. Esquema para a realização do sistema de identificação API 50 CHB.

ANEXO III

TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

1. PROTOCOLO I

1.1. EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando soluções Genomic PrepTM Cells and Tissue DNA isolation (Amersham Pharmacia Biotech). As etapas seguidas foram:

1.1.1. Lise

1. Raspar cerca de 10-20 mg da cultura com crescimento de 24 h em placa;
2. Colocar a solução de Cell Lysis Solution no gelo durante 5 minutos;
3. Colocar o material dentro do tubo Eppendorf contendo 100 μ L da solução de lise e macerá-lo, com cuidado, mantendo o Eppendorf no gelo, com uma ponteira com a ponta previamente fechada na chama;
4. Adicionar 3 μ L de proteinase K (20 mg/mL) e incubar por 3 horas a 55 °C.

1.1.2. Precipitação de proteínas

1. Deixar a amostra voltar à temperatura ambiente e adicionar 180 μ L de Protein Precipitation Solution;
2. Agitar no Vortex por 20 segundos em alta velocidade;
3. Centrifugar a 15000g por 10 minutos.



1.1.3. Precipitação de DNA

1. Colocar 600 μ L de isopropanol 100% em um novo tubo de Eppendorf;
2. Cuidadosamente transferir o sobrenadante com DNA (obtido no item anterior) para este tubo de Eppendorf. Descartar o Eppendorf com o pellet de proteína;
3. Inverter suavemente 50 vezes o tubo Eppendorf;
4. Centrifugar a 15000g por 10 minutos;
5. Descartar o sobrenadante com auxílio de pipeta automática de 200 μ L;
6. Inverter o Eppendorf sobre papel absorvente;
7. Adicionar 600 μ l de etanol 70%. Inverter 30 vezes o Eppendorf.
8. Centrifugar a 15000g por 10 minutos;
9. Cuidadosamente descartar o etanol sem deslocar o pellet de DNA. Inverter o tubo sobre papel absorvente para secar;
10. Deixar em temperatura ambiente até que o tubo seque completamente, por no mínimo 1 hora.

1.1.4. Hidratação do DNA

1. Adicionar de 30 a 40 μ L de DNA Hydration Solution (tampão TE) ao pellet de DNA.
2. Guardar a 2-8 $^{\circ}$ C. Nestas condições, o DNA permanece inalterado por mais de um ano.



2. PROTOCOLO II

2.1. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Este procedimento é realizado sempre entre as reações de extração, amplificação, purificação e sequenciamento, para verificar, frente a um padrão de DNA, a concentração e integridade do DNA.

Procedimentos:

1. Pese a agarose, conforme a concentração desejada para o gel (0,8%, 1%, 1,2%, etc).

2. Coloque a agarose em um frasco de 125 mL (mini gel) ou frasco de 250 mL (gel grande). Acrescente a quantidade apropriada de TBE 1x. Se disponível apenas TBE 10X, diluir para 1x.

3. Dissolver a agarose em forno de microondas. Use potência baixa (2, por exemplo) e deixe o tempo necessário para que toda a agarose seja dissolvida. Cuidado para não derramar a mistura durante a fervura. Para volumes de 25 mL, programar o forno para 4 minutos e 30 segundos, em potência 2. Lembre-se que conforme o equipamento, este tempo e a potência podem requerer alterações.

4. Deixe o gel esfriar até cerca de 45 a 50°C.

5. Prepare o aparelho e a cuba de eletroforese, selando as extremidades da base do gel, com as cunhas metálicas e coloque o pente escolhido.

6. Adicione a quantidade apropriada de brometo de etídio (EtBr) à agarose. Se estiver preparando 25 mL de gel, adicione 0,5 μ L de EtBr a 10mg/ml. Caso tenha outra concentração de EtBr, recalcule a quantidade necessária. Divida-o em pequenas alíquotas para facilitar o manuseio, pois o EtBr é mutagênico e tóxico. Proteja os tubos da luz, envolvendo-os em folha de alumínio, para evitar degradação.



7. Derrame o gel na base, com cuidado para não formar bolhas e verifique se o pente não se deslocou. Caso sejam formadas bolhas, use rapidamente um palito de dentes estéril para rompê-las.

8. Carregue o gel, misturando 2 μ L de Loading Dye 5x em um volume de 2 a 3 μ L de DNA ressuspenso em TE (ou água), para cada amostra.

9. Use uma das colunas do gel para carregar com um DNA Ladder apropriado (1kb, 123pb, 50pb, etc). Em geral, 0,8 μ L de Ladder dissolvido na mesma proporção de Loading Dye garantem boa qualidade ao Ladder.

10. Conecte os eletrodos nos terminais da cuba e da fonte de eletroforese, de forma que o DNA se desloque do positivo (+ vermelho) para o negativo (- preto). Selecione a voltagem, a mA e o tempo da corrida na fonte de eletroforese.

Minigel: 75 a 100V, 35 a 50mA e 40 a 30 minutos.

Gel grande: 100 a 125V, 50 a 75mA e de 2h a 1h30m.



3. PROTOCOLO III

3.1. AMPLIFICAÇÃO DE DNAr 16S

Para a reação de amplificação foi adicionado em tubo Eppendorf de 0,2 mL do Kit Ready-to-Go™ PCR (Amersham Pharmacia Biotech n. 27-9553-01):

1. DNA template – 200 - 500 nanogramas
2. Primers – 12 - 15 picomoles de cada
3. Água MilliQ autoclavada – qsp 25 microlitros
4. Homogeneizar em vortex em velocidade baixa
5. Centrifugar 1 min 4000 x g

Um termo ciclador MJ – PTC 200 foi utilizado para as bactérias 18E, 39A e 24A, com diferentes programas. Para a bactéria 18E foi utilizado a seguinte programação: 1. 95°C – 1 min; 2. 92°C – 1 min; 3. 45°C – 1 min; 4. 70°C – 1 min; Repetir 34 vezes os passos de 2 a 4; 5. 70°C – 15 min; 4° C – final. Para as bactérias 39A e 24A foi utilizada outra programação: 1. 95°C – 5 min; 2. 95°C – 30 seg; 3. 50°C – 30 seg; 4. 72°C – 15 min; Repetir 34 vezes os passos de 2 a 4; 5. 70°C – 15 min; 4° C – final.

Os primers utilizados para a amplificação do DNAr 16S para as bactérias 39A e 24A foram:

379-407:

(GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG)

Porção inicial do RNAr 16S, foward

1427-1460:

(ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC)

Porção na posição final do RNAr 16S, reverse



Os primers utilizados para a amplificação do DNAr 16S para a bactéria 18E foram:

F1
(CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG)
Porção inicial do RNAr 16S, foward

R1
(CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG)
Porção na posição final do RNAr 16S, reverse



4. PROTOCOLO IV

4.1. PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR

Uso do kit “Wizard PCR Preps DNA Purification System” (Promega Cat # A7170, para 50 reações) – em tubos Eppendorf

1. Após identificar adequadamente, para cada reação, um tubo Eppendorf de 1,5mL, uma mini coluna e uma seringa de 3mL, aliquotar 100µL do “Direct purification Buffer” no tubo Eppendorf.

2. Transferir todo volume de produto de PCR (de 30 a 300µL) para o tubo Eppendorf onde foi colocado previamente o tampão de purificação de DNA; misturar por alguns segundos em Vortex;

3. Adicionar 1mL da resina à mistura obtida no item anterior e misturar em Vortex, por 3 vezes, por alguns segundos, em um período de 1 minuto;

4. Remova e coloque de lado o êmbolo da seringa de 3 mL;

5. Conecte a mini coluna à seringa de 3 mL, adaptando ambos a um tubo Eppendorf de 1,5mL. Pipete a mistura resina/DNA, do item b e transfira todo volume à seringa. Usando o êmbolo da seringa, faça a mistura passar pela mini coluna, lentamente, inclusive todo ar que estiver na seringa;

6. Remova a seringa da mini coluna e o êmbolo da seringa. Coloque novamente a seringa na mini coluna. Pipete 2 mL de isopropanol 80% e transfira esse álcool à seringa, para lavar a coluna. Recoloque o êmbolo na seringa e suavemente empurre o êmbolo, passando o isopropanol através da mini coluna, até que todo líquido e o ar existente passem pela mesma;

7. Remova a seringa e transfira a mini coluna para um tubo Eppendorf de 1,5mL. Centrifugar a coluna por 2 minutos a 10.000 g para secar a resina;



8. Transferir a mini coluna para um novo tubo Eppendorf de 1,5mL. Aplicar 50 μ L de água ou tampão TE à mini coluna e esperar um minuto (o DNA permanecerá intacto na mini coluna por mais de 30 minutos).

9. Centrifugar a mini coluna por 20 segundos a 10.000 g, para eluir os fragmentos de DNA;

10. Remover e descartar a mini coluna. O DNA purificado pode ficar guardado no tubo Eppendorf a 4°C ou -20°C, se necessário estocar por tempo mais longo que 10 dias.

4.2. QUANTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO DNA

A determinação da pureza e quantificação do DNA foram realizadas com espectrofotômetro (U-2000) Hitachi, lendo-se absorbância em 260 e 280 nm. O cálculo da pureza foi realizado: Absorbância 260 / Absorbância 280, onde foi considerado DNA com bom índice de pureza aquele com quociente igual ou acima de 1,8. Para o cálculo de quantificação foi realizado da seguinte forma: Absorbância 260 nm X fator de diluição X 50 μ g/mL. Para este procedimento foi utilizado 1 μ L de DNA.



5. PROTOCOLO V

5.1. SEQUENCIAMENTO

Protocolo de PCR (para seqüenciamento), sendo duas reações por amostra (ou seja, uma para cada um dos primers utilizados na amplificação do DNA).

Para reações de 10 μ L, em tubo Eppendorf de 200 μ L:

- 2,5 μ L de BigDye Terminator;
- 2,5 μ L de tampão "save money";
- 1 μ L de primer (cerca de 3,0 picoM);
- 100 a 200 ng de DNA (produto de PCR purificado, ressuspenso em água pura);
- Acertar o volume final para 10 μ L com água pura.

Programação da máquina de PCR (termociclador)

- a) 96°C, 1:30 minutos;
- b) 96°C, 12 segundos;
- c) 50°C, 6 segundos;
- d) 60°C, 4 minutos;
- e) Repetir **b**, **c** e **d**, por 24 vezes;
- f) Terminar programa com passo final a 4°C for ever.

Foram utilizados para a amplificação de DNAr 16S os seguintes primers forward: 27Cf e F1 (bactéria 18E); 379-407f e 714-842f (bactérias 39A e 24A); e os seguintes primers reverse: 1378r e R1 (bactéria 18E); 795-822r, 949-977r e 1427-1460r (bactérias 39A e 24A).



6. PROTOCOLO VI

6.1. PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

1. Transferir todo volume de produto de PCR para um tubo Eppendorf de 1,5mL, contendo 80 μ L de Isopropanol 75%;
2. Deixar incubando por 15 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz;
3. Centrifugar por 45 minutos a 15.000g;
4. Remover o sobrenadante;
5. Acrescentar 200 μ L de etanol 70% e inverter o tubo várias vezes, para lavar as paredes do tubo;
6. Centrifugar por 10 minutos a 15.000g (na mesma posição da centrifugação anterior)
7. Descartar o sobrenadante e repetir a lavagem acima;
8. Deixar escorrer em papel absorvente por alguns minutos e inverter o tubo para secar completamente (ou em centrífuga à vácuo);
9. Após secar o tubo (no escuro), o DNA está pronto para ser ressuspensão em Loading Dye (3,0 μ L de Blue Dextran em EDTA 25 mM, pH 8; Formamida (5:1 v/v);
10. Denaturação do DNA no termociclador por 3 minutos a 94°C.
11. Aplicar 1,5 μ L de DNA ressuspensão em gel de poliacrilamida 5%, 0,2 mm de espessura e 36 cm de comprimento, para sequenciamento no ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).



7. SOLUÇÕES UTILIZADAS

7.1. TAMPÃO TE pH 8,0

EDTA 0,5 M pH 8,0.....	2 mL
Tris 1 M pH 8,0.....	10 mL
Água Mili-Q.....qsp	1000 mL

7.2. GEL DE AGAROSE 1%

Agarose.....	0,25 g
TBE 1X.....	25 mL

Levar ao microondas por 4 minutos, esperar esfriar e adicionar 0,5 μ L de brometo de etídio.

Derramar na cuba pequena, esperar polimerizar e cobrir o gel com TBE 1X

7.3. TBE 10 X

Tris.....	108 g
Ácido bórico.....	28 g
EDTA sódico.....	8 g
Completar o volume para 1 L e acertar o pH entre 8,2 e 8,3	



7.4. LOADING DYE 5X

Estoque	Final	Para 25 mL
BPB 0,5%.....	125 %.....	6,25 mL
Sylene : cyanol ff.....	125 %.....	6,25 mL
Ficoll (tipo 400 DL).....	20 %.....	5.00 g
TBE 10X.....	5 X.....	12,50 mL



