

Silvia Messias Bueno

Isolamento e Caracterização de Bactérias
Produtoras de Polissacarídeos Obtidas de
Amostras de Solo da Estação Ecológica de
São José do Rio Preto - SP

São José do Rio Preto

2000



1910000958



Silvia Messias Bueno

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDAS DE AMOSTRAS DE SOLO DA ESTAÇÃO
ECOLÓGICA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz



SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2000



+ 547.458
B928 i

10601007

Bueno, Silvia Messias.

Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polissacarídeos obtidas de amostras de solo da estação ecológica de São José do Rio Preto – SP / Silvia Messias Bueno. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2000.
157 f. : il. ; 30 cm. ·

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz.

Tese (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Bactérias do solo. 2. Produção de polissacarídeos. 3. Reologia. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 631.461

Silvia Messias Bueno

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDAS DE AMOSTRAS DE SOLO DA ESTAÇÃO
ECOLÓGICA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

2º Examinador: Iracema de Oliveira Moraes

3º Examinador: Eleni Gomes

4º Examinador: Fernando Carlos Pagnocca

5º Examinador: Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto, 24 de Janeiro de 2001.



DADOS CURRICULARES

SILVIA MESSIAS BUENO

NASCIMENTO	8.12.1974 – GUARULHOS/SP
FILIAÇÃO	Lourival Messias Bueno Alice Coelho Bueno
1993/1996	Curso de Graduação Química (Bacharelado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP
1997	Bolsista de aperfeiçoamento do CNPq no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
1998/2000	Curso de Pós-graduação em Engenharia e ciência de Alimentos, nível Mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP



Ao Professor Doutor Crispin Humberto Garcia-Cruz,
por ajudar a realização deste trabalho.
Aos meus pais e irmãos por estarem sempre presentes.
Ao Tony por sempre me apoiar.
A Isabela e Gabriela.



AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo financiamento desta pesquisa.

À FUNDUNESP pelo financiamento parcial desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela ajuda na parte fotográfica.

Ao Prof. Dr. Peter James Harris pela ajuda nas traduções de artigos e no abstract desta dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pelo apoio e colaboração durante a execução deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, em especial, aqueles que lecionaram disciplinas importantes para a minha aprendizagem durante o mestrado.



Procure corrigir com calma aqueles que erram, e saiba relevar as imperfeições dos outros, da mesma forma que espera a compreensão dos outros para os seus erros.

Carlos Torres Pastorino



SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FOTOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. Solo	8
3.2. Bactérias do solo	13
3.3. Seleção e identificação de prováveis microrganismos produtores	16
3.4. Polissacarídeos bacterianos	19
3.5. Produção dos Polissacarídeos	24
3.6. Comportamento reológico dos biopolímeros	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Isolamento e caracterização das bactérias produtoras	39
4.2. Determinação da viscosidade em caldo de fermentação ...	40
4.3. Cinética de crescimento celular	42
4.4. Produção dos biopolímeros.....	42
4.5. Determinação do comportamento reológico do biopolímero produzido pela bactéria melhor produtora	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Identificação das bactérias	47
5.2. Produção de polissacarídeos	58
5.3. Estudos reológicos	72
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO I	91
ANEXO II	103
ANEXO III	120
ANEXO IV	128
ANEXO V	134
ABSTRACT	140



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Viscosidade específica dos meios fermentados pelas bactérias produtoras de polissacarídeos, determinada a cada 24 horas durante 96 horas a 30°C e 210 rpm.	59
Figura 2 -	Crescimento celular das bactérias produtoras de polissacarídeos determinado num espectrofotômetro a 520 nm, durante 24 horas a 30°C e 210 rpm.	60
Figura 3 -	Produção de polissacarídeos pelas 6 bactérias isoladas do solo utilizando diferentes concentrações das fontes de carbono a 30°C e pH=7,0.	63
Figura 4 -	Influência do pH na produção de polissacarídeos pelas 6 bactérias isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a 30°C e 210 rpm.	66
Figura 5 -	Influência da temperatura na produção de polissacarídeos pelas 6 bactérias isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a pH=7,0 e 210 rpm.	68
Figura 6 -	Efeito da tensão de cisalhamento sobre a velocidade angular a 25°C no meio de cultura contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 72 horas de fermentação.	75
Figura 7 -	Efeito da viscosidade aparente sobre a taxa de deformação a 25°C no meio de cultura contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 24, 48 e 72 horas de fermentação.	78
Figura 8 -	Efeito da viscosidade aparente sobre a concentração de sais a 25°C e 210 rpm, no meio de cultura contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 72 horas de fermentação medida em 121,5 rpm.	79
Figura 9 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das bactérias isoladas, em intervalos de 24 horas, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.	129



LISTA DE FIGURAS

(continuação)

Figura 10 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das bactérias isoladas, em intervalos de 24 horas, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.	130
Figura 11 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das bactérias isoladas, em intervalos de 24 horas, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.	131
Figura 12 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das bactérias isoladas, em intervalos de 24 horas, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.	132
Figura 13 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das bactérias isoladas, em intervalos de 24 horas, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.	133
Figura 14 -	Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48 horas a 30°C e 210 rpm medida em um espectrofotômetro a 520 nm.	135
Figura 15 -	Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48 horas a 30°C e 210 rpm medida em um espectrofotômetro a 520 nm.	136
Figura 16 -	Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48 horas a 30°C e 210 rpm medida em um espectrofotômetro a 520 nm.	137
Figura 17 -	Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48 horas a 30°C e 210 rpm medida em um espectrofotômetro a 520 nm.	138
Figura 18 -	Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48 horas a 30°C e 210 rpm medida em um espectrofotômetro a 520 nm.	139



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características bioquímicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C	51
Tabela 2 -	Características bioquímicas das bactérias (isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C) em vermelho de fenol adicionado da fonte de carbono correspondente	53
Tabela 3 -	Determinação da atividade enzimática das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C	55
Tabela 4 -	Crescimento celular (peso celular seco em 50 ml de meio de cultura) das 6 bactérias produtoras de polissacarídeos isoladas do solo utilizando diferentes concentrações das fontes de carbono a 30°C e pH=7	64
Tabela 5 -	Crescimento celular (peso celular seco em 50 ml de meio de cultura) das 6 bactérias produtoras de polissacarídeos isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a 30°C em diferentes valores de pH	67
Tabela 6 -	Crescimento celular (peso celular seco em 50 ml de meio de cultura) das 6 bactérias produtoras de polissacarídeos isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a pH=7,0 em diferentes temperaturas	69
Tabela 7 -	pH final do caldo de fermentação após produção dos polissacarídeos durante 72 horas à 30°C e 210 rpm	70
Tabela 8 -	Parâmetros reológicos do caldo de fermentação da bactéria 4B isolada de amostras de solo, em relação ao tempo de incubação num shaker rotatório a 30°C e 210 rpm, medidos em reômetro de cilindros concêntricos a 25°C	74
Tabela 9 -	Parâmetros reológicos do caldo de fermentação a 30°C e pH=7,0 da bactéria 4B isolada de amostras de solo, contendo glicose a 2% em função das concentrações de sais, medidos em reômetro de cilindros concêntricos a 25°C	80



LISTA DE TABELAS

(continuação)

Tabela 10 -	Parâmetros reológicos do caldo de fermentação a 30°C e pH=7,0 da bactéria 4B isolada de amostras de solo, contendo sacarose a 2% em função das concentrações de sais, medidos em reômetro de cilindros concêntricos a 25°C	80
Tabela 11 -	Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24 horas (amostra A)	104
Tabela 12 -	Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24 horas (amostra B)	107
Tabela 13 -	Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24 horas (amostra C)	111
Tabela 14 -	Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24 horas (amostra D)	114
Tabela 15 -	Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24 horas (amostra E)	118
Tabela 16 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra A), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24, 48, 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm	121
Tabela 17 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra B), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24, 48, 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm	122
Tabela 18 -	Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra C), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24, 48, 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm	125



LISTA DE TABELAS

(continuação)

- Tabela 19 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra D), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24, 48, 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm 126
- Tabela 20 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra E), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24, 48, 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm 127



LISTA DE FOTOS

Foto 1 -	Coloração de Gram e de esporos das bactérias identificadas: <i>Bacillus</i> (a), esporos dos <i>Bacillus</i> (b), <i>Staphylococcus</i> (c), <i>Arthrobacter</i> (d), <i>Azotobacter</i> (e), <i>Pseudomonas</i> (f). Aumento: 1.100 vezes	50
Foto 2 -	Exemplos de alguns dos testes bioquímicos utilizados: TSIA (a), amarelo (+) e vermelho (-); Citrato (b), azul (+) e verde (-); Urease (c), rosa (+) e amarelo (-)	57
Foto 3 -	Etapas na produção dos polissacarídeos: meio de fermentação após 72 horas de incubação (a); polissacarídeo precipitado com etanol (b); células secas (c)	71
Foto 4 -	Reômetro (Reotest 2.1) e banho ultra-termostatizado utilizados durante a realização das determinações reológicas	82



LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

∇ = vazão volumétrica (cm^3/s)

v = volume (cm^3)

t = tempo (s)

L = comprimento (cm)

r = raio (cm)

P = pressão (Pa)

μ = viscosidade específica (Pa.s)

τ = tensão de cisalhamento ($\text{N/m}^2 = \text{Pa}$)

k = índice de consistência do fluido (Pa.s^n)

γ = taxa de deformação (s^{-1})

n = índice de comportamento do fluido ()

η_a = viscosidade aparente (Pa.s)

α = torque em um determinado ponto lido no reômetro

Re = raio externo

Ri = raio interno

ω = velocidade angular

$E = Re/Ri$



BUENO, S. M. *Isolamento e Caracterização de Bactérias Produtoras de Polissacarídeos Obtidas de Amostras de Solo da Estação Ecológica de São José do Rio Preto – SP*. São José do Rio Preto, 2000. 155 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os polissacarídeos de origem microbiana têm sido bastante estudados, em vista de suas vantagens em relação aos hidrocolóides derivados de algas e plantas. Nesta pesquisa foram analisadas cinco amostras de solo, A, B, C, D e E. Destas amostras, foram isoladas 322 bactérias gomosas usando a técnica de diluição em tubos e semeadas em PCA (Plate Count Agar). Foi feita a coloração de Gram e observadas as características morfológicas das células. Foi realizada uma nova seleção das bactérias de rápido crescimento e 178 bactérias foram submetidas à determinação da viscosidade do caldo de fermentação através de um capilar de vidro de 0,8 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento à temperatura de 25°C, para obter as bactérias melhor produtoras, bem como o tempo máximo de incubação. Destas, foram selecionadas 30 bactérias para os testes bioquímicos. A análise dos resultados destes mostrou que os gêneros presentes foram: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*. Estudou-se a cinética de crescimento para estas mesmas 30 bactérias e foi determinado o tempo em que atingem máximo crescimento. Foram selecionadas 6 bactérias produtoras identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Arthrobacter*, as quais foram denominadas como: 3B, 4B, 7B, 21B, 18E e 21D. Foram estudadas as condições ótimas de produção de polissacarídeos utilizando um meio de cultura



contendo glicose e outro sacarose nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5%. Também foi verificado o efeito da variação da temperatura de incubação (25, 30 e 35°C) e o efeito de diferentes valores de pH inicial (5, 6, 7 e 8) do meio de cultura. Os resultados obtidos mostraram que concentrações da fonte de carbono até 2%, pH = 7,0 e temperatura de 30°C, apresentaram os maiores rendimentos do polissacarídeo. Foram realizados estudos reológicos no caldo de fermentação da bactéria designada como 4B, utilizando um reômetro de cilindros concêntricos equipado com banho termostático. Foi estudada a influência do tempo de fermentação e as leituras foram feitas com 24, 48 e 72 horas de incubação, utilizando, separadamente, sacarose e glicose como fontes de carbono. Foi determinada a influência das concentrações de sais no meio de cultura contendo glicose e sacarose como fontes de carbono; os sais utilizados foram NaCl, KCl e CaCl_2 nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0%. Foi observado que o caldo de fermentação se comporta como um fluido não-newtoniano e apresenta comportamento pseudoplástico. Das fontes de carbono utilizadas, a sacarose apresentou caldos mais viscosos após 24 e 48 horas, enquanto que a glicose após 72 horas de fermentação. Com relação ao efeito da adição de sais, o CaCl_2 apresentou uma maior influência sobre a viscosidade dos caldos de fermentação.

Palavras-chave: Bactérias do solo; produção de polissacarídeos; reologia



1. INTRODUÇÃO

A moderna indústria alimentícia vem cada vez mais tornando-se dependente da produção de alimentos altamente processados, ao invés de simplesmente preservar as matérias-primas obtidas no campo. Muito desse desenvolvimento tem resultado da criatividade ou manipulação empírica, muitas vezes por tentativa e erro, de ingredientes sobre os quais têm-se pouco conhecimento científico. Entre estes, destaca-se uma classe de polissacarídeos denominados hidrocolóides - ou gomas, como são comumente conhecidos - cuja característica mais importante, sob o ponto de vista tecnológico, é sua capacidade de determinar ou modificar a estrutura de um alimento.

Os polissacarídeos de origem microbiana têm sido bastante estudados nos últimos anos, em vista de suas vantagens em relação aos hidrocolóides derivados de algas e plantas. Dentre esses, os mais difundidos são as gomas xantana e gelana, cujo uso em alimentos já foi permitido pelo FDA (Food and Drug Administration), entretanto, a tecnologia de produção dessas gomas é de domínio exclusivo de poucas indústrias, instaladas principalmente nos Estados Unidos.

Esses polissacarídeos possuem uma ampla gama de propriedades funcionais, atuando como estabilizantes, espessantes, gelificantes e crio-protetores, sendo muitas vezes os principais responsáveis pela textura (corpo, viscosidade, consistência) dos alimentos processados.



O termo hidrocolóides refere-se a uma ampla variedade de compostos na qual podem ser incluídos polissacarídeos de origem vegetal, marinha ou microbiana. As gomas de origem vegetal são obtidas de exsudatos de árvores (gomas arábica e karaya), de sementes (gomas guar e locusta) e de frutas cítricas (pectina), enquanto as de origem marinha são retiradas de algas (alginato, ágar, carragena). Entre as de origem microbiana encontram-se a dextrana, xantana, curdlana e gelana.

Os polissacarídeos de origem microbiana, chamados biopolímeros, apresentam vantagens tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Além disso, as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura.

Entre os biopolímeros mais utilizados, a goma xantana é, de longe, a mais importante, representando 90% do volume total de vendas. O maior fornecedor desse polímero é a Kelco Co. situada nos EUA, entretanto a concorrência torna-se cada dia mais severa, com o aparecimento de novas indústrias produtoras no mercado.

A grande aceitação da goma xantana pelas indústrias alimentícias ocorreu por essa ter sido a primeira goma de origem microbiana



aprovada para uso em alimentos pelo FDA (Food and Drug Administration), em 1969. Somente em 1992 um segundo biopolímero, a goma gelana também produzida pela Kelco Co., obteve aprovação pelo mesmo órgão, tornando-se uma alternativa para o mercado. Deve-se ter em mente, no entanto, que existe um enorme potencial para a descoberta e desenvolvimento de novos biopolímeros produzidos a partir de microrganismos dispersos na natureza. O Brasil em particular, devido a sua enorme biodiversidade, pode ser uma fonte importante de bactérias e fungos produtores de polissacarídeos ainda desconhecidos, que poderiam ser isolados a partir de amostras de solo e plantas nativas.

A Estação Ecológica do Noroeste Paulista está localizada na cidade de São José do Rio Preto - SP, e o Câmpus da UNESP, localizado na mesma cidade, é responsável pela sua administração científica. Essa Estação Ecológica é constituída por duas áreas de matas remanescentes (mata nativa) totalizando 170 ha. Possui matas, riachos, várias nascentes de águas límpidas e uma represa. Essa grande diversidade de ambientes abriga uma flora variada com uma importante fauna associada, constituindo-se, assim num dos únicos refúgios para os animais típicos da região. Atualmente, nesta reserva vêm sendo desenvolvidos vários e importantes projetos de pesquisa, visando a obtenção de dados que possam, no futuro, contribuir para o melhor conhecimento de diversos aspectos dos ecossistemas envolvidos.

Assim, este projeto vem somar-se aos trabalhos já em andamento, buscando explorar de forma racional os recursos naturais existentes



no local, possibilitando a descoberta de linhagens selvagens de bactérias produtoras de polissacarídeos com potencial de utilização industrial.



2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- Isolar, selecionar e caracterizar microrganismos produtores de biopolímeros, a partir de amostras de solo.
- Determinar o efeito da adição de glicose e de sacarose durante a produção de polissacarídeos utilizando um meio quimicamente definido.
- Determinar o efeito dos parâmetros de fermentação (temperatura e pH) durante a produção de polissacarídeos.
- Determinar o comportamento reológico do caldo de fermentação adicionado de diferentes concentrações de sais (NaCl , KCl e CaCl_2).



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. 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, etc), 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 no solo (Smiles, 1988). Nesta região da crosta terrestre, a geologia e a biologia se encontram e sua superfície fornece um lar para plantas, animais e vida microbiana em geral. Comparando as características físicas e químicas dos solos de desertos, florestas, pântanos, pastagens de animais e fazendas, são observadas diferenças marcantes entre eles. Os solos são caracterizados pelos horizons, camadas paralelas de várias espessuras e estruturas. Cada camada difere das outras, abaixo ou acima, em propriedades como conteúdo orgânico e mineral, cor, textura, estrutura, porosidade e pH. Estas propriedades são influenciadas por umidade, conteúdo de gases e conteúdo biológico do horizon. Por exemplo, um horizon que é rico em matéria orgânica tem grande atividade biológica e é bastante diferente de um que é constituído por rocha que tem pouca matéria orgânica e baixa atividade biológica (Pelczar et al., 1996).



O solo pode ser constituído de quatro partes: material mineral derivado de rochas, mais ou menos alterado por decomposição; carbonato de cálcio e compostos orgânicos resistentes derivados de plantas ou organismos presentes no período anterior; resíduos de plantas; microrganismos recentemente adicionados ao solo e água, a qual é uma solução de vários sais solúveis e parcialmente solúveis presentes no solo (Russell, 1973).

Quando não há a influência das raízes de vegetais sobre o solo, esse pode ser considerado um ambiente oligotrófico, já que é geralmente pobre em formas de carbono disponível. As raízes das plantas representam uma das suas principais fontes de carbono. Este ambiente ao redor das raízes ou o volume de solo que é influenciado biológica e bioquimicamente pela raiz é conhecido como rizosfera. Exsudatos, secreções e alterações físico-químicas criam o efeito rizosfera, que é manifestado pela intensa atividade microbiana associada a esse ambiente, pois o crescimento de microrganismos é estimulado pelas substâncias nutritivas libertadas pelo tecido vegetal, enquanto que, o desenvolvimento dos vegetais é influenciado pelos produtos do metabolismo microbiano excretados para o meio exterior. (Pelczar et al., 1980; Lynch, 1986, Germida & Siciliano, 1999, Siqueira & Franco, 1988; Curl & Truelove, 1986; Lynch & Whipps, 1990).

Embora cada raiz possa ter sua própria região de influência e microbiota específica, a distribuição dos microrganismos na rizosfera não é contínua, e eles ocorrem em “microhabitats” discretos, podendo cada um deles conter organismos morfo e fisiologicamente distintos (Siqueira & Franco, 1988).



Os fotossintatos transferidos até a rizosfera representam a força motriz da comunidade microbiana, tornando seu crescimento uma função da disponibilidade de substrato, representado por exsudatos, mucilagens e células escamadas, e da sua difusão no solo. Os efeitos das raízes sobre os microrganismos, embora não sejam específicos, podem ser estimulantes ou inibitórios para os diferentes membros da comunidade rizosférica. Também, o efeito dos microrganismos sobre o crescimento das plantas pode ser benéfico ou maléfico (Siqueira & Franco, 1988).

Poucos ambientes, na terra, fornecem tão grande variedade de microrganismos como o solo fértil, cuja vida microscópica inclui bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus. A população bacteriana neste ambiente excede a população de todos os outros grupos de microrganismos, tanto em número como em variedade, encontrando-se desde organismos autotróficos estritos até formas heterotróficas (Brandão, 1992; Pelczar et al., 1996). Quinze gramas de solo fértil contém mais microrganismos do que a população do mundo. Sem a vida microbiana, o solo não poderia ser dinâmico, um sistema perpétuo que sustenta todas as plantas e indiretamente todos os animais (Sale, 1974; Brandão, 1992; Lynch, 1986).

Os microrganismos são ativos na formação e estabilização da estrutura do solo (Sale, 1974), e esta atividade microbiana pode causar a decomposição de materiais orgânicos. O húmus, por exemplo, é formado durante a decomposição microbiana de resíduos de plantas e animais, inclui a massa de microrganismos envolvidos na decomposição desses substratos. O húmus é



benéfico porque melhora a estrutura do solo, promove uma lenta liberação de nutrientes, aumenta a capacidade de tamponamento e a capacidade de retenção de água do solo (Pelczar et al., 1996).

A quantidade e os tipos de microrganismos presentes no solo dependem de muitos fatores ambientais: quantidade e tipo de nutrientes disponíveis, umidade, grau de aeração, temperatura, pH, práticas e eventos que podem introduzir grande número de microrganismos no solo, como a aplicação de adubos (estercos) ou dejetos de esgotos e a ocorrência de enchentes, ou aqueles que podem remover os microrganismos, como as tempestades de poeira. A presença de raízes e a extensão do sistema radicular no solo também pode afetar o número e os tipos de microrganismos presentes (Pelczar et al., 1996).

As interações de espécies microbianas têm um importante efeito na população microbiana no solo. Por exemplo, protozoários predatórios e actinomicetos produtores de antibióticos podem eliminar certas espécies de microrganismos. Por outro lado, bactérias que decompõem celulose e proteínas podem fornecer nutrientes para espécies bioquimicamente menos versáteis, pela quebra dessas moléculas complexas em outras menores, mais facilmente metabolizáveis (Pelczar et al., 1996).

Em certas circunstâncias, as bactérias podem-se tornar mais importantes na rizosfera. Alguns gêneros importantes de bactérias presentes no solo são os Gram positivos, *Arthrobacter* (bastonetes/cocos), *Staphylococcus* (cocos) e *Bacillus* (bastonetes com esporos), e os Gram negativos, *Pseudomonas* (bastonetes), *Rhizobium* (bastonetes), *Azotobacter* (bastonetes ou células



leveduriformes), *Nitrobacter* (bastonetes) e *Xanthomonas* (bastonetes) (Lynch, 1986).

O uso de microrganismos em biotecnologia representa uma área em plena expansão. Entretanto, se conhece relativamente pouco 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).

Com muita freqüência, a análise microbiológica do solo se relaciona com o isolamento e identificação de tipos fisiológicos específicos de microrganismos com a caracterização e a detecção de sua atividade (Lynch, 1986).

Durante a convenção do Rio de Janeiro (1998) foi postulado que, para a proteção da biodiversidade do solo devem-se considerar três reações principais: a) Reações ecológicas – estas, incluem a decomposição e formação do solo, pois são processos chave na natureza e representam a base do ecossistema restante. Incluem-se também os microrganismos do solo, uma vez que, representam a base para várias cadeias alimentares. b) Reações utilitárias – aqui a biodiversidade do solo forma a base para a agricultura, medicina (algumas) e pesquisas ecológicas e, por último c) Reações éticas – onde se consideram-se que todas as formas de vida têm valores inerentes (Rio-Convention, 1998).

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 facilmente cultiváveis.



Entretanto, tem sido coletada uma grande quantidade de informações, tanto dos microrganismos cultiváveis quanto dos não-cultiváveis (até encontrar o meio ideal) e o impacto de suas funções sobre o solo e sobre muitos processos do solo. 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. O conhecimento de suas interações e funções é vital para o entendimento do solo e sua melhor sustentação (Kennedy & Gewin, 1997).

3.2. Bactérias do solo

Arthrobacter

São bactérias aeróbias Gram positivas em forma de bastonetes que se acomodam em forma de V. As culturas mais velhas (fase estacionária), apresentam-se como células cocóides, sendo encontradas individualmente, em pares ou em grupos irregulares. As células podem ser móveis ou imóveis, não formam endosporos, são quimiorganotróficas, produzem pouco ou nenhum ácido a partir da glicose e outros carboidratos sem presença de gás (metabolismo oxidativo), temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30°C, catalase positiva, gelatinase e amilase positivas ou negativas (Bergey's, 1984).

Azotobacter

Possuem como habitat natural o solo, a água, a rizosfera ou as plantas, Suas células variam de bastonetes a células cocóides; não produzem endosporos, mas formam cistos em culturas velhas, podendo ser móveis ou



imóveis. São microrganismos Gram negativos, fixam o nitrogênio atmosférico, crescem bem em condições de aerobiose, temperatura ótima de crescimento entre 32 a 35°C. Apresentam reação de catalase positiva, nitrato e oxidase positivo ou negativo, utilizam diferentes carboidratos e são protease negativa. A maioria das espécies utilizam o tiosulfato com produção de H_2S . As colônias são geralmente planas (lisas), brilhantes e pouco convexas (Bergey's, 1984).

Nitrobacter

São bacilos curtos, normalmente imóveis, Gram negativos não esporulados. Células ricas em citocromos, que dão uma coloração amarela às suspensões bacterianas; algumas são quimiolitotróficas obrigatórias, oxidam nitritos a nitratos e fixam o CO_2 , a fim de satisfazer as necessidades de energia e de carbono. São estritamente aeróbias e possuem temperatura ótima de crescimento a 28°C, habitam o solo e a água (Bergey's, 1984).

Rhizobium

São bastonetes móveis não esporulados Gram negativos, O crescimento em meios contendo carboidratos geralmente é acompanhado pela formação copiosa de polissacarídeos extracelulares; são quimiorganotróficos, aeróbios, temperatura ótima de crescimento 25 a 30°C; testes de nitrato positivo, amilase, celulase, gelatinase e protease negativos, oxidase positiva ou negativa. São bactérias que fermentam várias fontes de carbono tornando o meio ácido sem a produção de gás; habitat natural solo e raízes de plantas (Bergey's, 1984).



Bacillus

Os *Bacillus* são células em forma de bastonetes retos, Gram positivas, a maior parte é móvel e forma endosporos. São quimiorganotróficos, aeróbios ou anaeróbios facultativos; Voges-Proskauer (VP) e reações de nitrato, oxidase, urease, citrato e gelatinase, positiva ou negativa; não produzem indol, e são catalase positiva. Fermentam vários carboidratos como a glicose, maltose e sacarose sem produção de gás, são comumente encontrados no solo, água e ar. A presença de polissacarídeo é importante nas reações de precipitação (Bergey's, 1984).

Pseudomonas

São bastonetes isolados, retos ou encurvados, móveis por meio de flagelos polares, ocasionalmente são isoladas da natureza linhagens não móveis de várias espécies. São Gram negativas não esporulados, quimiorganotróficos, aeróbios estritos, exceto aquelas espécies que usam a desnitrificação como meio de respiração anaeróbia, catalase positiva, indol negativo, oxidase, gelatinase, nitrato e lecitinase, positiva ou negativa, crescem bem a 25-30°C. Os carboidratos como a glicose e a sacarose podem ser ou não fermentados; citrato positivo para espécies como *Pseudomonas fluorescens*; têm como habitat natural o solo e a água (Bergey's, 1984).



Xanthomonas

São bastonetes retos Gram negativos, predominantemente isolados, aeróbios, metabolismo estritamente respiratório; motilidade, catalase e amilase positivas; nitrato e protease negativos; oxidase negativa ou fracamente positiva. São quimiorganotróficos capazes de usar uma ampla variedade de carboidratos e sais de ácidos inorgânicos como fontes de carbono produzindo pequena quantidade de ácido a partir de carboidratos; temperatura ótima de crescimento entre 25-30°C (Bergey's, 1984).

Staphylococcus

São cocos gram positivos, ocorrem simples, em pares ou em grupos irregulares, não móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos; catalase positiva; metabolismo respiratório e fermentativo; nitrato e urease positivos ou negativos; oxidase negativa. Uma variedade de fontes de carbono podem ser utilizadas aerobicamente com a produção de ácido. Temperatura ótima de crescimento entre 30 a 37°C (Bergey's, 1984).

3.3. Seleção e identificação de prováveis microrganismos produtores

Partindo do fato que a biotecnologia é o uso integrado da bioquímica, microbiologia e engenharia, com o propósito de viabilizar as potencialidades dos microrganismos em aplicações tecnológicas (Lynch, 1986), e de que segundo Zilinskas (1993), os países em desenvolvimento apenas poderão



beneficiar-se plenamente da biotecnologia em termos de desenvolvimento econômico e soluções técnicas, caso sejam capazes de aplicar os resultados de suas próprias pesquisas biotecnológicas, é fundamental o aproveitamento das vantagens apresentadas por esses países, principalmente em relação a suas reservas biológicas.

Baladrian et al. (1985) e Bull et al. (1992) apresentam dados sobre o número estimado de espécies de plantas, animais, fungos e bactérias existentes e ainda não identificados. De acordo com esses autores, existem 40.000 espécies de bactérias, das quais apenas 4.760 foram identificadas, o que representa apenas 12% do total. Em relação aos fungos, o potencial é ainda maior: das 1.500.000 espécies estimadas, apenas 5% (69.000) são conhecidas.

A maioria das espécies se encontra nos países tropicais. O Brasil sozinho deve abrigar 30% de todas as espécies da Terra. A história dos recursos naturais tropicais, no entanto, mostra que a riqueza proporcionada por eles muito freqüentemente é transferida para os países desenvolvidos (Lovejoy, 1992). Atualmente, com as exigências destes países em relação à lei de proteção à propriedade intelectual, o panorama pode tornar-se ainda mais desfavorável. Uma proteção de patentes cada vez mais rígida poderá restringir ainda mais o já limitado acesso do país aos segredos da biotecnologia, beneficiando os exportadores de tecnologia e de produtos derivados, mais do que os detentores da riqueza genética do Terceiro Mundo (Schneider, 1993).

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).

Muitos trabalhos de taxonomia com bactérias consistem do exame individual das características culturais bacterianas junto com a determinação das propriedades morfológicas das células e colônias; além da determinação das características bioquímicas, que consistem na avaliação da capacidade de utilização de vários carboidratos e outros compostos orgânicos; dos produtos da decomposição, como a produção de gases e desenvolvimento de acidez metabólica (Holding & Colee, 1971; Brandão, 1992).

Em relação à produção de alimentos, é importante salientar que, sob o ponto de vista da indústria, o maior interesse em novos produtos resultantes de aplicações biotecnológicas encontra-se na área de ingredientes e aditivos e não em novos alimentos. Portanto, a produção de biopolímeros usados como aditivos em produtos processados vêm exatamente ao encontro dessa expectativa (Knorr, 1995).

Slodki (1987), ressalta a necessidade de que a pesquisa e desenvolvimento de novos microrganismos produtores de polissacarídeos seja feita de modo integrado com os estudos de produção e caracterização do material obtido, envolvendo grupos multidisciplinares, uma vez que, apesar da vasta quantidade de publicações sobre o assunto, ainda existe grande falta de informações, principalmente quanto ao processo de fermentação e a dados de reologia e estabilidade do produto.



3.4. Polissacarídeos bacterianos

Os hidrocolóides ou gomas, são polissacarídeos de alto peso molecular, geralmente solúveis em água e podem ser extraídos de plantas, algas e microrganismos. Em solução, apresentam a capacidade de incrementar a viscosidade e/ou formar géis (Whistler & Daniel, 1985; Whistler, 1973).

Os hidrocolóides possuem grande variedade de estrutura química, peso molecular, composição, solubilidade e outras características que lhes conferem uma ampla gama de funcionalidades (BeMiller, 1988). O uso de hidrocolóides na indústria de alimentos baseia-se principalmente no aproveitamento destas propriedades funcionais (Glicksman, 1982; Szczesniak, 1986).

Anualmente, milhões de toneladas de polímeros solúveis em água são usados como espessantes, gelificantes e agentes de suspensão, sendo todos obtidos de plantas e algas (Pace & Righelato, 1981; Giavasis et al., 2000); porém a qualidade e o fornecimento desses polímeros podem ser afetados por diversos fatores climáticos (Ashtaputre & Shah, 1995).

O maior problema em relação à utilização destes hidrocolóides extraídos de fontes naturais é a escassez e a possibilidade de esgotamento das mesmas. 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, e portanto selecionar microrganismos que produzam polissacarídeos em grande quantidade é economicamente interessante. Este desafio vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa em indústrias localizadas principalmente nos países desenvolvidos como o Japão, EUA, Canadá e França (Ashtaputre & Shah, 1995).

Nos últimos anos, houve uma continua procura por novos polissacarídeos solúveis em água, particularmente aqueles produzidos por microrganismos. O meio ambiente contém uma larga variedade de microrganismos e, em consequência, espera-se que possam ser descobertos novos microrganismos produtores (Kang et al., 1982). Constantemente, novos polissacarídeos microbianos vêm sendo descobertos e caracterizados, revelando propriedades químicas e físicas incomuns (Vandamme & Soetaert, 1995, apud Vandamme et al., 1996).

Algumas bactérias, durante o seu metabolismo, podem sintetizar três tipos de polissacarídeos, diferenciados por sua localização celular em: (1) polissacarídeos intracelulares; (2) polissacarídeos da parede celular (peptidoglicanos e ácidos teicóicos) e, (3) polissacarídeos extracelulares (formam cápsulas, estão associados à superfície celular ou secretados no meio de cultura (Sutherland, 1972).

O papel dos polissacarídeos extracelulares não está claramente definido, entretanto, a cápsula protege a célula contra as condições ambientais desfavoráveis, como por exemplo, dessecação, presença de compostos tóxicos,



pressão osmótica e contribui para a adsorção de íons metálicos (Cerning, 1990). Além disso, os polissacarídeos podem interagir com os suportes físicos promovendo a formação de biofilmes.

Os polissacarídeos microbianos, também conhecidos como biopolímeros, são produzidos por quase todos os microrganismos vivos, no entanto, os mais facilmente adaptáveis para a produção comercial são os fungos e as bactérias, pois possuem a capacidade de crescer como cultura pura, em fermentações de larga escala e de produzir biopolímeros com alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais (Russell, 1973).

A função tecnológica dos polissacarídeos extracelulares produzidos por bactérias têm aplicação específica em diversas áreas, tais como: alimentos, agroquímica, recuperação de petróleo bruto, medicina e farmácia, química fina, cosméticos, separações tecnológicas e química de polímeros (Vandamme et al., 1996, Giavasis et al., 2000). Algumas gomas são produzidas em escala industrial como a dextrana, xantana e alginato que são usadas como estabilizantes em alimentos e a curdlana, usada como agente gelificante (Kawai et al., 1992).

Os exopolissacarídeos microbianos mostram pouca variabilidade de suas características físicas e químicas e não são vulneráveis às diversas condições climáticas, de cultivo, de produção ou poluição não ocorrendo o mesmo com as obtidas de fontes naturais (Roseiro et al., 1992). Além disso, as gomas de origem microbiana são susceptíveis à biodegradação pela natureza, promovendo pouco prejuízo e baixa poluição ao meio ambiente. Os polímeros microbianos são



formados por fermentação e podem usar como substratos recursos naturais renováveis. A produção biotecnológica "*in vitro*" via fermentação controlada permite a produção de polímeros microbianos, com estrutura química e propriedades homogêneas. Por isto, alguns polissacarídeos bacterianos são produzidos em escala industrial e usados como matéria prima para alimentos processados ou em formulações farmacêuticas e em diversas preparações industriais (Kawai et al., 1992; Vandamme et al., 1996).

Devido a sua diversidade na estrutura e propriedades, os polissacarídeos microbianos têm atraído grande interesse das mais diversas indústrias. A identificação de novas fontes desses materiais pode ser completamente interessante, particularmente se esses polímeros possuírem boas propriedades reológicas. Desta maneira, os biopolímeros vêm substituindo gradativamente os polissacarídeos obtidos de fontes tradicionais, como plantas e algas (Sutherland, 1990; Philippis et al., 1991; Sanderson, 1981).

A aplicação dos biopolímeros em produtos alimentícios é muito vasta, devido às propriedades e características específicas mencionadas a seguir: produzem alta viscosidade, mesmo quando usados em baixas concentrações; são estáveis em relação ao calor, resistindo a altas temperaturas durante o processamento; têm excelente solubilidade e estabilidade em meio ácido; são estáveis na presença de sais, principalmente cloreto de sódio; são eficientes como estabilizadores de emulsões, evitando a separação da gordura nos sistemas óleo/água; são de natureza altamente pseudoplástica, diminuindo o arraste durante o escoamento; nos embutidos de carnes retém a umidade e evitam a exsudação da



gordura, também chamado de "encapsulamento branco" (Foegeding & Ramsey, 1987).

O primeiro e mais importante biopolímero, do ponto de vista comercial, é a goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* que, devido a suas extraordinárias propriedades reológicas, tem sido muito bem explorada na indústria de alimentos, indústria têxtil e na recuperação de óleos desde 1969 (Tako & Nakamura, 1987).

Um outro polissacarídeo importante é a goma gelana, que passou a ser comercializado recentemente 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 durante uma pesquisa sobre microrganismos sintetizadores de gomas isolados do ambiente (Pszczola, 1993).

A 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 (Pszczola, 1993).



3.5. Produção de Polissacarídeos

Em vista do aumento da utilização dos biopolímeros de origem microbiana para aplicações industriais, foram feitos esforços para reduzir os custos envolvidos na produção e para melhorar o rendimento e produtividade. Estudos do meio de fermentação utilizado e dos processos envolvidos têm sido reportados na literatura e observa-se que glicose e sacarose têm sido usadas como fontes de carbono (Souw & Demain, 1979; Rajeshwari et al., 1995). A otimização das condições de fermentação é particularmente importante tendo em vista a grande aplicabilidade das gomas na indústria.

O efeito das condições de produção de polissacarídeos extracelulares por espécies microbianas são estudados tanto para culturas em crescimento como para células em suspensão. As espécies diferem em suas respostas às mudanças do meio de produção, uma vez que, as quantidades de sais inorgânicos (nitrogênio, fósforo ou sulfato), fontes de carbono, oxigênio, temperatura e pH encontrados são diferentes para cada espécie (Sutherland, 1972).

Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pelo 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 (Cottrell et al., 1980). A



otimização das condições de fermentação para a produção deste polímero, é particularmente importante, em vista de sua grande aplicabilidade industrial (De Vuyst & Vermeire, 1994).

Durante o desenvolvimento da produção de polissacarídeos devem-se determinar os nutrientes do meio em condições que permitam alcançar alto rendimento de produção e baixo custo. A *Xanthomonas campestris* pode, aparentemente, utilizar grande número de substratos sem afetar o crescimento, rendimento e propriedades do polissacarídeo, havendo assim, a possibilidade desta utilizar grande número de fontes de carboidratos comerciais como a glicose e a sacarose (Roseiro et al., 1992).

Estudos conduzidos por Williams et al. (1973) para *Pseudomonas* PBI, isolada de um efluente rico em carboidratos, mostraram que estas sintetizam grandes quantidades de um polissacarídeo extracelular viscoso quando crescem em meio quimicamente definido com glicose ou sacarose como fonte de carbono. Este polissacarídeo recebeu o nome de gelana. Em um outro estudo, utilizando outra linhagem de *Pseudomonas* NCIB1126, Williams & Wimpenny (1977) utilizaram suspensões de células separadas do caldo de fermentação como inóculo e o polissacarídeo foi recuperado do sobrenadante livre de células por precipitação com álcool-acetona e depois seco e moído.

Moorhouse e colaboradores (1981), utilizaram um meio contendo glicose, uma fonte de nitrogênio e sais inorgânicos para a produção de goma gelana por *Pseudomonas elodea* controlando estritamente a taxa de aeração, temperatura e pH. Quando a fermentação foi completada, a goma foi isolada do



caldo espesso por precipitação com álcool. Entretanto, a goma gelana é muito cara, o que pode ser atribuído ao alto custo de sua obtenção e por este motivo, tem se estudado o uso de substratos mais baratos (por exemplo, lactose de soro de queijo) que podem diminuir este alto custo (Dlamini & Peiris, 1997).

Uma linhagem de *Bacillus* isolado do solo produziu um polissacarídeo extracelular altamente viscoso em um meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono, a temperatura de 30°C. A máxima formação do polissacarídeo foi obtida após 48 h de fermentação e o rendimento do polissacarídeo alcançou 2g/l de meio basal (Kawai et al., 1992).

Isobe et al. (1992), utilizaram uma linhagem de *Bacillus* isolado do solo para produzir polissacarídeos que proporcionaram uma alta viscosidade em um meio contendo glicose e agitação aeróbia. As células foram separadas do caldo de fermentação por centrifugação e o polissacarídeo, que se encontrava no sobrenadante, foi precipitado com ajuda de uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio e dois volumes de etanol. Eles também testaram sacarose como fonte de carbono e observaram uma boa produção do polissacarídeo.

Durante a produção de dextrana utilizando a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B512(F) foi observado que, em presença de sacarose no caldo de fermentação, este caldo é menos viscoso durante o crescimento celular (Landon et al., 1993). De & Derris, 1996, utilizando *Rhizobium* sp. isolado de nódulos de raízes, obtiveram uma grande quantidade de polissacarídeo extracelular durante a fase estacionária de crescimento. Estes mesmos resultados

também foi obtido por Gancel & Novel (1994) utilizando *Streptococcus salivarius* ssp. e Looijesteijn et al. (1998) utilizando *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Morin et al. (1993), pesquisaram a produção de um exopolissacarídeo por *Enterobacter agglomerans*, utilizando como fonte de carbono sacarose. Estes pesquisadores determinaram as condições de máxima produção do polissacarídeo e observaram que os parâmetros que têm maior efeito na síntese e/ou composição dos polissacarídeos são as fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, aeração e agitação, temperatura de incubação e pH da cultura.

Os polissacarídeos são produzidos seguindo um processo de fermentação tipo descontínuo usando açúcares como fontes de carbono (Vandamme et al., 1996) e diversos microrganismos isolados dos mais diferentes habitats. Experimentos conduzidos por Hôu et al. em 1996, com uma bactéria isolada do solo identificada como *Agrobacterium* sp, produziu um polissacarídeo extracelular solúvel em água de alta viscosidade utilizando fermentação descontínua.

3.6. Comportamento reológico dos biopolímeros

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da matéria. O termo deformação aplica-se aos sólidos e a propriedade reológica de interesse é a elasticidade. Escoamento, por sua vez, é utilizado para líquidos e a propriedade reológica é a viscosidade. O conhecimento das propriedades



reológicas de um fluido é muito importante pois estas podem ser utilizadas para efetuar o controle das matérias primas dos processos de fabricação e dos produtos finais, para estudar a influência dos componentes da formulação e características reológicas e para projetar equipamentos necessários para produzir um tipo determinado de produto (Borwankar, 1992).

A caracterização reológica dos hidrocolóides é necessária por diversas razões. A primeira delas é o fato de que seu comportamento varia em função da matéria-prima e do método de produção, tornando-se essencial, tanto para o comprador quanto para o fabricante, a existência de testes e padrões para avaliar a qualidade do produto. Em segundo lugar, as medidas reológicas podem ser utilizadas para complementar informações obtidas por meio de outras técnicas sobre a conformação das moléculas dispersas em determinado solvente. Finalmente, ensaios instrumentais podem ser realizados em substituição às análises sensoriais na determinação da textura do produto (Mitchell, 1976; Ozdemir & Sadikoglu, 1998).

Do ponto de vista reológico, os fluidos podem ser classificados em várias categorias. Aqueles que obedecem à bem definida lei de Newton, isto é, tais que a relação entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de velocidade é constante, para dadas condições de temperatura e pressão e são chamados newtonianos. São geralmente fluidos simples: água, óleos, solventes orgânicos e soluções de baixo peso molecular, como glicose, sacarose, etc. Todos os gases são deste tipo. Em fluidos Newtonianos, a tensão de cisalhamento é proporcional



à taxa de deformação e a linha reta que representa esse comportamento passa pela origem de um gráfico tensão versus deformação (Pasquel, 1999, Olivers, 1995).

Os líquidos que exibem desvio dessa lei, ou seja, nos quais a tensão de cisalhamento não é, em dadas condições, proporcional ao gradiente de velocidade, são chamados não-newtonianos. Nos fluidos não-newtonianos, porém, o comportamento não é tão simples e existem diversos modelos não-lineares que procuram representar a tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação (Pasquel, 1999, Olivers, 1995)

É conveniente dividir os materiais não-newtonianos em três grandes grupos (Holdsworth, 1971):

- *fluidos independentes do tempo*, nos quais a taxa de deformação é função apenas da tensão de cisalhamento;
- *fluidos dependentes do tempo*, nos quais a taxa de deformação é função tanto da magnitude quanto do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento. O intervalo de tempo entre sucessivas aplicações da tensão também pode afetar a taxa de deformação;
- *fluidos viscoelásticos*, nos quais observa-se um retorno parcial ao estado de deformação original após a remoção da tensão de cisalhamento.

A grande maioria dos fluidos não-newtonianos, independentes do tempo, possui comportamento pseudoplástico (índice de consistência do fluido é menor que 1). Esta classe é representada por produtos como polpas e sucos concentrados de frutas, soluções de pectina, etc. Esse comportamento é explicado pela destruição da estrutura formada por cadeias longas, com o aumento dos

gradientes de velocidade. Essas cadeias tendem a se alinhar paralelamente às linhas de corrente, diminuindo a resistência ao escoamento. Em altos gradientes de velocidade, esses fluídos tendem a um comportamento newtoniano, devido à completa orientação das cadeias ou partículas. Para gradientes baixos, esses fluídos também apresentam comportamento newtoniano, devido à completa distribuição ao acaso da orientação das partículas (Pasquel, 1999; Rao & Anantheswaran, 1982)

Considerando os fluidos independentes do tempo, o grupo mais importante é o dos fluidos pseudoplásticos, nos quais a viscosidade aparente, isto é, a razão entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, decresce com o aumento desta última; para esses tipos de fluídos, é freqüente a constatação de que o gráfico da tensão de cisalhamento versus taxa de deformação em coordenadas logarítmicas é linear sobre uma ampla faixa de taxas de deformação, fazendo com que uma relação empírica, conhecida como Lei da Potência, seja bastante utilizada (Pasquel, 1999; Margaritis & Pace, 1985; Rao & Anantheswaran, 1982; Ozdemir & Sadikoglu, 1998, Landon et al., 1993)

Os fluidos dilatantes (índice de consistência maior que 1) em geral, são raros, entretanto, podem-se mencionar alguns tipos de mel de abelha produzidos a partir das flores de certas espécies de eucaliptos, suspensões de areia, de amido, etc. O fenômeno da dilatação é explicado pela existência, no líquido, de um sistema de partículas densamente empacotado. Se esse sistema for submetido a cisalhamento, precisa ocorrer então uma certa separação das partículas, antes que elas comecem a deslizar umas sobre as outras. Como

conseqüência ocorre um aumento global de volume. À medida que as tensões aumentam, as partículas passam a interagir entre si, aumentando a viscosidade do sistema (Margaritis & Pace, 1985; Rao & Anantheswaran, 1982).

São classificados também como fluidos não-newtonianos líquidos cuja viscosidade, para um gradiente de velocidade constante, aumenta ou diminui com o tempo. Esses fluidos são chamados reopéticos ou tixotrópicos, respectivamente e são as expressões reológicas da dependência do comportamento de um material com o tempo. Ambos fenômenos podem ser irreversíveis ou parcialmente reversíveis (Steffe, 1992).

Existem ainda sistemas mais complexos, que podem agir como sólidos ou líquidos, conforme as tensões aplicadas. Geralmente esses sistemas possuem uma recuperação elástica da estrutura, após a retirada da tensão. Por essa razão, esses materiais são classificados como viscoelásticos. São geralmente soluções concentradas de polímeros e dispersões concentradas de proteínas (Van Wazer et al., 1963, Pasquel, 1999).

Os biopolímeros, como sua própria denominação indica, são sistemas macromoleculares e apresentam comportamento não-newtoniano em conseqüência de interações eletrostáticas, entrelaçamentos ou mesmo ligações químicas entre determinadas regiões de suas moléculas (Pasquel, 1999).

A viscosidade de uma solução polimérica é uma função do tamanho, forma e conformação que adotam suas moléculas no solvente, sendo que no caso de alimentos e bebidas, o solvente é uma solução aquosa de outros solutos. Assim, as soluções de gomas são dispersões de moléculas hidratadas e/ou



agregados de moléculas hidratadas, e seu comportamento reológico é determinado pelo tamanho, forma, facilidade de deformação ou flexibilidade, presença e magnitude da carga elétrica nessas moléculas hidratadas e/ou agregados. As soluções de polissacarídeos exibem dois tipos gerais de comportamento reológico: pseudoplástico (mais comum) e tixotrópico (BeMiller & Whistler, 1996).

3.6.1. Relações matemáticas

A principal utilidade de um modelo reológico é representar matematicamente a relação entre os valores experimentais de taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) e tensão de cisalhamento (τ), para um fluido particular, e assim facilitar os cálculos de engenharia (Rao & Anantheswaran, 1982).

Com o avanço da ciência e do conhecimento, os modelos reológicos que descrevem o comportamento de escoamento de novos materiais foram se aperfeiçoando. Baseiam-se em aspectos fenomenológicos ou teóricos relacionados com a estrutura do fluido (Rao & Anantheswaran, 1982).

Tais modelos são úteis para relacionar as propriedades reológicas de um fluido com os parâmetros práticos, por exemplo concentração, temperatura, pH, índice de maturação, etc. Esse conhecimento é indispensável no controle de qualidade, controle intermediário em linhas de produção e no projeto e dimensionamento de equipamentos e processos (Rao & Anantheswaran, 1982, Pasquel, 1999).

Dessa maneira, para os cálculos relacionados com o projeto de tubulações, bombas, trocadores de calor, tanques de mistura, evaporadores, etc., é

fundamental a disponibilidade de equações matemáticas que representam o fenômeno ocasionado pelas forças de cisalhamento e deformação ((Rao & Anantheswaran, 1982, Pasquel, 1999).

Os fluidos newtonianos são os que possuem uma relação constante entre gradientes de velocidade e tensão de cisalhamento, para condições de pressão e temperatura pré-determinados. Essa classe de fluidos é descrita matematicamente pela equação:

$$\tau = \eta \cdot \gamma \quad (1)$$

τ = tensão de cisalhamento

γ = taxa de deformação

onde η é a viscosidade do fluido em função apenas, para cada fluido, da temperatura e da pressão (Rao & Anantheswaran, 1982, Pasquel, 1999, Ozdemir & Sadikoglu, 1998).

Os fluidos onde a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não é constante são chamados fluidos não-newtonianos. Para esses fluidos a literatura mostra vários modelos empíricos que correlacionam a tensão de cisalhamento com a taxa de deformação (Sherman, 1970; Skelland, 1967 e Van Wazer et al., 1963).

A maioria dos fluidos não-newtonianos sem tensão residual são representados pelo modelo de Ostwald-de-Waele comumente chamado de Lei da Potência. Este modelo é simples e de fácil compreensão (equação 2).

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (2)$$



onde k é o índice de consistência do fluido e n é o índice de comportamento do fluido.

Para este modelo, a viscosidade aparente é dada pela equação 3:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = k \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (3)$$

Neste modelo, o parâmetro n constitui uma propriedade física que caracteriza o seu grau de comportamento não-newtoniano. O parâmetro k indica quanto é mais "viscoso" ou "espesso" um fluido.

3.6.2. Cálculos reológicos através da Lei da Potência para fluidos não-newtonianos

O procedimento para o cálculo dos parâmetros reológicos segue os seguintes passos:

1) Determinação da tensão de cisalhamento (τ) na parede do cilindro interno pela equação:

$$\tau = \frac{\alpha}{2 \pi (R_i)^2 L} \quad (4)$$

2) Regressão linear pelo método dos mínimos quadrados do $\ln$ de tensão de cisalhamento (τ) versus $\ln$ da velocidade angular (ω). O coeficiente linear é o índice de consistência aparente (K_{ap}) e o coeficiente angular é o índice de comportamento do fluido (n).

3) Com o índice de comportamento do fluido (n) encontrado no item 2, calcula-se a taxa de deformação por meio da equação:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\ln E} (1 + 1/n \cdot \ln E) \quad (5)$$

$$E = Re/Ri$$

4) Novamente se faz uma regressão entre $\ln$ da tensão de cisalhamento em função do $\ln$ da taxa de deformação e obtém-se o índice de consistência (k) e o mesmo valor do índice de comportamento do fluido (n).

A partir de K e n é calculada a viscosidade aparente de acordo com a equação 3.

O modelo da lei de potência, devido a simplicidade, é um dos mais difundidos na literatura, e a maioria dos procedimentos existentes para cálculos relacionados com fluidos não-newtonianos baseia-se nele. Esse modelo é usado para descrever o comportamento reológico de qualquer fluido independente do tempo, desde que aplicado numa faixa limitada de gradiente de velocidade (Skelland, 1967).

Alguns fluidos mostram uma tensão inicial mas, em seguida, passam a comportar-se como fluidos newtoniano são conhecidos como fluidos de Bingham. Esses fluidos apresentam índice de consistência (n) igual a 1.

Outros fluidos apresentam uma viscosidade aparente que diminui com o aumento da taxa de deformação como os pseudoplásticos. Aqueles



que apresentam um aumento da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação são chamados dilatantes (Elliott, 1976).

3.6.3. Viscosímetros

Para caracterização do comportamento reológico de um fluido é necessário a determinação da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação, num mesmo ponto de medição. Torna-se necessário obter várias medidas da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação, para adotar um modelo de comportamento reológico. Dentre os fatores que influem na escolha de um reômetro devem-se considerar (Rao & Anantheswaran, 1982, Pasquel, 1999):

- o material a ser ensaiado (tipo de fluido, sólido, semi-sólido);
- as propriedades a serem medidas (viscosas, elásticas, viscoelásticas);
- a finalidade da medição (pesquisa, controle de qualidade, caracterização reológica).

Durante a caracterização do comportamento reológico, comumente é feita uma distinção entre os métodos que fornecem uma informação simplesmente qualitativa e os que fornecem dados reológicos quantitativos dos produtos sob estudo. Por outro lado, quanto às características de construção e de funcionamento, a maioria dos viscosímetros para fluidos podem ser classificados em rotacionais e capilares ou tubulares (Van Wazer et al., 1963).

O Quadro 1 mostra os viscosímetros que podem ser utilizados para caracterização de diversos tipos de fluidos. Deste mesmo Quadro pode-se



observar que um único instrumento pode ser utilizado para a obtenção dos dados reológicos de fluídos com comportamentos distintos (Sherman, 1970).

As medidas reológicas padrão são obtidas em equipamentos cuja geometria produz um "fluxo cisalhante" simples (simple shear flow). Exemplos representativos desse escoamento ocorrem quando um fluido se move:

1. Em tubos e entre placas paralelas
2. Entre cilindros concêntricos, um dos quais em rotação
3. Entre cone e placa, o primeiro em rotação
4. Entre discos paralelos, um dos quais em rotação.

Quadro 1 - Características dos viscosímetros utilizados para determinação da reologia dos fluídos

Fluído	Viscosímetro
Newtoniano	capilares, rotacionais (cilindros concêntricos; cone e placa; cilindro girando em meio infinito), objetos descendentes (esferas e prego)
Não-newtoniano	capilares, rotacionais (cilindros concêntricos; cone e placa), objetos descendentes (esferas e prego)
Viscoelásticos	rotacionais (cilindros concêntricos)

Os polissacarídeos, de maneira geral, ao invés de formar soluções verdadeiras em presença de água, formam dispersões. Isso determina a existência de duas regiões de comportamento distinto em relação à concentração:

o domínio das soluções diluídas e o das soluções concentradas, onde as moléculas encontram-se entrelaçadas, fazendo com que a dispersão apresente comportamento viscoelástico (Launay et al., 1986). Neste último caso, os ensaios reológicos de cisalhamento constante não são suficientes para a completa caracterização do material, sendo necessários ensaios de cisalhamento oscilatório.

3.6.4. Viscosidade capilar:

A resistência dos fluidos ao escoamento é medida por sua viscosidade e o tipo mais comum de se medir a viscosidade é, simplesmente, medir o tempo necessário para que um dado volume de líquido escoe através de um tubo capilar, onde a razão entre o volume de um líquido através de um tubo capilar de raio r e comprimento L , em virtude de uma pressão P , pode ser dada pela Lei de Poiseuille (Van Holde, 1975).

$$\forall = \frac{v}{t} \quad (\text{equação 6})$$

$$\forall = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 L \mu} \quad (\text{equação 7})$$

De acordo com as equações 6 e 7, o cálculo da viscosidade específica obtêm-se diretamente dos tempos de escoamento.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento e caracterização das bactérias produtoras

4.1.1. Isolamento das bactérias

Cinco amostras de solo foram coletadas durante aproximadamente um ano, com intervalos de dois meses entre cada amostra, em locais pré-estabelecidos da Reserva Ecológica do Noroeste Paulista, situada em São José do Rio Preto - SP, procurando obter amostras de terra dos mais diferentes pontos, escolhidos aleatoriamente. Foram feitas diluições decimais, que foram plaqueadas em PCA (Plate Count Agar) e incubadas a 30°C por 24, 48, 72, 96, 120 horas. As colônias gomosas resultantes foram replaqueadas em placas de Petri contendo o meio PCA (nas mesmas condições).

4.1.2. Obtenção da cultura pura

O método utilizado para obtenção da cultura pura foi o de esgotamento em placa de Petri contendo meio PCA, como descrito por Muro & Luchi (1989). As colônias foram isoladas de acordo com suas características de forma, tamanho, cor, brilho, contorno, etc. Para avaliação da pureza foi feita a coloração de Gram onde foram observadas as características microscópicas das células isoladas.



4.1.3. Manutenção e propagação do microrganismo

Para manutenção e propagação, as culturas selecionadas foram semeadas em tubos inclinados de PCA, que foram incubados durante 24 horas a 30°C e depois mantidos na geladeira a 4°C. As bactérias selecionadas através da determinação da viscosidade em caldo de fermentação foram submetidas aos testes bioquímicos. Estas bactérias foram armazenadas sob camada de óleo mineral e utilizadas como culturas de estoque.

4.1.4. Identificação das bactérias

As bactérias foram identificadas através das características morfológicas e fisiológicas de acordo com Bergey's (1984). A identificação foi feita de acordo com as respostas individuais obtidas para os testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Cowan et al., 1974) e com base na chave de Skerman, que também propõe uma série de perguntas que podem ser respondidas de modo afirmativo ou negativo, após a determinação das características do microrganismo. A metodologia utilizada está descrita no ANEXO I.

4.2. Determinação da viscosidade em caldo de fermentação

A viscosidade do caldo de fermentação foi determinada medindo-se o tempo que este demora para fluir 4ml através de um capilar de vidro



de 0,8 cm de diâmetro e 25cm de comprimento à temperatura de 25°C. Foram utilizadas as bactérias de rápido crescimento que apresentaram colônias gomosas de maior diâmetro.

4.2.1. Correlação das medidas

A correlação das medidas foi realizada pela determinação da vazão volumétrica (equação 6) e estes dados foram, posteriormente, substituídos na equação de Poiseuille (equação 7) como indicado no item 3.6.4.

4.2.2. Caldo de fermentação ou meio quimicamente definido

O meio base empregado para a fermentação foi o proposto por Souw & Demain (1979) acrescido da fonte de carbono selecionada. O meio constou 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	0,02
HCl	0,15

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



4.3. Curva de crescimento celular

A curva de crescimento celular foi determinada utilizando-se um método espectrofotométrico. As bactérias foram inoculadas no caldo de fermentação adicionado de 2% de glicose e incubadas a 30°C e 210 rpm durante 24-48 h (de acordo com a velocidade de crescimento de cada bactéria) e durante este período foram feitas as leituras de densidade óptica a 520 nm, a cada uma hora.

4.4. Produção dos biopolímeros

4.4.1. Microrganismos

Para a produção dos polissacarídeos microbianos foram utilizadas as bactérias previamente selecionadas através dos testes bioquímicos e viscosidade específica.

4.4.2. Meios de produção

Os meios de produção foram obtidos pela adição de soluções esterilizadas das fontes de carbono ao meio quimicamente definido proposto por Souw & Demain (1979), previamente esterilizado, de modo a fornecer a



concentração desejada da fonte de carbono. As fontes de carbono testadas foram glicose e sacarose, nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5% (p/v).

4.4.3. Preparo do inóculo

A bactéria foi inoculada por esgotamento em tubos inclinados de PCA, e incubados por 24 h a 30°C. Após a incubação foi feita a suspensão da cultura pela adição de 10,0 ml de água destilada estéril. Esta suspensão de células foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de produção. A seguir, foram incubados a 30°C e 210 rpm durante 72 h. O caldo de fermentação foi centrifugado a 8000 rpm por 30 min para separação das células que foram utilizadas como inóculo, enquanto o sobrenadante foi descartado.

4.4.4. Produção

As diferentes formulações dos meios de produção foram inoculadas com cada suspensão de bactéria de modo a fornecer uma densidade óptica de 0,05 a 650 nm, medida em espectrofotômetro. Foram incubadas a 30°C, durante 72 h a 210 rpm.

4.4.5. Separação

Após a remoção das células por centrifugação a 8000 rpm por 30 min, os polissacarídeos foram separados do caldo de fermentação por



precipitação com três volumes de etanol. A seguir, a solução foi concentrada por evaporação a vácuo e a goma obtida colocada para secar em estufa, também a vácuo, a 45°C até atingir peso constante. Finalmente, foi calculado o rendimento (gramas do polissacarídeo por 100 gramas da fonte de carbono).

4.4.6. Determinação do crescimento celular

A determinação do crescimento celular foi feita através da determinação do peso seco das células obtidas durante a produção, as quais foram transferidas quantitativamente com água destilada para placas de Petri, procedendo-se também à secagem em estufa a vácuo a 45°C até peso constante.

4.4.7. Influência do pH sobre a produção do polissacarídeo

Para estudar a influência do pH sobre a produção de polissacarídeo foram utilizadas as concentrações das fontes de carbono (glicose e sacarose) onde as bactérias mostraram a melhor produção à 30°C. Os valores de pH estudados foram 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

4.4.8 Influência da temperatura sobre a produção do polissacarídeo

Para estudar a influência da temperatura sobre a produção de polissacarídeo foram utilizadas as concentrações das fontes de carbono (glicose e



sacarose) onde as bactérias mostraram a melhor produção a $\text{pH}=7,0$. As temperaturas estudadas foram 25, 30 e 35 °C.

4.5. Determinação do comportamento reológico do biopolímero produzido pela bactéria melhor produtora.

4.5.1. Preparo das amostras

A bactéria 4B foi inoculada no meio de fermentação sugerido por Souw & Demain (1979) na presença de glicose e sacarose, respectivamente, na concentração de 2,0 % e incubada num shaker rotatório durante 72 h a 30°C e 210 rpm (O pH foi ajustado a 7,0 antes da esterilização).

4.5.1.1. Influência do tempo de fermentação na reologia

Os ensaios reológicos para estudar a influência do tempo de fermentação foram realizados no caldo a 25°C para glicose e sacarose, respectivamente, após 24, 48 e 72 h de fermentação.



4.5.1.2. Influência da concentração de sais na reologia

Para estudar a influência das concentrações de sais foram utilizados NaCl, KCl e CaCl_2 nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 %. Estes sais foram dissolvidos no caldo de fermentação da bactéria 4B após 24, 48 e 72 h de incubação nos quais foram realizadas medidas reológicas.

4.5.2. Reômetro utilizado

Para os testes reológicos foi utilizado um reômetro marca Reotest 2.1 equipado com banho termostático e cilindros concêntricos como ilustrado na Foto 4 (pag 82). Este reômetro é rotacional e causa um cisalhamento no fluido localizado no ângulo formado por dois cilindros concêntricos, com o cilindro interno móvel.

O dispositivo de medição utilizado foi o S para medir viscosidades médias e o cilindro interno foi o S1, que tem dimensões: L (altura do cilindro interno) = 72,0 mm, Ri (raio interno do cilindro) = 19,6 mm e Re (raio do cilindro externo) = 20,0 mm. O volume utilizado para cada ensaio foi 25 ml.

Os cálculos foram realizados conforme as relações matemáticas apresentadas no item 3.6.2.

Além da determinação de tais parâmetros, foram construídas figuras de viscosidade aparente versus taxa de deformação e viscosidade aparente versus concentração de sais.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação das bactérias:

Os resultados das análises das cinco amostras de solo estudadas estão demonstrados nas Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15 (ANEXO II). Nestas Tabelas pode ser observado que foram isoladas 322 colônias de bactérias gomosas das quais, por sua vez, foram selecionadas 178 bactérias de rápido crescimento para a determinação da viscosidade do caldo de fermentação. Os resultados obtidos estão nas Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20 (ANEXO III) onde está representado o tempo (em segundos) de escoamento do caldo de fermentação medido após 24, 48, 72 e 96 horas, como indicado no item 3.6.4.

As medidas foram feitas até 96 horas para determinar o tempo ideal em que o caldo de fermentação atingiu sua máxima viscosidade, isto pode ser observado nas Figuras 9, 10, 11, 12 e 13 (ANEXO IV) que representam os resultados da viscosidade específica versus o tempo de incubação. Estes resultados foram correlacionados com o cálculo da vazão volumétrica (equação 6), cujo valor foi posteriormente substituído na equação Poiseuille (equação 7). Nesta mesma equação 7, todos os parâmetros foram mantidos constantes.

Das 178 bactérias estudadas apenas foram selecionadas 30 bactérias para os testes bioquímicos de acordo com os resultados da determinação da viscosidade. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e Diagrama 1.



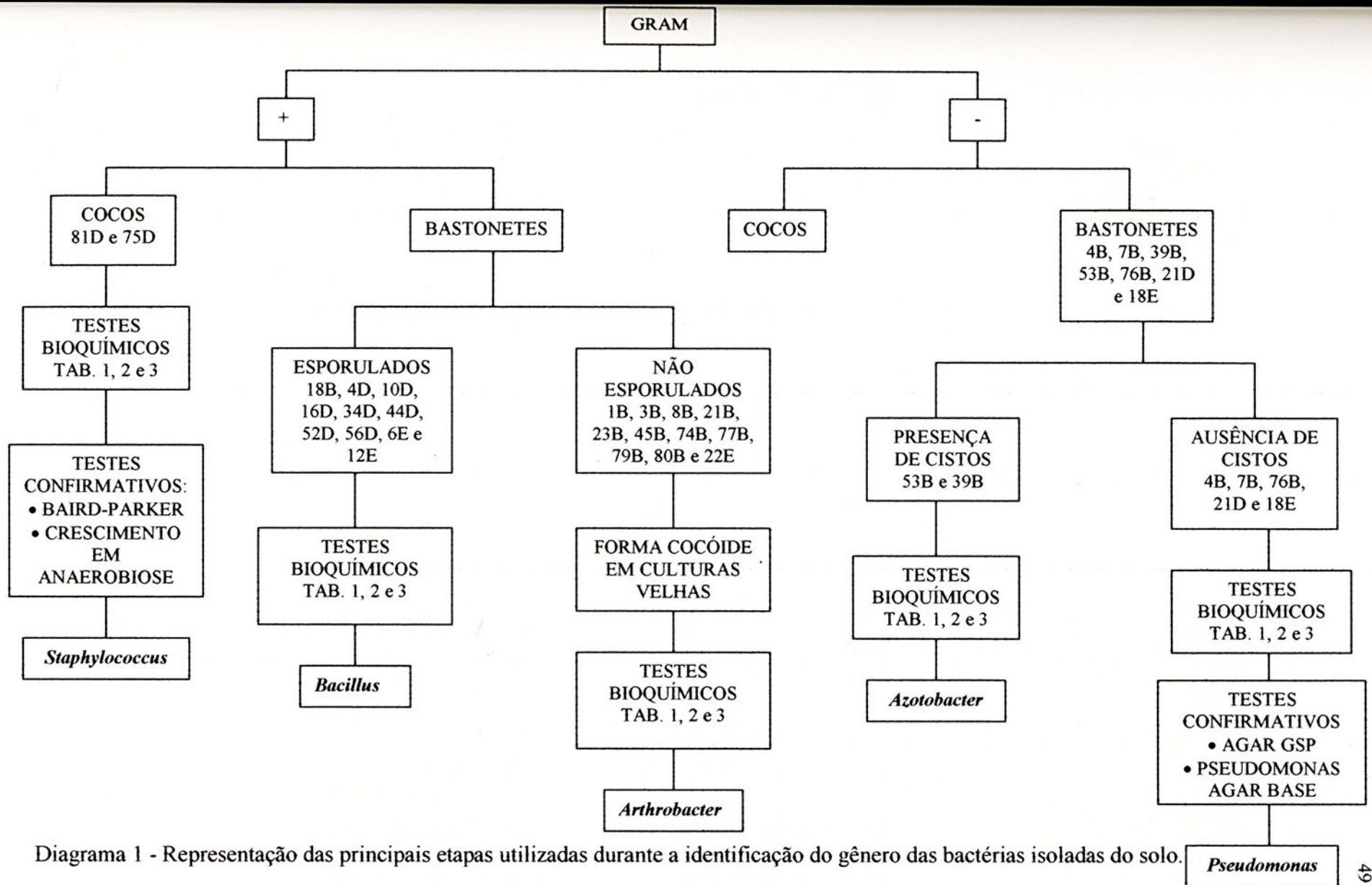
A análise dos resultados dos testes bioquímicos mostrou que os gêneros das bactérias isoladas que podem estar presentes são: *Azotobacter*; *Pseudomonas*; *Arthrobacter*; *Bacillus* e *Staphylococcus*.

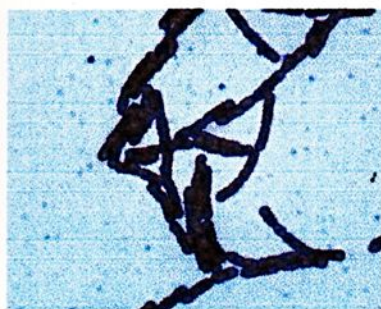
Todos os testes realizados são característicos para a determinação do gênero. Entretanto, estes mesmos testes poderão identificar, com certa aproximação, vários outros gêneros; pois a similaridade fenotípica de diferentes gêneros torna difícil a identificação de novos isolados e, desta forma, haverá maior ou menor probabilidade, indicada pela porcentagem, de ter os gêneros acima mencionados. Todas as bactérias acima identificadas possuem grande capacidade de produzir polissacarídeos, e estas são facilmente adaptáveis para a produção comercial, já que possuem a capacidade de crescer como cultura pura, em fermentações de larga escala e de produzir biopolímeros com alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais (Sutherland, 1990).

A cinética de crescimento foi realizada para as 30 bactérias identificadas, visando a observação do tempo em que as células atingem máximo crescimento. Os resultados estão apresentados pelas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18 (ANEXO V).

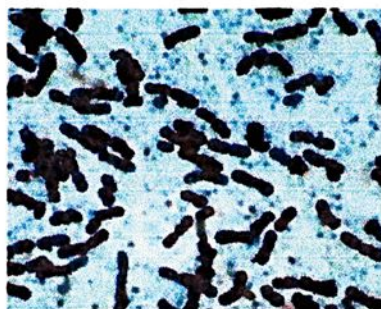
A partir da observação das Figuras de viscosidade aparente, foram selecionadas 6 bactérias para a determinação dos parâmetros ótimos de produção de polissacarídeos, pois estas foram consideradas capazes de deixarem o caldo de fermentação altamente viscoso em curto espaço de tempo.



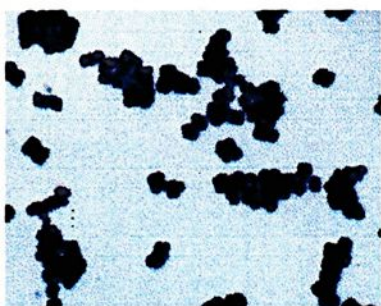




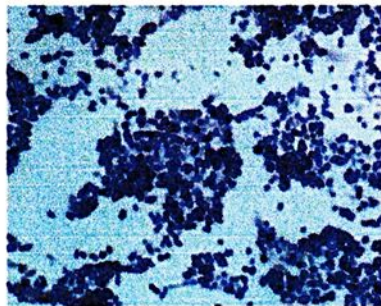
a



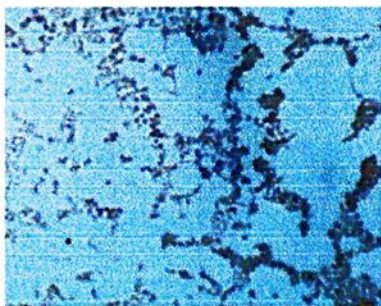
b



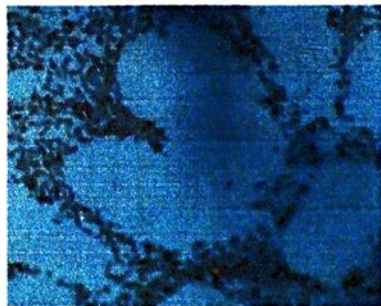
c



d



e



f

- Coloração de Gram e de esporos das bactérias identificadas: *Bacillus* (a), esporos dos *Bacillus* (b), *Staphylococcus* (c), *Arthrobacter* (d), *Azotobacter* (e), *Pseudomonas* (f). Aumento: 1.100 vezes

Tabela 11 - Características bioquímicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C

Bactérias	Gram	Esporos	LIA	TSIA	Citrato	Motilidade	Nitrato	Indol	VP	VM
1B	+	-	+	B: Amarela S: Vermelha	-	-	-	-	-	-
3B	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
4B	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
7B	-	-	+	-*	-	-	+	-	-	-
8B	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
18B	+	+	-	B: Amarela S: Vermelha	-	-	+	-	-	-
21B	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
23B	+	-	+	B: Amarela S: Vermelha	-	+	-	-	-	-
39B	-	-	+	-*	-	-	+	-	-	-
45B	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
53B	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
74B	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
76B	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
77B	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
79B	+	-	+	-*	+	-	+	-	-	-
80B	+	-	+	B: Amarela S: Vermelha	+	-	+	-	-	-
4D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10D	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-



Tabela 11 - Características bioquímicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C

(continuação)

Bactérias	Gram	Esporos	LIA	TSIA	Citrato	Motilidade	Nitrato	Indol	VP	VM
16D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
21D	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
34D	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
44D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
52D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
56D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
75D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
81D	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6E	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
12E	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
18E	-	-	+	-*	+	+	-	-	-	-
22E	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-

B = base

S = superfície

LIA = Ágar-Lisina-Ferro

TSIA= Ágar-Ferro-Três açúcares

VM = Vermelho de metila

VP =Voges-Proskauer

* alcalinizou o meio



Tabela 12 - Características bioquímicas das bactérias (isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C) em vermelho de fenol adicionado da fonte de carbono correspondente

Bactérias	Glicose	Manitol	Maltose	Sacarose	Lactose
1B	+	+	-	+	-
3B	-	_*	-	-	_*
4B	+	_*	_*	_*	_*
7B	+	_*	+	+	_*
8B	-	_*	-	-	-
18B	+	_*	+	_*	_*
21B	+	_*	+	+	_*
23B	+	_*	+	+	-
39B	+	_*	+	+	_*
45B	+	_*	+	-	_*
53B	+	_*	+	+	_*
74B	+	_*	+	-	_*
76B	+	_*	+	_*	_*
77B	+	_*	+	+	_*
79B	+	_*	+	_*	_*
80B	+	_*	+	+	_*
4D	+	_*	+	+	-
10D	+	+	+	+	-
16D	+	+	+	+	-
21D	+	_*	_*	_*	_*
34D	+	+	+	+	-



Tabela 12 - Características bioquímicas das bactérias (isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C) em vermelho de fenol adicionado da fonte de carbono correspondente

(continuação)

Bactérias	Glicose	Manitol	Maltose	Sacarose	Lactose
44D	+	+	+	+	-
52D	+	+	+	+	-
56D	+	+	+	+	-
75D	-	-	-	-	-
81D	-	-	-	-	-
6E	+	+	+	+	+
12E	+	-	-	-	-
18E	-*	-*	-*	-*	-*
22E	+	-	-	-	-

* alcalinizou o meio



Tabela 13 - Determinação da atividade enzimática das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C

Bactérias	Gelatinase	Protease	Lecitinase	Amilase	Catalase	Urease	Oxidase
1B	-	-	+	-	+	-	-
3B	-	-	+	+	+	+	-
4B	-	-	-	-	+	+	-
7B	-	-	-	+	+	+	-
8B	-	-	-	+	+	+	-
18B	+	-	-	+	+	+	-
21B	-	-	-	+	+	+	-
23B	-	-	-	-	+	-	-
39B	-	-	-	-	+	+	+
45B	-	-	-	-	+	+	-
53B	-	-	-	-	+	+	+
74B	-	-	-	+	+	-	-
76B	-	-	-	+	+	-	+
77B	-	-	-	+	+	-	-
79B	-	-	+	-	+	+	-
80B	+	-	+	+	+	+	-
4D	+	+	+	+	+	+	-
10D	-	+	+	+	+	+	-
16D	-	+	+	+	+	+	-
21D	-	-	+	-	+	+	+



Tabela 13 - Determinação da atividade enzimática das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de isolamento e incubação a 30°C

(continuação)

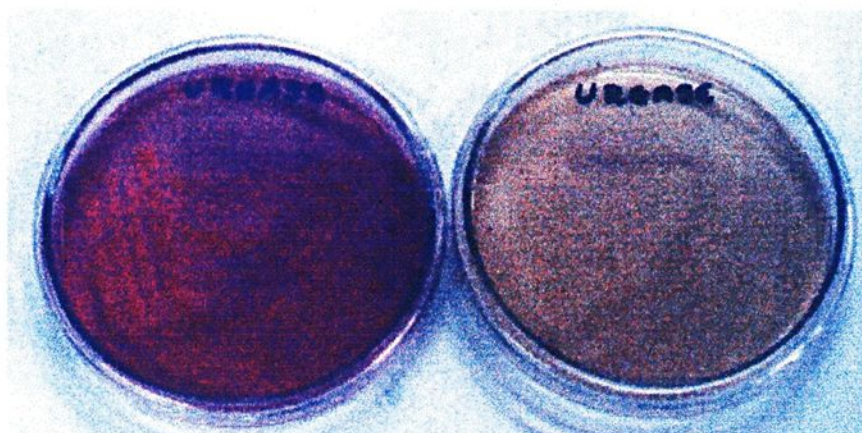
Bactérias	Gelatinase	Protease	Lecitinase	Aamilase	Catalase	Urease	Oxidase
34D	+	+	+	+	+	+	-
44D	+	+	+	+	+	+	-
52D	+	+	+	+	+	+	-
56D	+	+	+	+	+	+	-
750D	-	+	-	-	+	+	-
81D	-	+	-	-	+	+	-
6E	-	-	-	-	+	-	-
12E	-	-	-	+	+	-	-
18E	-	-	+	+	+	-	+
22E	-	-	-	-	+	-	-



a



b



c

Figura 2 - Exemplos de alguns dos testes bioquímicos utilizados: TSIA (a), amarelo (+) e vermelho (-); Citrato (b), azul (+) e verde (-); Urease (c), rosa (+) e amarelo (-)

4.2. Produção de Polissacarídeos

Foram selecionadas 6 bactérias produtoras e identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* (4B, 7B, 18E, 21D) e *Arthrobacter* (3B e 21B). As etapas seguidas para a identificação estão resumidas no Diagrama 1.

A Figura 1 mostra os resultados de viscosidade específica dos caldos fermentados pelas bactérias selecionadas. Nesta pode-se observar que a máxima viscosidade dos meios, para as 6 bactérias escolhidas, foi obtida em até 72 h (7B, 3B e 21D). Entretanto, os meios de cultura das bactérias 21B e 18E apresentaram máxima viscosidade em 48 h com uma posterior diminuição. Já a bactéria 4B apresenta uma viscosidade específica alta em 20 horas a qual permanece praticamente constante até 72h. Em geral, foi observado que, com um maior tempo de incubação (96 horas) a viscosidade diminui para todas as bactérias estudadas.

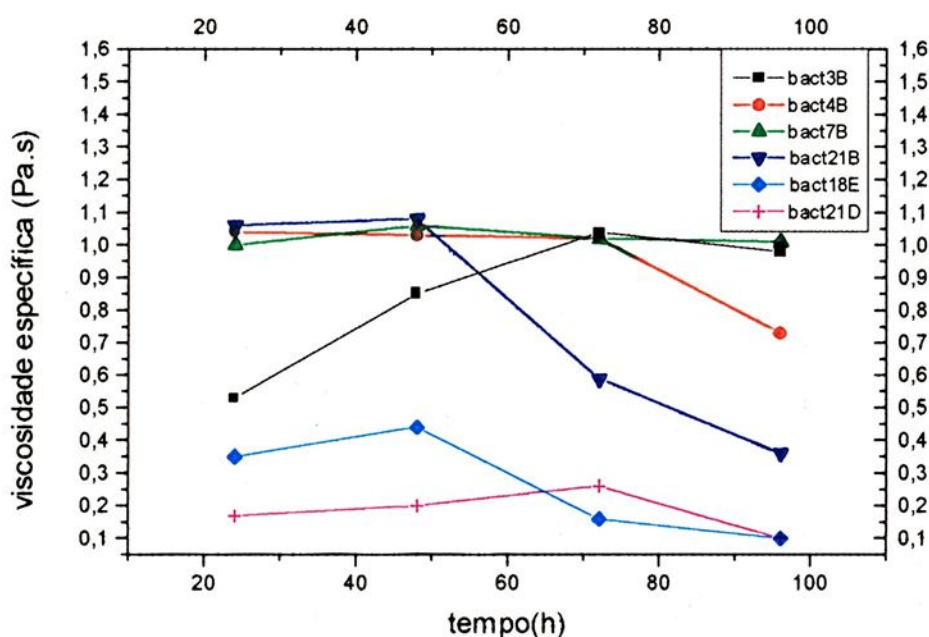


Figura 1 - Viscosidade específica dos meios fermentados pelas bactérias produtoras de polissacarídeos, determinada a cada 24h durante 96 h a 30°C e 210 rpm.

A Figura 2 mostra a curva de crescimento para as bactérias acima mencionadas. Nesta pode-se observar que todas as bactérias têm seu máximo crescimento em 12 h e se permaneceu constante até 72 h, exceto 18E e 21D que atingem este mesmo entre 8-9 h. A curva de crescimento foi realizada para determinar o tempo em que as células atingem máximo crescimento, e com isto, saber o tempo máximo de incubação necessário para a produção dos polissacarídeos. Estudos realizados por Rajeshwari et al. (1995) para goma xantana, mostraram que a produção da goma ocorre após a fase logarítmica de crescimento, ou seja na fase estacionária.

Durante a determinação da curva de crescimento foi utilizada glicose na concentração 2%.

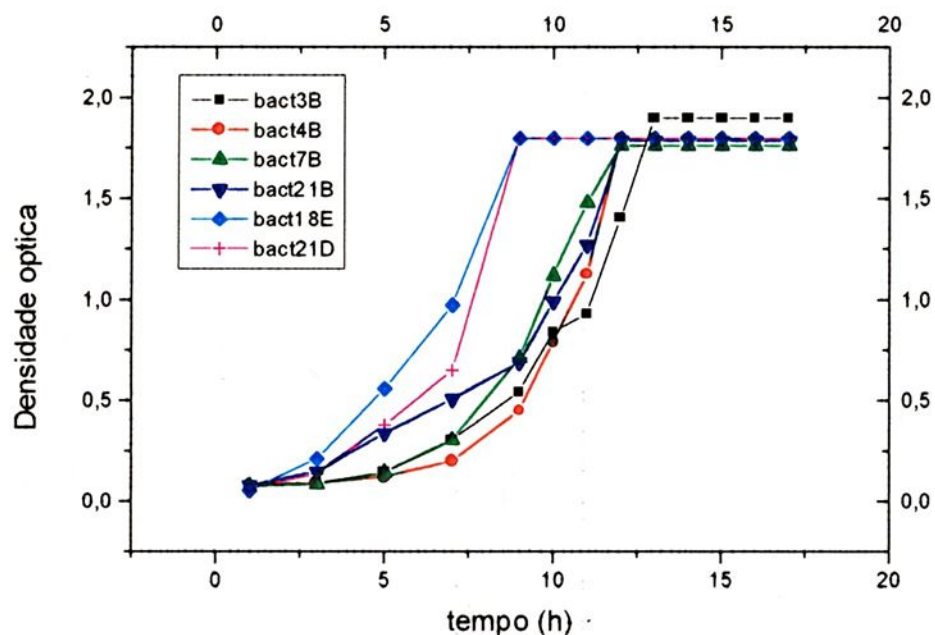


Figura 2 - Crescimento celular das bactérias produtoras de polissacarídeos determinado a 520 nm, durante 24 h a 30°C e 210 rpm.

Muitos polissacarídeos bacterianos são produzidos seguindo um processo de fermentação descontínua utilizando diferentes açúcares como fontes de carbono (Vandamme et al, 1996). e a produtividade destes pode ser afetada pelas condições culturais, pela composição do meio de cultura, temperatura, pH e aeração (Kawai, 1992).

A glicose foi usada como a fonte de carbono tradicional para a produção de polissacarídeos por bactérias (Williams & Wimpenny, 1977; Rajeshwari et al., 1995; Roseiro et al., 1992; Kang et al., 1982), Neste trabalho

estudou-se a possibilidade de substituí-la pela sacarose, pelo fato desta ser mais barata e abundante no mercado nacional. Aliado a isto, alguns estudos conduzidos por diversos pesquisadores utilizando os mais variados tipos de microrganismos têm mostrado que a sacarose pode ser um bom substrato para a produção de polissacarídeos (Ashtaputre & Shah, 1995; Souw & Demain, 1979; Williams & Wimpenny, 1977). Para isto, foram determinadas as condições de produção dos polissacarídeos pelas bactérias denominadas 3B, 4B, 7B, 21B, 18E e 21D e identificadas como pertencentes ao gêneros *Arthrobacter* e *Pseudomonas*, e os resultados estão nas Figuras 3, 4 e 5.

Na Figura 3 pode ser observado que na medida em que aumenta a concentração das fontes de carbono, a produção do polissacarídeo diminui. Em geral este comportamento tem sido observado por vários pesquisadores (Williams & Wimpenny, 1977; Sown & Demain, 1979; Rajeshwari et al., 1995; Kang et al., 1982; Kawai et al., 1995) durante a produção de polissacarídeos utilizando os mais variados tipos de bactérias. As fontes de carbono testadas foram glicose e sacarose e pode-se observar que apresentaram um comportamento similar (Figura 3). As menores concentrações levaram aos maiores rendimentos.

A concentração de glicose, na qual foi observado o maior rendimento do polissacarídeo foi 2%. Entretanto, as bactérias 3B, 18E e 21D tiveram maiores rendimentos na concentração de 1%. Em concentrações maiores o rendimento diminuiu drasticamente.

A concentração de sacarose que produziu o maior rendimento foi de 2%, exceto para 21B e 18E, onde o maior rendimento foi na concentração



de 1%. A bactéria 18E apresentou o mesmo comportamento para as duas fontes de carbono (Figura 3).

Com relação às fontes de carbono testadas, pode-se observar que as bactérias proporcionaram resultados similares utilizando glicose ou sacarose. Este mesmo comportamento foi observado por Souw & Demain (1979) durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*. Portanto, durante a produção de polissacarídeos, a glicose pode ser substituída pela sacarose, apresentando a vantagem de ser mais barata.

A Tabela 4 mostra o efeito das diferentes concentrações de glicose e sacarose sobre o crescimento celular. Nesta, observa-se que cada bactéria teve um comportamento diferenciado, mostrando que o crescimento pode ser diretamente afetado pela fonte carbono utilizada, bem como, pela sua concentração (3B).



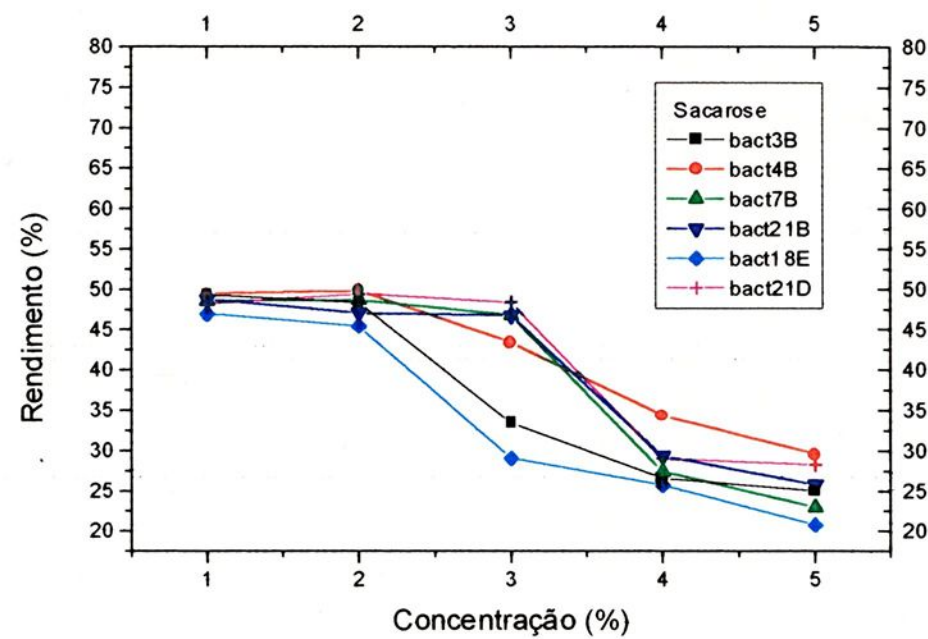
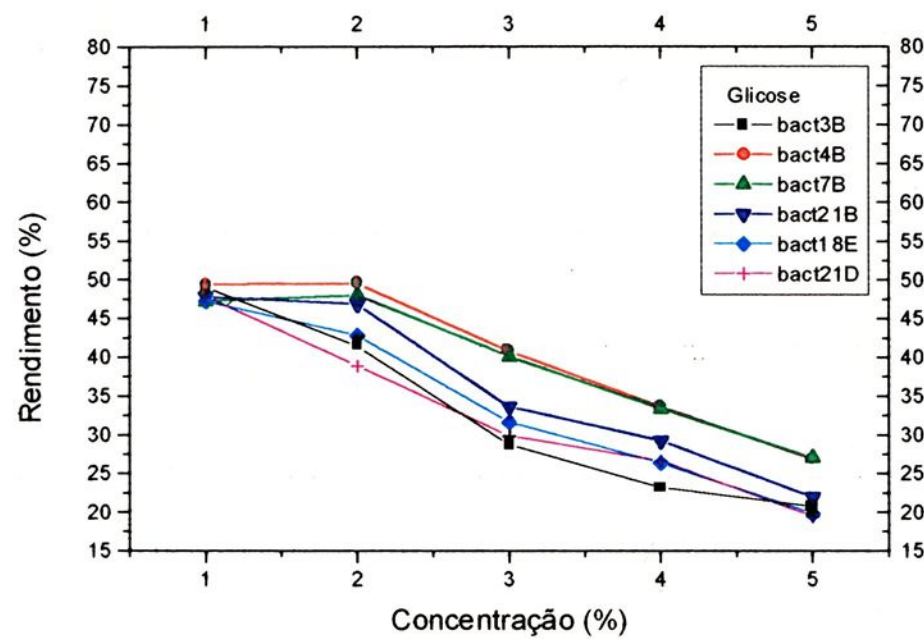


Figura 3 - Produção de polissacarídeos pelas 6 bactérias isoladas do solo utilizando diferentes concentrações das fontes de carbono a 30°C e pH=7,0.

Tabela 4 - Crescimento celular (peso celular seco em 50 ml de meio de cultura) das 6 bactérias produtoras de polissacarídeos isoladas do solo utilizando diferentes concentrações das fontes de carbono a 30°C e pH=7,0

Bactérias	3B	4B	7B	21B	21D	18E
Fonte de Carbono (%)	Peso celular		Seco (g)			
Glicose						
1	0,7658	0,5275	0,5015	0,5935	0,6342	0,6234
2	0,7439	0,5291	0,4919	0,5853	0,6221	0,6220
3	0,6850	0,5255	0,4912	0,5681	0,6204	0,6215
4	0,6758	0,5284	0,4900	0,5666	0,6015	0,6210
5	0,6248	0,5192	0,4860	0,5565	0,6045	0,6205
Sacarose						
1	0,6072	0,5331	0,4956	0,5893	0,5362	0,6435
2	0,5284	0,5321	0,4990	0,5653	0,5284	0,6390
3	0,5261	0,5364	0,4982	0,5546	0,5261	0,6394
4	0,5204	0,5320	0,4972	0,5607	0,5104	0,6253
5	0,5255	0,5307	0,4575	0,5660	0,5155	0,6224

Para estudar o efeito do pH e da temperatura durante a produção de polissacarídeos foi escolhida a melhor concentração de glicose e sacarose onde as bactérias mostraram a melhor produção, ou seja, 1% de glicose para 3B, 18E e 21D, 2% de glicose para 4B, 7B e 21B, 1% de sacarose para 21B e 18E e 2% de sacarose para 3B, 4B, 7B e 21D.

A Figura 4 mostra o efeito do pH sobre a produção de polissacarídeos pelas bactérias utilizadas. Pode-se observar que na medida em que aumenta o pH do caldo de fermentação (de 5,0 até 7,0) ocorre um aumento da produção do polissacarídeo. Entretanto, valores maiores (pH=8,0) promovem uma

diminuição na produção do polissacarídeo. Este resultado sugere que o produto pode ser um polissacarídeo ácido ou que foram formados alguns ácidos orgânicos durante a síntese do polissacarídeo pela bactéria e por esta razão o pH do meio fica mais ácido a medida que o polissacarídeo é produzido. Este mesmo tipo de comportamento foi observado por Kawai et al. (1992) quando estudaram a produção de um novo polissacarídeo extracelular utilizando uma bactéria isolada do solo e que foi identificada como *Bacillus*.

A Tabela 5 mostra o peso celular seco. Nesta observa-se que o crescimento é diretamente afetado pelo pH utilizado. Em geral, no pH=7, houve maior crescimento celular e na medida que o pH se afasta deste valor o crescimento diminui.



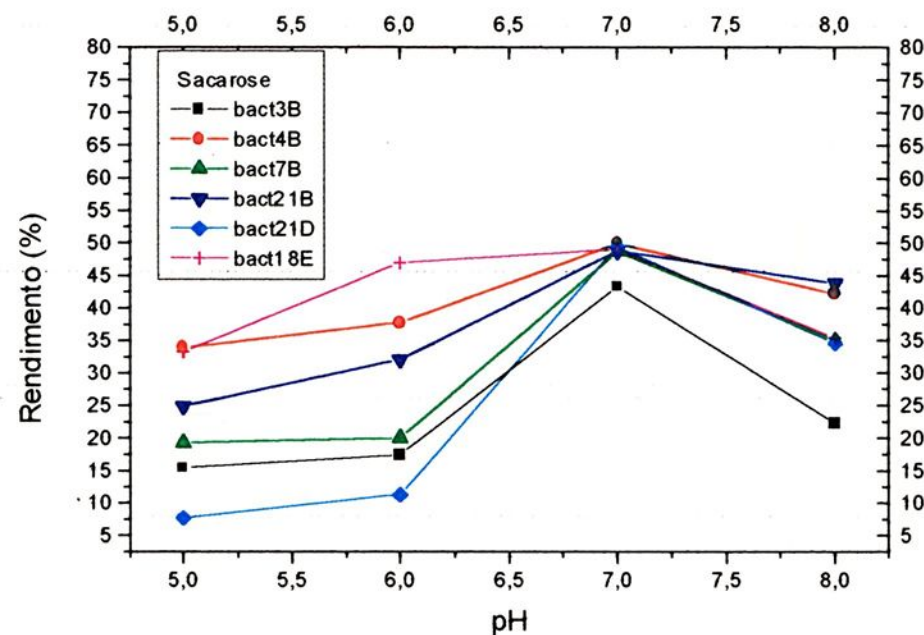
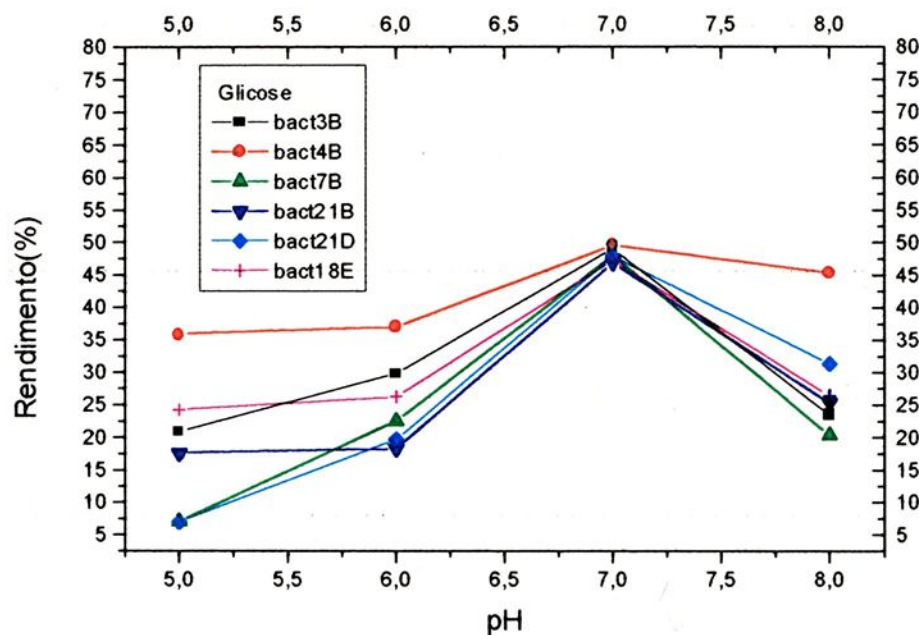


Figura 4 - Influência do pH na produção de polissacarídeos pelas 6 bactérias isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a 30°C e 210 rpm.

Tabela 5 - Crescimento celular (peso celular seco em 50 ml de meio de cultura) das 6 bactérias produtoras de polissacarídeos isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a 30°C em diferentes valores de pH

Bactérias	3B	4B	7B	21B	21D	18E
Glicose (%)	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
pH	Peso Celular (g)			Seco		
5	0,0299	0,0516	0,0348	0,0212	0,1021	0,1049
6	0,1599	0,1723	0,0443	0,0373	0,1189	0,1334
7	0,6658	0,6291	0,4919	0,5653	0,5842	0,6234
8	0,1825	0,2217	0,0834	0,0566	0,1178	0,1434
Sacarose (%)	2,0	2,0	2,0	1,0	2,0	1,0
pH	Peso Celular (g)			Seco		
5	0,0246	0,0514	0,0308	0,0131	0,0405	0,0839
6	0,1511	0,1470	0,0982	0,0315	0,0656	0,0992
7	0,6658	0,6321	0,4890	0,5393	0,5284	0,6235
8	0,3901	0,1585	0,1135	0,0812	0,0340	0,1526

A Figura 5 e a Tabela 6 mostram o efeito de diferentes temperaturas de incubação para a produção de polissacarídeos e seu efeito sobre o crescimento celular nas bactérias utilizadas. Como pode ser observado a temperatura ótima foi 30°C e temperaturas maiores ou menores do que esta, tiveram um efeito negativo em ambos parâmetros, mostrando assim, que a temperatura de incubação do meio de cultura é um fator importante a ser controlado para uma produção estável do polissacarídeo.



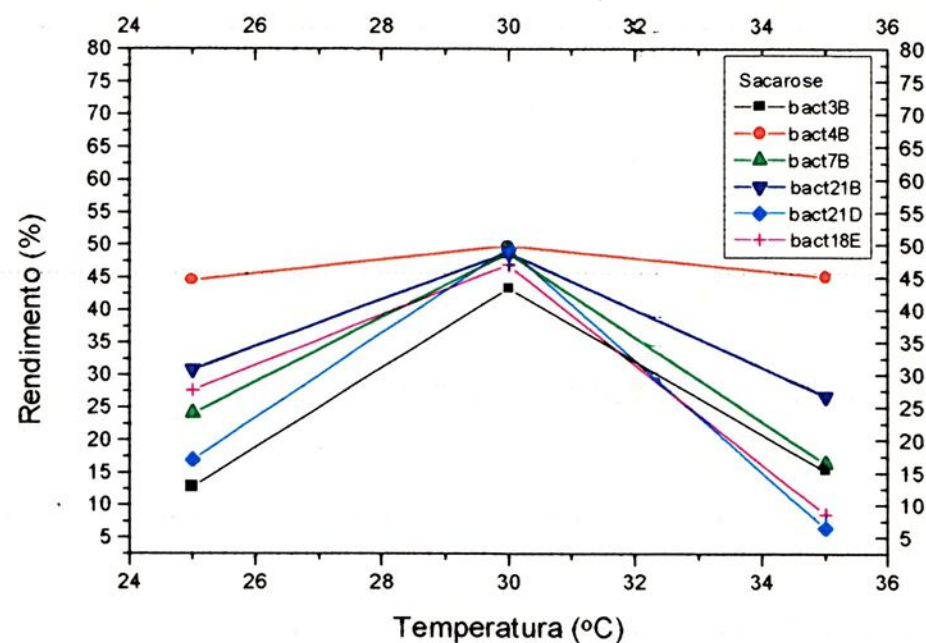
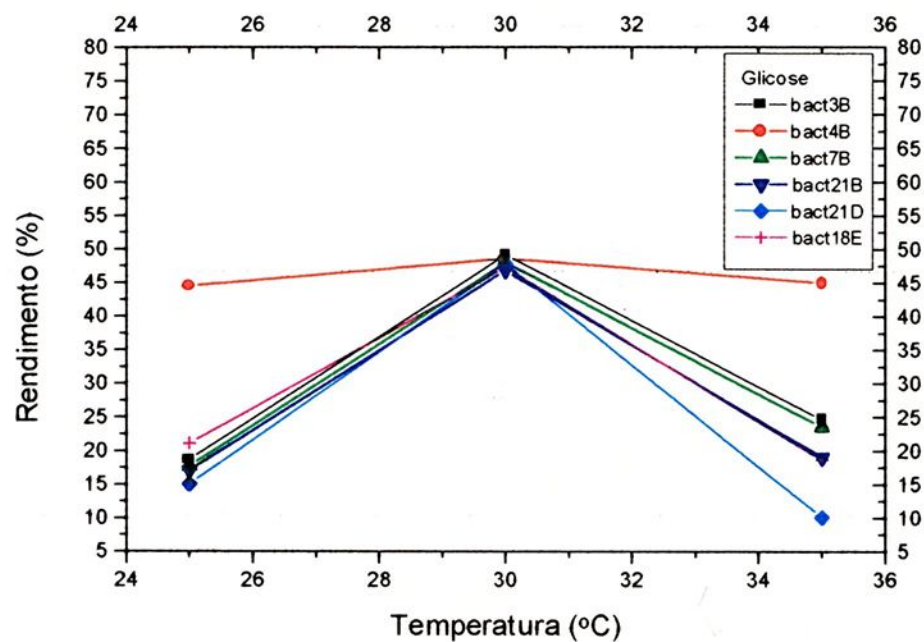


Figura 5 - Influência da temperatura na produção de polissacarídeos pelas 6 bactérias isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a pH =7 e 210 rpm.

Tabela 6 - Crescimento celular (peso celular seco em 50 ml de meio de cultura) das 6 bactérias produtoras de polissacarídeos isoladas do solo utilizando concentrações ótimas das fontes de carbono a pH=7,0 em diferentes temperaturas

Bactérias	3B	4B	7B	21B	21D	18E
Glicose (%)	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Temperatura (°C)	Peso		Celular (g)	Seco		
25	0,2360	0,5185	0,0213	0,0358	0,1286	0,1820
30	0,6058	0,6291	0,4819	0,5653	0,5842	0,6234
35	0,1080	0,5010	0,0480	0,0238	0,1145	0,1497
Sacarose (%)	2,0	2,0	2,0	1,0	2,0	1,0
Temperatura (°C)	Peso		Celular (g)	Seco		
25	0,2757	0,5205	0,0372	0,0474	0,0605	0,1593
30	0,6072	0,6321	0,4890	0,5393	0,5284	0,6235
35	0,1185	0,5183	0,0450	0,0283	0,0345	0,1731

Após a determinação das melhores condições de produção, foi realizado a determinação do pH final após a fermentação e os resultados estão apresentados na Tabela 7. Com relação ao pH final (Tabela 7) dos meios de fermentação contendo as respectivas bactérias, pode-se observar que a maioria apresentaram pH ácido mostrando que o polissacarídeo produzido no meio é provavelmente ácido ou foram formados alguns ácidos orgânicos e as bactérias 21D e 18E são provavelmente polissacarídeos neutros.

Tabela 7 - pH final do caldo de fermentação após produção dos polissacarídeos
durante 72 horas à 30°C e 210 rpm

pH final		
Bactérias	Glicose	Sacarose
3B	5,45	4,75
4B	5,47	5,52
7B	5,48	5,46
21B	6,90	5,00
21D	7,08	7,53
18E	7,05	6,88

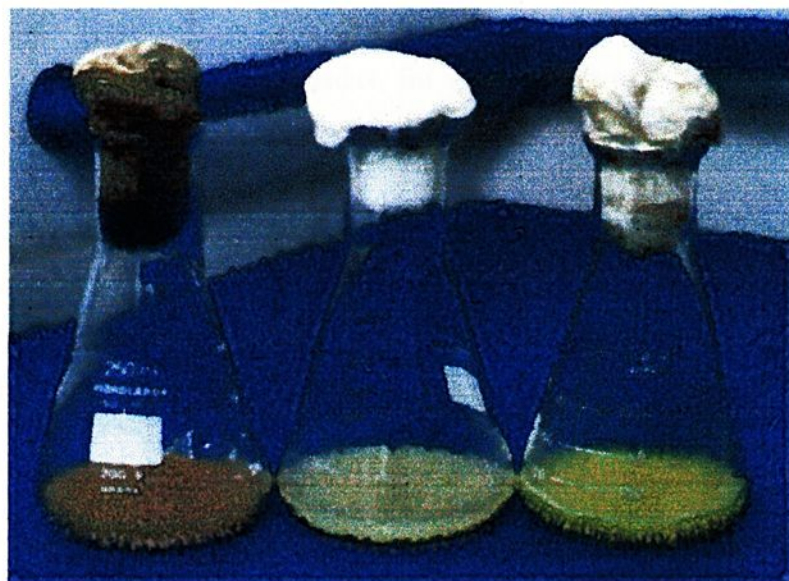
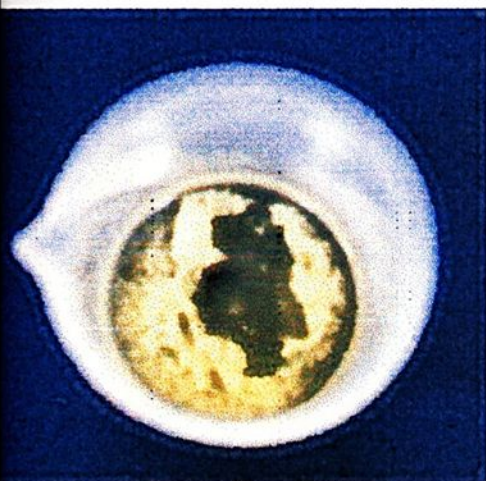
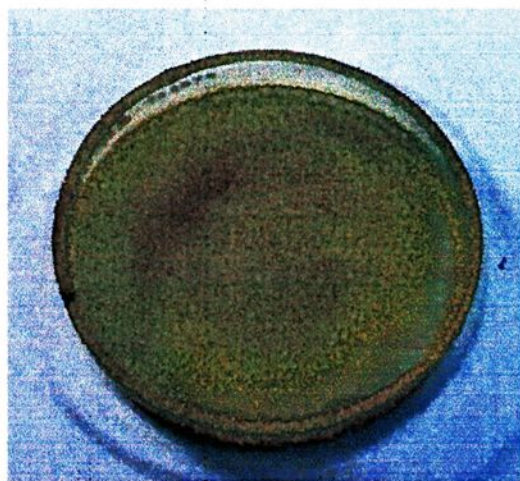
**a₁****a₂****a₃****b****c**

Foto 3 - Etapas da produção dos polissacarídeos: meio de fermentação após 72h de incubação (a_1 = 21D, a_2 = 21B e a_3 = 4B); polissacarídeo precipitado com etanol (b); células secas (c)

4.3. Estudos Reológicos

Das bactérias estudadas, foi selecionado o microrganismo 4B para a realização dos testes reológicos. Estes testes foram realizados diretamente no caldo de fermentação.

Alguns estudos em reologia de caldos de fermentação foram realizados, embora eles sejam relativamente poucos, o comportamento reológico dos caldos de fermentação depende muitas vezes do tipo de microrganismo que foi cultivado e sua morfologia, bem como do produto celular excretado no meio de fermentação (Landon et al., 1993).

Em geral, os caldos de fermentação apresentam comportamento não-newtoniano e pseudoplasticidade durante a produção de polímeros em grandes quantidades por microrganismos que não formam micélio. Entretanto o comportamento reológico foi geralmente atribuído ao aumento da concentração do polímero, o qual aumenta a viscosidade do meio, e pouca ou nenhuma à contribuição celular (Pace & Righelato, 1981). Em estudos conduzidos por Charles (1978) com meio de cultivo utilizado para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*, foi demonstrado que a separação das células por meio de filtração do caldo de fermentação produziu somente um pequeno decréscimo na viscosidade do caldo. No entanto, foi observado que, quando os microrganismos envolvidos possuem tricoma, como por exemplo *Cyanospira capsulata*, a contribuição da morfologia nas propriedades do fluido são significativas (Philippis et al., 1991).



Neste trabalho, nos ensaios realizados em laboratório foi utilizado o caldo de fermentação sem a separação das células, onde a contribuição celular para o comportamento reológico foi considerada desprezível, uma vez que, nos estudos conduzidos por Charles (1978), durante a produção da goma xantana por *Xanthomonas campestris*, comprovaram que a forma de bastão não contribui consideravelmente. Neste experimento, a bactéria utilizada também apresenta forma de bastão.

Foi determinada a viscosidade aparente do polissacarídeo produzido pela bactéria 4B e foi observada a dependência dos parâmetros reológicos no caldo de fermentação em função do tempo de incubação e presença de sais.

Os dados experimentais foram analisados utilizando a Lei da Potência pela sua simplicidade e aplicabilidade para uma grande variedade de fluidos e ampla utilização em cálculos de engenharia (Kriger & Elrod, 1953).

A Figura 6 mostra o efeito da tensão de cisalhamento, a qual foi calculada através da equação 4, sobre a velocidade angular a temperatura de 25°C na presença das respectivas fontes de carbono. Nesta Figura pode-se observar a não linearidade dos pontos, portanto, o fluido (caldo de fermentação) é não-newtoniano e pseudoplástico devido a concavidade da curva, possuindo um valor de $n < 1$.

Foi aplicada uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados de $\ln$ de tensão de cisalhamento (τ) versus $\ln$ da velocidade angular (ω) para encontrar o valor do índice de comportamento do fluido (n), dos caldos



de fermentação contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 24, 48, e 72h de fermentação. O valor do índice de comportamento do fluido (n) foi utilizado para o cálculo da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) através da equação 5.

Foram realizadas regressões entre $\ln$ da tensão de cisalhamento versus $\ln$ da taxa de deformação, de onde foram obtidos os índices de consistência (k) e os mesmos índices de comportamento do fluido (n) para os caldos contendo glicose e sacarose em 24, 48 e 72 h de fermentação. Os valores de n e k estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros reológicos do caldo de fermentação da bactéria 4B isolada de amostras de solo, em relação ao tempo de incubação num shaker rotatório a 30°C e 210 rpm, medidos em reômetro de cilindros concêntricos a 25°C

Glicose	n	k
24h	0,94	0,009
48h	0,90	0,012
72h	0,73	0,050
Sacarose	n	k
24h	0,79	0,026
48h	0,75	0,037
72h	0,74	0,044

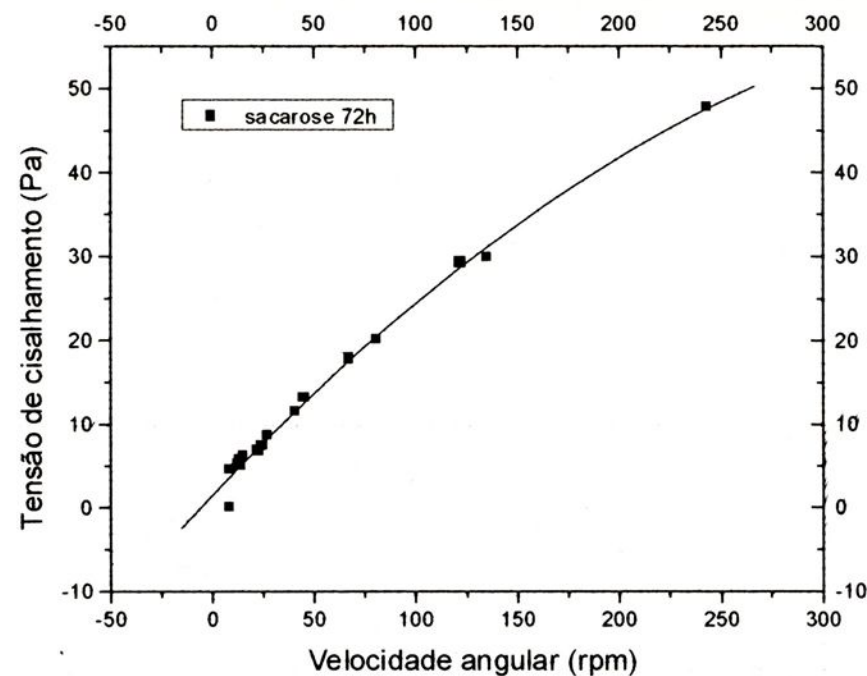
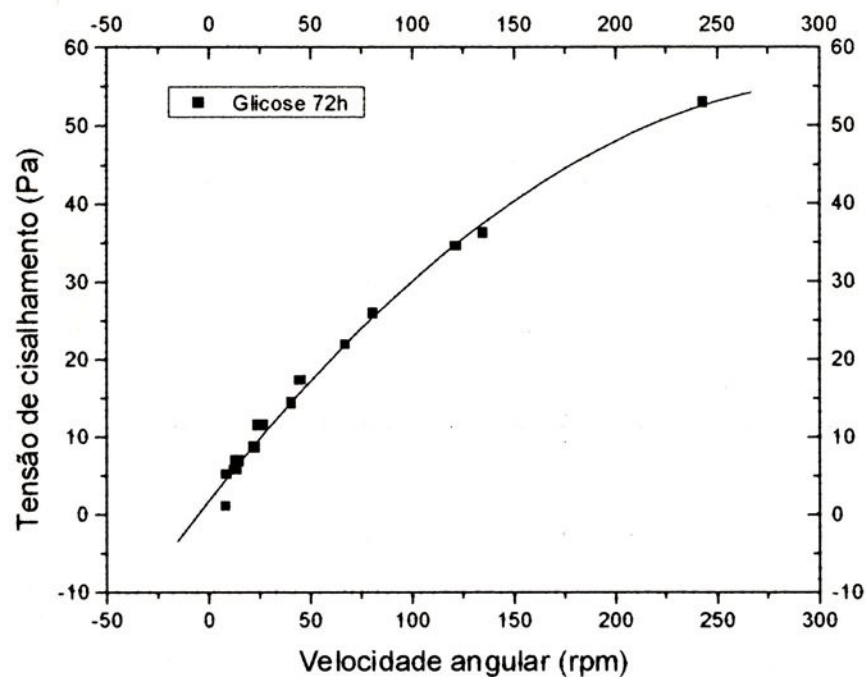


Figura 6 - Efeito da tensão de cisalhamento sobre a velocidade angular a 25°C no meio de cultura contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 72h de fermentação.

Os caldos de fermentação apresentaram-se mais viscosos em 72 horas de fermentação, como demonstrado pela Figura 7 referente a correlação entre viscosidade aparente (η_a) versus taxa de deformação ($\dot{\gamma}$). Os parâmetros reológicos n e k não permanecem os mesmos durante toda a fermentação (Tabela 8); pode-se observar também que quanto maior o valor de k mais espesso e portanto mais viscoso é o fluido, em consequência disto, maior a viscosidade aparente e maior sua pseudo-plasticidade (Figura 7). Em relação ao n , este é inversamente proporcional (Tabela 8). Este mesmo comportamento foi observado por Veljkovic et al. (1988) em um estudo conduzido com *Leuconostoc mesenteroides* o qual mostrou que a reologia do caldo muda drasticamente com o tempo, tornando-se mais viscoso e não-newtoniano durante o final do crescimento celular.

Em relação às fontes de carbono utilizadas observa-se que a sacarose produziu fluidos mais viscosos entre 24 e 48 horas, do que a glicose. Entretanto a glicose apresentou uma maior viscosidade após 72 horas de fermentação (Figura 7 e Tabela 8).

Foi estudado o efeito da presença de sais NaCl, KCl e CaCl₂ no caldo de fermentação em 72 horas de incubação para meios contendo sacarose e glicose como fontes de carbono e os resultados estão apresentados na Figura 8 e Tabelas 9 e 10, as concentrações utilizadas foram 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0%. O efeito dos sais é um parâmetro muito importante em alimentos, uma vez que, sua presença aumenta a resistência da goma à degradação provocada pelo aquecimento. Esta propriedade torna o uso de polissacarídeos em alimentos



processados muito atrativa, já que estes produtos, normalmente contém sais em quantidades consideráveis, proporcionando uma excelente estabilidade independente ao calor (Rocks, 1971).

A Figura 8 mostra a viscosidade aparente versus concentração de sais (NaCl, KCl e CaCl_2) para os caldos contendo sacarose e glicose como fonte de carbono, adicionados destes sais. Como observado, nesta mesma Figura, o CaCl_2 possui uma maior influência sobre a viscosidade dos caldos de fermentação em relação aos outros sais. Segundo Tako & Nakamura, 1987, isto pode ser devido a que o cálcio (Ca^{2+}) é um cátion bivalente e pode se ligar a mais de uma cadeia do polissacarídeo promovendo o entrecruzamento entre as cadeias, não ocorrendo o mesmo com o Na^+ e o K^+ , os quais são monovalentes e somente ionizariam o polissacarídeo promovendo interações eletrostáticas.



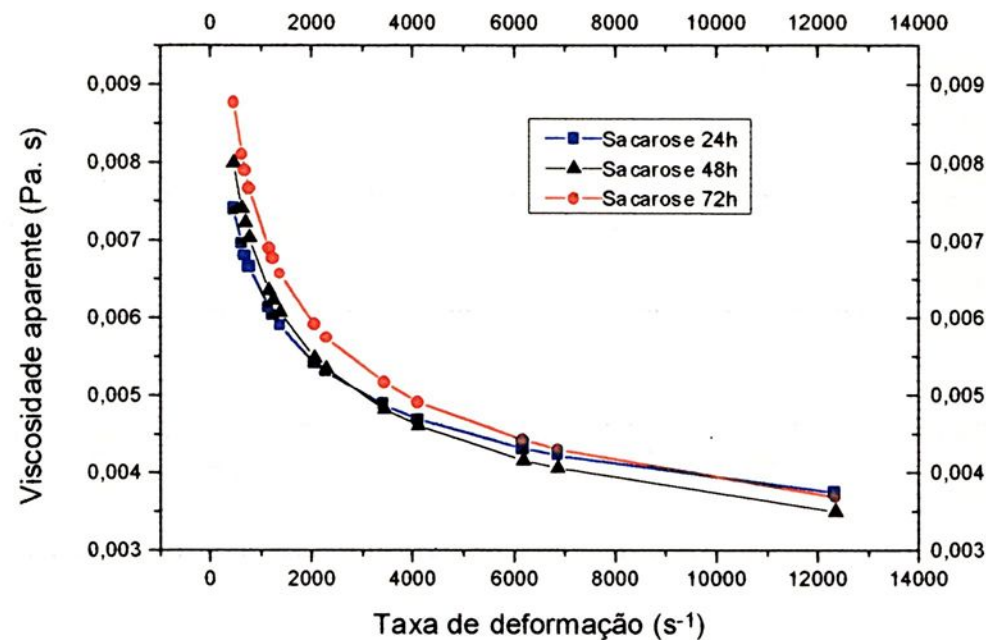
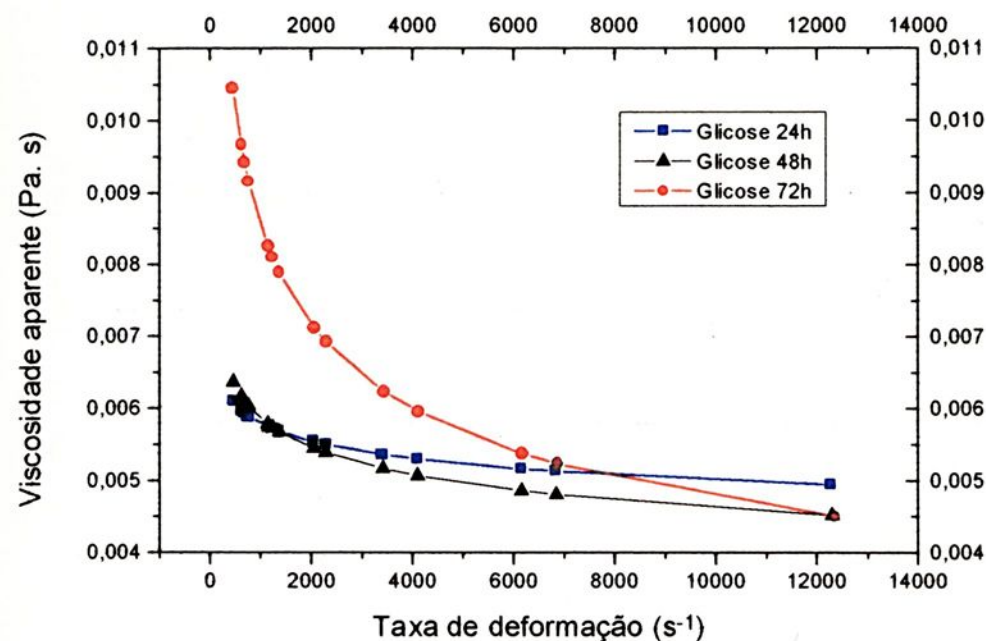


Figura 7 - Efeito da viscosidade aparente sobre a taxa de deformação a 25°C no meio de cultura contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 24, 48 e 72h de fermentação.

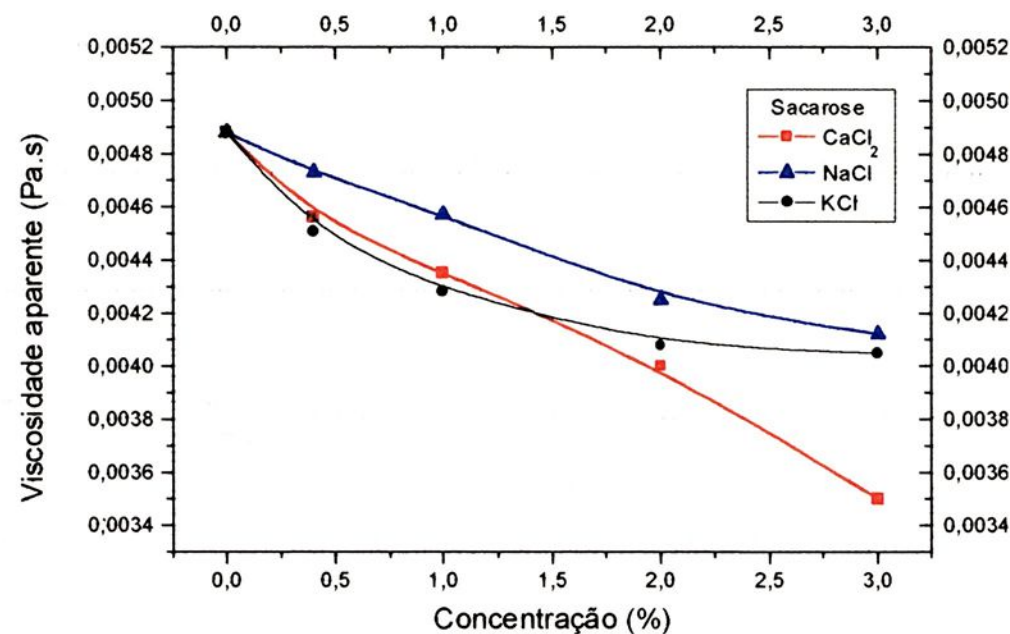
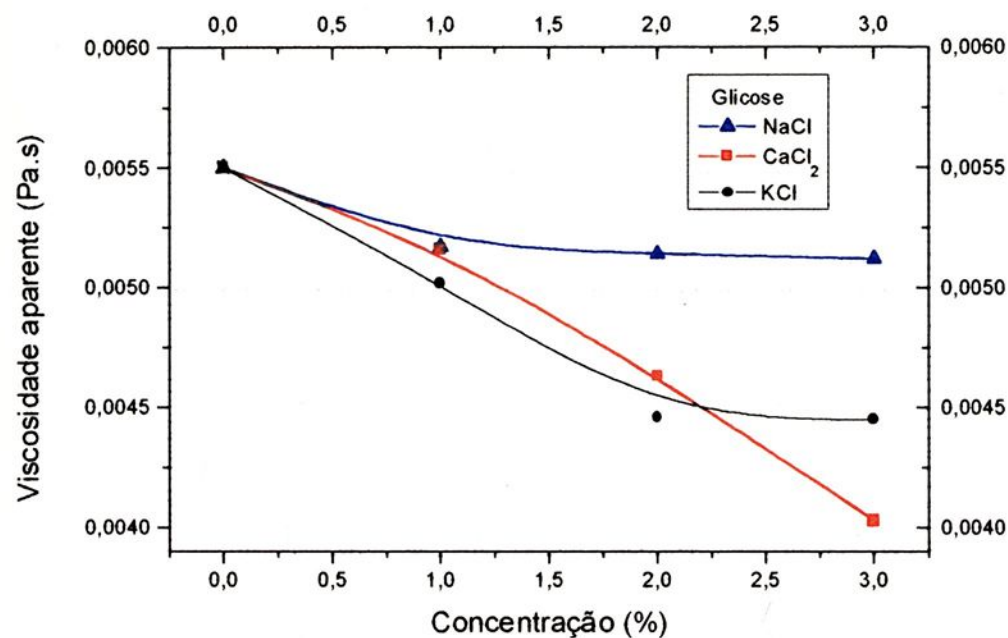


Figura 8 - Efeito da viscosidade aparente sobre a concentração de sais a 25°C e 210 rpm, no meio de cultura contendo glicose e sacarose, respectivamente, após 72h de fermentação medida em 121,5 rpm.

Tabela 9 - Parâmetros reológicos do caldo de fermentação a temperatura a 30°C e pH = 7,0 da bactéria 4B isolada de amostras de solo, contendo glicose a 2% em função das concentrações de sais, medidos em reômetro de cilindros concêntricos a 25°C

%	NaCl		KCl		CaCl ₂	
	k	n	k	n	k	n
0,0	0,050	0,73	0,050	0,73	0,050	0,73
0,5	0,049	0,72	0,048	0,82	0,033	0,84
1,0	0,043	0,75	0,048	0,79	0,032	0,84
2,0	0,014	0,87	0,051	0,73	0,028	0,88
3,0	0,013	0,88	0,050	0,73	0,025	0,89

Tabela 10 - Parâmetros reológicos do caldo de fermentação a temperatura a 30°C e pH = 7,0 da bactéria 4B isolada de amostras de solo, contendo sacarose a 2% em função das concentrações de sais, medidos em reômetro de cilindros concêntricos a 25°C

%	NaCl		KCl		CaCl ₂	
	k	n	k	n	k	n
0,0	0,044	0,74	0,044	0,74	0,044	0,74
0,5	0,023	0,79	0,025	0,79	0,028	0,85
1,0	0,017	0,84	0,016	0,83	0,019	0,82
2,0	0,015	0,88	0,015	0,84	0,018	0,85
3,0	0,013	0,88	0,014	0,85	0,017	0,87

Como mostrado pelas Tabelas 9 e 10, à medida que aumenta a concentração dos sais a viscosidade aparente diminui, pois uma maior concentração de eletrólitos e cargas positivas provocam uma maior alteração na

conformação. Como pode ser observado na Figura 8, todas as soluções contendo estes sais apresentam um comportamento pseudoplástico, uma vez que, a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de deformação.

O efeito do sal nas propriedades reológicas das soluções aquosas de gomas é um assunto de considerável importância prática. A presença de sais diminui marcadamente a viscosidade de soluções diluídas de polieletrólitos. Este efeito pode ser largamente atribuído ao polieletrólito, isto deve-se a que a força iônica do meio reduz a repulsão entre cargas adjacentes da cadeia do polímero. Isto resulta numa mudança conformacional da configuração estendida para uma configuração ao acaso (Elliott, 1976).

Em geral, os polissacarídeos são pouco solúveis em solução salina, como consequência, a viscosidade das soluções diluídas de polissacarídeos é muito pequena. Soluções altamente concentradas de polissacarídeos apresentam viscosidades maiores na presença de sais (Elliott, 1976).



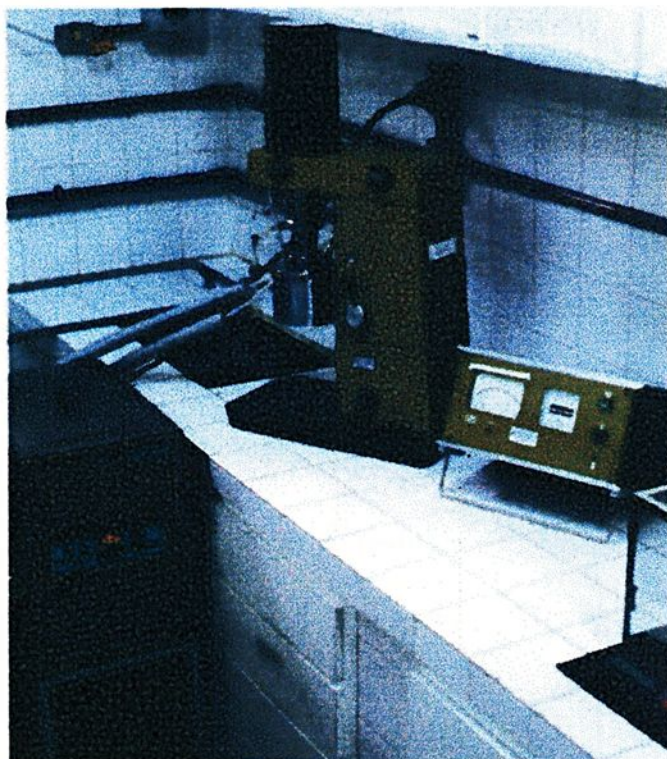


Foto 4 - Reômetro (Reotest 2.1) e banho ultra-termostatizado utilizados durante a realização das determinações reológicas

6. CONCLUSÕES

Foi possível isolar 322 bactérias produtoras de polissacarídeos do solo da Estação Ecológica do Noroeste Paulista. Foram isoladas: *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*.

Dentro das condições de produção de polissacarídeos estudadas, apenas *Pseudomonas* e *Arthobacter* foram selecionadas através da viscosidade do caldo de fermentação. As condições de fermentação que apresentaram melhores resultados foram pH=7, temperatura de 30°C, 1 ou 2% de sacarose ou glicose. Estas fontes de carbono apresentaram comportamento similar.

Estudos reológicos realizados no caldo de fermentação da bactéria do gênero *Pseudomonas* mostraram comportamento de fluido não-newtoniano e pseudoplástico. Para meios de cultura com sacarose a maior viscosidade ocorreu depois de 24 e 48h, para a glicose após 72h. Com relação ao efeito de sais, o CaCl_2 apresentou uma maior influência sobre a viscosidade do caldo.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHTAPUTRE, A. A., SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n. 3, p. 1159-1162, 1995.
- BALADRIAN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S., BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, v.228, p.1154, 1985.
- BEMILLER, J.N. Some challenges for gums and gum research, In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 4*, ed. Philips, G.O., Wedlock, D.J., Williamns, P.A., IRL Press, Oxford, p.3, 1988.
- BEMILLER, J.N., WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. Ed., *Food Chemistry*, 3.ed., Marcel Dekker, New York, 1996.
- BERGEY'S *Manual of Systematic Bacteriology*. R. KRIEG ed., Baltimore, Williams Wilkins, v.1 e 2, 964p, 1984.
- BORWANKAR, R. P. Food texture and rheology: a tutorial review. *Journal of Food Engineering*, v. 16, n. 1-2, p. 1-16, 1992.
- BRANDÃO, E.M. *Microbiologia do Solo*. Sociedade Brasileira da Ciência do Solo (SBSCS), Campinas, 360p, 1992.
- BULL, A. T., GOODFELLOW, M., SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*, v. 46, p. 219, 1992.
- BURK, D. L., BAROVSKY, K., MONROY, G.H. Biodiversity and Biotechnology. *Science*, v. 260, p. 1900, 1993.
- CHARLES, M. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. *Advances in Biochemistry Engineering*, v.8, p.1-62, 1978.
- CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 87, p. 113-130, 1990.



- 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. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8.ed., Baltimore, The Williams and Wilkins, 1974.
- CURL, A. E., TRUELOVE, B. *The Rhizosphere. (Advanced Series in agricultural Sciences)* Berlin. Springer Verlag, v. 15, 1986.
- DE, P. S.; BASU, P. S. Extracellular polysaccharide production by a *Rhizobium* sp. from root nodules of *Derris scandens*. *Folia Microbiologica*, v. 41, n. 4, p. 368-372, 1996.
- DE VUYST. L., VERMEIRE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 42, p.187-191, 1994.
- DLAMINI, A. M., PEIRIS P. S. Production of exopolysaccharide by *Pseudomonas* sp. ATCC 31461 (*Pseudomonas elodea*) using whey as fermentation substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.47, p.52-57, 1997.
- ELLIOTT, J. H. Some rheological properties of gum solutions. *Extracellular Microbial Polysaccharides*, ACS-Symposium Series, v.45, p.144-159, 1976.
- FOEGEDING, E. A.; RAMSEY, S. R. Rheological and Water-holding-properties of gelled meat batters containing iota-carrageenan, kappa-carrageenan or xanthan gum. *Journal of Food Science*, v.52, n.3, p.549-553, 1987.
- FOOD & DRUG ADMINISTRATION Food additives permitted in food for human consumption: Xanthan gum. *Federal Register* v. 34, n.53 Part 121:5376. March 19, 1969.
- GANCEL, F. NOVEL, G. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *Journal of dairy science*, v. 77, n.3, p. 685-688.
- 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.
- GIAVASIS I; HARVEY L. M.; MCNEIL, B. Gellan gum. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 20, Iss 3, p. 177-211, 2000.



- GLICKSMAN, M. Food applications of gums. In: *Food Carbohydrates*, ed. Linneback, D.R. & Inglett, G.E., AVI Publ., Westport, Connecticut, p. 270, 1982.
- HOLDING A. J., COLEE J. G. *Methods in Microbiology*, v. 6, cap I., p. 1-32, 1971.
- HOLDSWORTH, S.D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. *Journal Texture Studies*, v.2, p.393, 1971.
- HOLZWARTH, G.; PRESTRIDGE, E. B. Multistranded helix in xanthan polysaccharide. *Science*, v.197, p.757-759, 1977.
- HOU, C. T.; AHLGREN, J. A.; BROWN, W.; NICHOLSON, J. J. Production of an extracellular polysaccharide by *Agrobacterium* sp DS3 NRRL B-14297 isolated from soil. *Journal Industrial Microbiology*, v.16, n. 2, p. 129-133, 1996.
- ISOBE, Y., ENDO, K., KAWAY, H. Properties of a highly viscous polysaccharide produced by a *Bacillus* strain isolated from soil. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v.56, n.4, p.636-639, 1992.
- KAWAI, H., ISOBE, Y., KORIBE, 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.
- 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.
- 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.
- KRIEGER, I. M., ELROD, H. Direct determination of the flow curves of non-Newtonian fluids. II. Shearing rate in the concentric cylinder viscosimeter. *Journal Applied Phys.*, v.24, p.134, 1953.
- LANDON, R. S.; LAW, R. C. S.; WEEBB, C. Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 (F) as a



- possible tool for control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.40, p.251-257, 1993.
- LAUNAY, B., DOUBLIER, J. L., CUVELIER, G. Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polyssacharides. In: *Functional Properties of Food Macromolecules*, Ed. Mitchell, J. R. & Ledward, D. A., Elsevier Applied Science Publishers. p. 1, 1986.
- LOOIJESTEIJN, E.; HUGENHOLTZ, J.; SMITH, M. R. Physiology of exopolysaccharide (EPS) production by *Lactococcus lactis*. *International Dairy Federation*, Brussels (Belgium), 253 p., Special Issue 9802, p. 239-243, 1998.
- LOVEJOY, T. Um lugar na História. *Revista Veja*, v.25, n.23, p.100, 1992.
- LYNCH, J. M. Biotecnologia do Solo: Fatores microbiológicos na produtividade Agrícola - São Paulo, Ed. Manole Ltda. 209p, 1986.
- LYNCH, J. M., WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, v.129, p.1-10, 1990.
- MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Comprehensive Biotechnology – The Principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Editor-in-Chief Murray Moo-Young University Waterloo (Waterloo), Canadá, v.3, p. 1005-1044, 1985.
- MITCHELL, J.R. Rheology of gels. *Journal Texture Studies*, v.7, p.313, 1976.
- MOORHOUSE, R., COLEGROVE, G. T., SANDFORT, P. A., BAIRD, J. K., KANG, K. S. PS-60: A New Gel-forming Polysaccharide. ACS Symp. Series, No. 150. *American Chemistry Society*, 1981.
- MORIN, A., MORESOLI, C., RODRIGUE, N., DUMONT, J., RACINE, M., POITRAS, E. Effect of carbon, nitrogen, and agitation on exopolysaccharide production by *Enterobacter agglomerans* grown on low-grade maple sap. *Enzyme Microbiology Technology*, v.15, p. 500- 507, 1993.
- MURO, M. A., LUCHI, M.R. Preservação de microrganismos. Campinas. *Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”*, 64p. 1989.
- OLIVERS, C. E. Rheological characterization of coffee mucilage. *Journal of Food Process Engineering*, v. 19, p. 331-342, 1996.
- OZDEMIR M., SADIKOGLU, H. Characterization of rheological properties of systems containing sugar substitutes and carrageenan. *International Journal of Food Science and Technology*, v.33, p.439-444, 1998.



- PACE, G. W., RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Advances in Biochemical Engineering*, v.15, p.41-70, 1981.
- PASQUEL, A. Gomas: Utilização e aspectos reológicos. *Boletim da SBCTA*, v.33, n.1, p. 86-97, jan/jun 1999.
- PELCZAR, M., REID, R., CHAIN, E. C. S. *Microbiologia*, v. 2. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1072 p, 1980.
- PELCZAR, M. J. Jr., CHAIN, E. C. S., KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e Aplicações*. v. 1 e 2, São Paulo: Makron Books, p. 524-514, 1996
- PHILIPPIS, R., SILI, C., TASSINATO, G., VINCENZINI, M., MATERASSI, R. Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cynospira capsulata*. *Bioresourse Technology*, v.38, p.101-104, 1991.
- PSZCZOLA, D. E. Gellan gum wins IFT's food technology industrial achievement award. *Food Technology*, september: 94, 1993.
- RAJESHWARI, K. V., PRAKASH, G., GHOSH, P. Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. *Letters in Applied Microbiology*, v.21, p.173-175, 1995.
- RAO, M. A.; ANANTHESWARAN, R. C. Rheology of Fluids in Food Processing. *Food Technology*, Fevereiro 1982.
- RIO-CONVENTION. *Elsevier Science B. V.*, 1998. <http://www.bdt.org.br>
- ROCKS, J. K. Xanthan gum. *Food Tecnology*, v.25, n.5, p.22-31, 1971.
- ROSADO, A. S., DUARTE, G. F., MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: *Aplicações de técnicas de biologia molecular*, 20p, 1999.
- ROSEIRO, J. C., ESGALHADO, M. E., AMARAL COLLAÇO M. T., EMERY A. N. Medium development for xanthan production. *Process. Biochemistry*, v.27, p.167-175, 1992.
- RUSSELL, E. W. *Soil Conditions and Plant Growth*. Ed. Longman, 10.ed., 849p, 1973.
- SALE, A. J. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Ed. Mc Graw Hill, 7.ed., p. 795-843, 1974.



- SANDERSON, G. R. Polysaccharides in Foods. *Food Technology*, p. 50- 83, 1981.
- SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. *Advance Carbohydrate Chemistry Biochemistry*, v.36, p.265-313, 1979.
- SCHNEIDER, J.E. Patentes ou biotecnologia: estímulo ou obstáculo à produção de conhecimentos e inovações? *Ciência Hoje*, v.15, n.88, p.35, 1993.
- SHERMAN, P. *Industrial Rheology*. London, Academic Press, 423p., 1970.
- SIQUEIRA, J. O. FRANCO, A. A. Biotecnologia do Solo: *Fundamentos e Perspectivas. Ciências Agrárias nos Trópicos Brasileiros. Série Agronomia*, 236p, 1988.
- SKELLAND, A. H. P. *Non-newtonian Flow and Heat Transfer*. New York, John Willey & sons, 469p, 1967.
- SLONEKER, J.H., JEANES, A. Exocellular bacterial polyssaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 Part 1-Constitution. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 40, p. 2066-2071, 1962.
- SLODKI, M.E. New bacterial polysaccharides, In: *Industrial Polysaccharides, The Impact of Biotechnology and Advanced Methodologies*, Ed. Stivala, S.S., Crescenzi, V. & Dea, I.C.M., Gordon and Breach Science Publ., p. 3, 1987.
- SMILES, D. E. Aspects of the physical environment of soils organisms. *Biol. Fertil. Soil*, v.6, p.204-215, 1988.
- SOUW, P., DEMAİN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Applied Environmental Microbiology*, v.37, n.6, p.1186, 1979.
- STEFFE, J. F. Rheological methods in food process engineering. Michigan, 418p., 1992.
- SUTHERLAND, I. W. Bacterial Exopolysaccharides. *Advances in Microbiological Physiology*, 8, p. 143-213, 1972.
- SUTHERLAND, I. W. *Biotechnology of Microbial Polysaccharides*, vol. 9, Cambridge University Press, Cambridge. 1990.
- SZCZESNIAK, A.S. Rheological basis for the selection. In: *Gums and Stabilisers for the Food Industry 3*, ed. Philips, G.O., Wedlock, D.J. & Willians, P.A., *Elsevier Applied Science*, London, p. 311, 1986.



- TAKO, M., NAKAMURA, S. Rheological properties of Ca salt of xanthan in aqueous media. *Agriculture and Biology Chemistry*, v.51, n.11, p.2919-2923, 1987.
- VANDAMME, E. J., BRUGGEMAN, G., BAETS, S., VANHOOREN, P. T. Useful Polymers of Microbial Origin. *Agro Food Industry Hi- Tech*, p.21-25, 1996.
- VAN HOLDE K. E. *Bioquímica Física*, Ed. Edgard Blücher, cap. 7, p. 108-121, 1975.
- VAN WAZER, J. R., LYONS, J. W., KIM, K. Y., COLWELL, R. E. *Viscosity and flow measurement: a laboratory handbook of rheology*. New York, Interscience Publishers, 406p., 1963.
- VELJKOVIC, V. B., LAZIC, M. L., SKALA, D. U. Studies on dextran fermentation broth rheology. *Enzyme Microbiology Technology*, v.10, p.686-688, 1988.
- WHISTLER, R. L., DANIEL, J. R. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. Ed., *Food Chemistry*. 2nd. Ed., Marcel Dekker, New York, p. 69-137, 1985.
- WHISTLER, R. L. Factors influencing gum costs and applications. In: WHISTLER, R. L., BeMILLER, J. N., Eds., *Industrial Gums*, 2.ed., Academic Press. San Diego, p. 5-18, 1973.
- WILLIAMS, A. G., WIMPENNY, J. W. T., LAWSON, C. J. The production of an extracellular polysaccharide by a *Pseudomonas*-type microorganism. *Journal of General Microbiology*, 77, xiii.1973.
- WILLIAMS, A. G., WIMPENNY, J. W. T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *Journal of General Microbiology*, 102, p.13-21, 1977.
- ZILINSKAS, R.A. Bridging the gap between research and applications in the Third World. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.9, p.145, 1993.



ANEXO I



Testes bioquímicos

Teste de Ágar-Lisina-Ferro (LIA)

O teste de LIA (Ágar lisina-ferro) é utilizado para a demonstração simultânea de lisina-descarboxilase (LD) e da produção de ácido sulfídrico (H_2S) para a identificação de enterobactérias, sobretudo de *Salmonella* e *Arizona*. Este meio nutritivo (LIA) se semeia com o microrganismo, tanto por estrias sobre a superfície inclinada como por picada e incuba-se por 24-48 horas a $35^{\circ}C$. As culturas que produzem lisina-descarboxilase causam uma reação alcalina no meio produzindo uma coloração roxa, as culturas negativas produzem uma coloração roxa na superfície (produção de base) e coloração amarela (produção de ácido) na base do tubo. A produção de H_2S dá uma coloração negra no meio de cultura devido ao sulfeto de ferro que se forma.

Teste de Ágar-Ferro-Três açúcares (TSIA)

O teste de TSIA (Ágar-ferro-três açúcares) é utilizado basicamente com dois propósitos: determinar a fermentação dos carboidratos e determinar a produção de H_2S . O tubo que contém o meio de cultura possui duas câmaras de reação (aeróbia e anaeróbia), a porção inclinada, exposta em sua superfície ao oxigênio atmosférico é aeróbia; e a porção inferior, denominada base é anaeróbia. Após inocular o microrganismo teste, tanto por estria na superfície



inclinada como por picada, incuba-se por 24-48 horas a 35°C. A degradação do açúcar, com produção de ácido a partir da metabolização anaeróbia da glicose, se manifesta por uma mudança de cor do indicador vermelho de fenol de vermelho a amarelo. Uma viragem do indicador a vermelho intenso indica uma alcalinização do meio devido a utilização aeróbia e anaeróbia dos compostos nitrogenados, neste caso não houve utilização dos carboidratos. No caso de aparecimento de uma base amarela e a superfície vermelha indica que ocorreu a degradação aeróbia da glicose e dos compostos nitrogenados na superfície (superfície vermelha), o que gera produtos alcalinos (NH_3), a base amarela significa a produção de ácidos a partir da metabolização anaeróbia da glicose. A produção de H_2S dá uma coloração negra no meio devido ao sulfeto de ferro que se forma.

Teste de nitrato

O teste do nitrato é utilizado para determinar a habilidade que um microrganismo tem para reduzir nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) ou a gás nitrogênio (N_2). Os microrganismos que reduzem nitrato têm a capacidade de retirar oxigênio deste. Estas reações ocorrem normalmente sob condições anaeróbias. Após inocular o microrganismo teste no meio de cultura, deve-se incubar 24-48 horas a 35°C e logo após o crescimento, acrescentar ao tubo 10 gotas de uma mistura (v/v) dos reagentes α -naftilamina e ácido sulfanílico e agitar levemente. O aparecimento de um halo róseo equivale a um teste positivo, indicando que os nitratos foram reduzidos a nitritos ou a gás nitrogênio.



Teste de citrato

O teste do citrato é utilizado para identificação de microrganismos capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Uma vez que o citrato de sódio é um dos metabólitos constituintes do ciclo de Krebs, após semear o microrganismo teste por estria, na superfície do meio de cultura e por “picada” na parte inferior do meio, utilizando para isso uma agulha, incuba-se de 24-48 horas, a 35°C. O resultado positivo é representado pelo aparecimento da cor azul devido a viragem do indicador de pH azul de bromotimol (verde) pela alcalinização do meio de cultura.

Teste de motilidade

A motilidade pode ser observada semeando-se o microrganismo em meio semi-sólido. Para isto o microrganismo é inoculado “por picada” utilizando uma agulha e incubado por 24-48 horas a 35°C. Os microrganismos que possuírem capacidade de se mover, irão difundir-se além da linha de picada e as bactérias sem motilidade crescerão exclusivamente ao longo da linha de picada.



Teste do indol

A prova do indol é utilizada para detectar bactérias que possuem a enzima triptofanase que são capazes de hidrolizar e desaminar o triptofano com a produção de indol, sendo este um dos produtos metabólicos de degradação do aminoácido triptofano. Após inocular o microrganismo em meio contendo triptofano e incubar por 24-48 horas, a 35°C, adicionam-se 3 a 5 gotas do reagente de Kovac's no tubo teste. O aparecimento de coloração vermelha na superfície de contato do tubo teste indica a presença de indol e portanto que o aminoácido triptofano foi hidrolizado.

Teste de fermentação e oxidação

É utilizado para a determinação da fermentação de diferentes fontes de carbono como, manitol, maltose, glicose, sacarose e lactose. Neste teste deve-se verificar a presença de ácidos e/ou gás produzidos durante a fermentação e oxidação dos açúcares. Para isto pipeta-se 1,0ml da cultura que foi inoculada 24 horas antes, em caldo nutriente e, adiciona-se a tubos que possuem meio de cultura líquido e tubos de Durhan. Incuba-se por 24-48 horas a 35°C. A produção de ácido é detectada pelo aparecimento de uma cor amarela no meio que possui inicialmente a coloração vermelha devido a presença do indicador vermelho de fenol, indicando assim a fermentação do açúcar. A produção de gás indica a oxidação dos açúcares.



Teste de gelatinase

O teste de gelatinase é utilizado para determinação e investigação de microrganismos que liqüefazem gelatina. As enzimas gelatinases irão atuar sobre a gelatina fazendo com que ocorra a perda das propriedades gelificantes. Para isto deve-se inocular o microrganismo no meio de cultura com o auxílio de uma alça de platina. Incubar de 24-48 horas a 35°C. Após o período de incubação, 30 minutos antes da leitura, os tubos são colocados na geladeira para verificar se ocorrerá ou não gelatinização. A presença de enzimas gelatinases liquefarão a gelatina, e o meio ficará liquefeito mesmo após colocar o tubo sob refrigeração.

Teste de lecitinase

O teste de lecitinase (Ágar-ovo) é utilizado para verificar microrganismos que apresentam a enzima lecitinase. A gema do ovo é usada comumente como uma fonte de lecitina. A inoculação é feita por estrias na superfície do meio de cultura com incubação por 24-48 horas a 35°C. Os microrganismos que possuem a enzima lecitinase irão hidrolisar a lecitina, contida na gema do ovo, com o aparecimento de um halo transparente desenvolvido principalmente ao redor das colônias.



Teste de amilase

O teste da amilase (Ágar- amido) é utilizado para verificar se o microrganismo possui ou não a enzima amilase, que tem a propriedade de hidrolizar o amido. Para isto deve-se inocular o microrganismo teste na placa contendo o meio e incubar a 35°C por 24-48 horas. Após o período de incubação adicionar a placa solução de lugol. Os microrganismos que possuírem a enzima amilase irão hidrolizar o amido contido no meio de cultura, com o aparecimento de uma zona incolor ao redor do crescimento do organismo e com o aparecimento de uma coloração azulada no restante do meio.

Teste de protease

O teste de protease (Ágar-leite) é utilizado para comprovar que microrganismos possuem as enzimas proteases capazes de hidrolizar a proteína do leite. O microrganismo é inoculado na parte central da placa e incubado por 24-48 horas a 35°C. Os microrganismos que possuírem a enzima protease, irão digerir a proteína do leite formando um halo transparente ao redor do crescimento dos organismos.



Teste da catalase

Este teste é utilizado para determinar a presença da enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O teste é feito utilizando uma cultura de 24 horas a qual, através de uma alça de platina, é colocada em uma lamina contendo peróxido de hidrogênio, a presença de borbulhamento representa a positividade do teste.

Teste da oxidase

Esse teste é utilizado para determinar a presença da enzima oxidase. O teste é feito utilizando uma cultura de 24 horas em tubos de ensaio, nos quais são adicionados água estéril para a formação de uma suspensão e discos impregnados com p-Aminodimetilamina que serve de substrato para microrganismos que produzem oxidase, ou seja, o reagente atua como acceptor artificial de elétrons substituindo o oxigênio, a mudança da coloração do disco de branco para inicialmente rosa e depois preto indica um teste positivo.

Teste da urease

A urease é uma enzima presente em muitas espécies de microrganismos que podem hidrolisar a uréia. O microrganismo é inoculado na parte central da placa e incubado por 24-48 horas a 35°C, os microrganismos que



possuírem a enzima urease, irão digerir a uréia do meio e a amônia reage em solução para formar carbonato de amônio, resultando na alcalinização e aumento do pH do meio, a mudança de cor de amarelo para vermelho em toda a placa representa um resultado positivo.

Teste do vermelho de metila (VM)

A prova do VM é uma análise quantitativa da produção de ácido a partir da glicose, via fermentação ácida mista, a qual produz ácidos fortes como o láctico, acético e fórmico. O vermelho de metila é um indicador de pH com intervalo entre 6,0 (amarelo) e 4,4 (vermelho). O pH no qual o vermelho de metila detecta a presença de ácido é, consideravelmente, mais baixo que o pH de outros indicadores utilizados em meios de cultura. O microrganismo é inoculado no meio de VM a 35°C, durante 48 horas, após este período são adicionadas ao meio 5 gotas de solução de vermelho de metila, o desenvolvimento da cor vermelha na superfície do meio indica a produção de ácido suficiente para abaixar o pH a 4.4 e um resultado positivo.

Teste do Voges-Proskauer (VP)

Este meio é usado para determinar a habilidade de alguns organismos produzirem um composto neutro, o acetilmetilcarbinol ou acetoina, a partir da fermentação da glicose. O ácido pirúvico, principal composto formado



pela degradação fermentativa da glicose, é metabolizado através de várias vias, de acordo com os sistemas enzimáticos que possuem as diferentes bactérias, uma dessas vias leva a produção de acetoina. O microrganismo é inoculado no meio de VM/VP a 35°C, durante 48 horas, após este período são adicionados ao meio 5 gotas de solução hidróxido de potássio a 40%, a acetoina é convertida em diacetila que forma um complexo de cor vermelha na superfície do tubo.

Testes específicos

Agar Baird-Parker

Este meio é utilizado para a identificação de *Staphylococcus*, o meio possui cloreto de lítio e telurito, que inibem outros microrganismos, e o piruvato da glicose atua favorecendo a seletividade do crescimento de estafilococos. O microrganismo teste é inoculado através de estrias na placa contendo o meio Baird-Parker na presença de gema de ovo e telurito de potássio e incubado por 24-48 horas a 35°C, colônias negras indicam a presença de estafilococos.

Agar seletivo para *Pseudomonas*-*Aeromonas* (GSP- Merck)

Este meio é utilizado para a identificação de *Aeromonas* e *Pseudomonas*, o meio possui, como base nutritiva, glutamato e amido que não



podem ser aproveitados por muitos microrganismos, a seletividade é aumentada com a presença de Penicilina no meio. O microrganismo teste é inoculado através de estrias na placa contendo o meio e incubado por 72 horas a 25°C. As colônias de *Pseudomonas* se apresentam violeta-azuladas, rodeadas de uma zona roxa avermelhada.

Pseudomonas Agar Base (Oxoid)

Este meio é utilizado para a identificação de *Pseudomonas* que na presença de CFC selective agar supplement (ágar suplemento seletivo), o meio torna-se seletivo para espécies de *Pseudomonas*. O microrganismo teste é inoculado através de estrias na placa contendo o meio e incubado por 48 horas a 25-30°C. O crescimento na placa indica a presença de *Pseudomonas* e o crescimento acompanhado de pigmento marrom ou fluorescente evidencia *Pseudomonas aeruginosa*.

Técnicas de coloração

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.

Coloração de esporos

Alguns grupos de microrganismos têm a habilidade de formar endosporos nas células. Os esporos são estruturas de resistência. Culturas velhas (após 24 h de crescimento) são submetidas aos seguintes reagentes: verde de malaquita e safranina, os esporos se colorem de verde e as células vegetativas de rosa.

Coloração de cistos

Cistos são uma forma de resistência, estruturalmente diferente de esporos, apresentados por algumas bactérias. Culturas velhas (após 24h de crescimento) são submetidas aos seguintes reagentes: nitrosina fenicada e violeta genciana, o cisto se cora de roxo e a célula vegetativa de rosa.



ANEXO II



Tabela 11 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra A)

Cultura A	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
1	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
2	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
3	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
4	Branca	Seca	Brilhante	Quebradiça	Bastonetes Gram +
5	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
6	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
7	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
8	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
9	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
10	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
11	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
12	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
13	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
14	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
15	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
16	Amarela limão	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
17	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
18	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
19	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
20	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
21	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
22	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
23	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +



Tabela 11 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra A)

(continuação)

Cultura A	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
24	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
25	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
26	Amarela limão	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
27	Amarela limão	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
28	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
29	Amarela limão	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
30	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Cocos Gram +
31	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Cocos Gram +
32	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Cocos Gram +
33	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
34	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
35	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
36	Amarela	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
37	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
38	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
39	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
40	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
41	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
42	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
43	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
44	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
45	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
46	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +

Tabela 11 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra A)

(continuação)

Cultura A	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
47	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
48	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
49	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
50	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
51	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
52	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
53	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +

* : lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta

** : opaca, translúcida, transparente, brilhante

*** : butirosa, viscosa, quebradiça, membranosa



Tabela 12 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra B)

Cultura B	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
1	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
2	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram -
3	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
4	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
5	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
6	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Cocos Gram +
7	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
8	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
9	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
10	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
11	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
12	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
13	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
14	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
15	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
16	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
17	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
18	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
19	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
20	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram -
21	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
22	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
23	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
24	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -



Tabela 12 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra B)

(continuação)

Cultura B	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
25	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
26	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
27	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
28	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
29	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
30	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
31	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
32	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
33	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
34	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
35	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
36	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
37	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
38	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
39	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
40	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
41	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
42	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
43	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
44	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
45	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
46	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
47	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
48	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
49	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +



Tabela 12 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra B)

(continuação)

Cultura B	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
50	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
51	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
52	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
53	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
54	Transparente	Lisa	Transparente	Quebradiça	Bastonetes Gram +
55	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
56	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
57	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
58	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
59	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
60	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
61	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
62	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
63	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
64	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
65	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
66	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
67	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
68	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
69	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
70	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
71	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
72	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
73	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
74	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +



Tabela 12 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra B)

(continuação)

cultura B	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
75	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
76	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
77	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
78	Amarela	Seca	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
79	Amarela	Seca	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
80	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +

* : lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta

** : opaca, translúcida, transparente, brilhante

*** : butirosa, viscosa, quebradiça, membranosa



Tabela 13 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra C)

Cultura C	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
1	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
2	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
3	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
4	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
5	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
6	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
7	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
8	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
9	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Cocos Gram +
10	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
11	Branca	Seca	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
12	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
13	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
14	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
15	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
16	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
17	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
18	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
19	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
20	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
21	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
22	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
23	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
24	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +

Tabela 13 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra C)

(continuação)

Cultura C	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
25	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
26	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
27	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
28	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
29	Marrom	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
30	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
31	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
32	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
33	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
34	Marrom	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
35	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
36	Transparente	Lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
37	Laranja	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
38	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
39	Branca	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
40	Amarela	Seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
41	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
42	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
43	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
44	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
45	Branca	Lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
46	Transparente	lisa	Transparente	Quebradiça	Bastonetes Gram +
47	Branca	rugosa	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
48	Branca	lisa	Opaca	Viscosa	Bastonetes Gram +
49	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +



Tabela 13 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra C)

(continuação)

Cultura C	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
50	Transparente	lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
51	Amarela	lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
52	Branca	lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
53	Laranja	lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
54	Marrom	seca	Opaca	Quebradiça	Cocos Gram +
55	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Cocos Gram +
56	Branca	lisa	Opaca	Viscosa	Cocos Gram +
57	Amarela	lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
58	Amarela	lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
59	Amarela	lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
60	Transparente	lisa	Transparente	Viscosa	Bastonetes Gram +
61	Branca	rugosa	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
62	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
63	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
64	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
65	Branca	lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
66	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Cocos Gram +
67	Branca	seca	Brilhante	Quebradiça	Bastonetes Gram +
68	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
69	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
70	Branca	seca	Opaca	Quebradiça	Bastonetes Gram +
71	Branca	lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
72	Amarela limão	lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
73	Amarela	lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +

* : lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta

** : opaca, translúcida, transparente, brilhante

*** : butirosa, viscosa, quebradiça, membranosa



Tabela 14 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra D)

Cultura D	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
1	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
2	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
3	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
4	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
5	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
6	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
7	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
8	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
9	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
10	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
11	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
12	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
13	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
14	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
15	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
16	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
17	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
18	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
19	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
20	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
21	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
22	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
23	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
24	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +



Tabela 14 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra D)

(continuação)

Cultura D	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
25	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
26	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
27	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
28	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
29	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
30	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
31	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
32	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
33	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
34	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
35	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
36	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
37	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
38	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
39	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
40	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
41	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
42	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
43	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
44	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
45	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
46	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
47	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
48	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
49	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +



Tabela 14 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra D)

(continuação)

Cultura D	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
50	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
51	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
52	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
53	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
54	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
55	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
56	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
57	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
58	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
59	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
60	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
61	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
62	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
63	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
64	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
65	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
66	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
67	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
68	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
69	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
70	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
71	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
72	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
73	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -



Tabela 14 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra D)

(continuação)

Cultura D	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
74	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
75	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
76	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
77	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
78	Branca	Seca	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
79	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
80	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
81	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +

* : lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta

** : opaca, translúcida, transparente, brilhante

*** : butirosa, viscosa, quebradiça, membranosa



Tabela 15 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra E)

Cultura E	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
1	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
2	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
3	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
4	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
5	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
6	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
7	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
8	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
9	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
10	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
11	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
12	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
13	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
14	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
15	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
16	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
17	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
18	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram -
19	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
20	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
21	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
22	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
23	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
24	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +



Tabela 15 - Características morfológicas das bactérias isoladas de amostras de solo utilizando PCA como meio de cultura e incubação a 30°C durante 24h (amostra E)

(continuação)

Cultura E	Cor	Superfície*	Densidade**	Consistência***	Coloração de Gram
25	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
26	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
27	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
28	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
29	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
30	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
31	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
32	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
33	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +
34	Branca	Lisa	Brilhante	Viscosa	Bastonetes Gram +
35	Amarela	Lisa	Brilhante	Viscosa	Cocos Gram +

* : lisa, rugosa, mucóide, seca, pulverulenta

** : opaca, translúcida, transparente, brilhante

*** : butirosa, viscosa, quebradiça, membranosa



ANEXO III



Tabela 16 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra A), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

Cultura A	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
3	2 ₃₀	2 ₇₇	3 ₁₉	3 ₀₆
4	2 ₇₇	3 ₁₆	3 ₄₇	3 ₃₈
5	2 ₆₅	3 ₁₆	3 ₁₀	2 ₅₇
6	2 ₆₁	2 ₉₅	3 ₀₇	3 ₂₀
7	2 ₇₀	3 ₂₅	2 ₇₉	2 ₇₃
8	2 ₇₅	3 ₄₃	3 ₂₈	2 ₇₀
10	2 ₆₀	3 ₅₉	3 ₄₀	2 ₇₆
11	2 ₆₃	3 ₇₈	3 ₅₀	2 ₃₁
12	2 ₇₅	3 ₀₈	3 ₂₀	2 ₉₄
13	3 ₄₇	3 ₇₇	3 ₀₀	2 ₉₇
15	3 ₃₈	3 ₈₁	3 ₀₇	2 ₈₂
16	2 ₅₀	2 ₈₇	2 ₈₆	2 ₅₉
20	2 ₄₀	3 ₂₁	3 ₀₈	2 ₄₄
21	2 ₄₄	3 ₂₀	4 ₂₂	2 ₈₃
26	3 ₀₀	3 ₈₈	2 ₈₀	2 ₇₀
27	3 ₀₅	3 ₅₁	3 ₂₄	3 ₀₈
28	2 ₈₀	3 ₃₅	2 ₇₉	2 ₆₀
29	2 ₀₉	2 ₅₀	3 ₃₃	2 ₅₆
34	3 ₇₇	3 ₄₂	3 ₂₀	3 ₁₆
40	3 ₀₅	3 ₅₃	3 ₈₅	3 ₄₀
41	2 ₉₆	3 ₀₉	2 ₄₈	2 ₂₇
45	2 ₅₄	2 ₉₂	3 ₄₈	3 ₀₉
46	2 ₉₇	3 ₅₁	3 ₅₉	3 ₃₃
47	3 ₀₂	3 ₈₇	3 ₀₂	2 ₆₆
48	3 ₀₉	3 ₅₃	3 ₆₅	3 ₂₂
49	2 ₆₅	2 ₆₉	3 ₀₃	3 ₁₃
52	2 ₃₀	2 ₆₁	3 ₄₅	3 ₃₂
53	3 ₁₀	3 ₁₇	2 ₅₂	2 ₁₉

Viscosidade = foi determinada através do tempo que demoram para fluir 4 ml do caldo de fermentação através de um capilar de vidro de 0,8 cm de diâmetro e 25 cm de largura à temperatura de 25°C.

tempo de escoamento em segundos e centésimos de segundos.



Tabela 17 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra B), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

Cultura B	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
1	5 ₃₈	5 ₈₉	5 ₀₀	4 ₂₃
2	3 ₂₈	3 ₅₉	3 ₅₅	3 ₂₀
3	4 ₀₃	4 ₈₉	5 ₄₀	5 ₂₇
4	5 ₃₉	5 ₃₅	5 ₃₃	4 ₅₆
5	4 ₉₃	5 ₄₀	4 ₆₃	4 ₀₀
6	3 ₀₁	3 ₀₃	3 ₁₅	3 ₁₉
7	5 ₂₇	5 ₄₅	5 ₀₀	5 ₀₁
8	5 ₃₅	5 ₉₇	5 ₃₄	5 ₃₀
9	5 ₀₅	4 ₆₉	4 ₀₀	3 ₈₇
10	5 ₁₀	5 ₈₈	5 ₂₃	4 ₈₁
11	2 ₂₉	3 ₀₅	3 ₁₆	2 ₆₃
12	3 ₃₉	3 ₄₀	2 ₇₀	2 ₃₃
13	3 ₀₇	3 ₆₁	3 ₅₃	2 ₆₉
14	2 ₇₄	3 ₇₅	3 ₂₃	3 ₁₁
15	3 ₆₃	3 ₃₉	3 ₁₈	3 ₁₀
16	3 ₀₉	3 ₅₆	3 ₂₇	2 ₆₁
17	3 ₅₈	3 ₅₀	3 ₂₅	3 ₀₄
18	5 ₃₉	5 ₃₇	5 ₃₇	4 ₈₃
19	3 ₇₀	3 ₃₁	3 ₂₃	2 ₈₄
20	2 ₉₄	3 ₀₀	3 ₃₅	3 ₃₂
21	5 ₄₅	5 ₅₀	4 ₂₁	3 ₅₉
22	3 ₄₀	3 ₄₄	2 ₉₂	2 ₆₅
23	4 ₄₃	5 ₀₀	5 ₀₃	4 ₅₇
24	4 ₂₀	5 ₀₀	4 ₇₀	4 ₆₆
25	3 ₇₇	3 ₇₉	3 ₉₃	3 ₀₂
26	3 ₈₁	3 ₉₇	3 ₂₇	2 ₇₇
27	4 ₀₃	3 ₅₆	2 ₇₃	2 ₅₀
28	3 ₂₃	3 ₃₁	3 ₃₆	2 ₄₇
29	3 ₃₂	3 ₆₃	3 ₂₀	2 ₆₉
30	2 ₈₄	3 ₁₃	3 ₇₄	3 ₀₂
31	2 ₄₆	2 ₅₄	3 ₄₆	2 ₈₉
32	3 ₀₀	3 ₅₃	3 ₅₉	2 ₈₆
33	2 ₉₉	3 ₄₈	2 ₇₈	2 ₆₆
34	3 ₈₂	3 ₄₀	3 ₀₀	3 ₀₁

Tabela 17 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra B), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

(continuação)

Cultura B	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
35	4 ₂₀	4 ₈₄	5 ₂₁	5 ₀₀
36	2 ₉₀	3 ₃₄	2 ₈₅	2 ₃₁
37	2 ₄₉	2 ₈₃	3 ₇₈	3 ₀₁
38	3 ₃₆	3 ₈₃	3 ₀₆	2 ₆₆
39	6 ₄₃	6 ₈₂	5 ₃₃	5 ₀₀
40	3 ₈₃	3 ₈₃	3 ₉₀	2 ₉₇
41	2 ₅₃	2 ₅₂	3 ₈₃	2 ₈₁
42	2 ₈₅	3 ₃₁	3 ₄₉	3 ₄₄
43	4 ₆₀	4 ₈₅	5 ₆₃	3 ₈₉
44	4 ₁₉	4 ₇₃	5 ₆₇	4 ₉₀
45	5 ₄₀	5 ₇₇	4 ₉₀	3 ₉₀
46	5 ₄₉	6 ₈₇	6 ₄₀	6 ₀₅
47	3 ₁₆	3 ₅₈	2 ₇₈	2 ₆₇
48	3 ₇₂	3 ₃₃	3 ₀₉	2 ₉₃
49	3 ₂₀	3 ₈₃	3 ₆₇	3 ₁₇
50	2 ₈₁	3 ₂₈	3 ₅₀	3 ₈₂
51	2 ₈₉	3 ₂₉	3 ₂₁	2 ₈₄
52	3 ₆₇	3 ₁₅	2 ₇₇	2 ₆₆
53	5 ₃₈	5 ₂₀	5 ₁₀	4 ₂₅
54	3 ₀₀	3 ₈₁	3 ₅₁	2 ₅₆
55	3 ₅₆	3 ₆₄	3 ₈₀	2 ₈₆
56	2 ₇₂	3 ₀₀	2 ₇₃	2 ₀₀
57	3 ₀₃	3 ₂₂	3 ₃₀	3 ₆₄
58	2 ₄₃	2 ₄₆	3 ₆₇	2 ₄₆
59	3 ₅₃	3 ₆₃	2 ₈₁	2 ₆₅
60	3 ₂₆	3 ₂₈	3 ₃₀	2 ₆₃
61	3 ₇₀	3 ₅₉	3 ₂₀	3 ₂₂
62	3 ₂₄	3 ₂₈	3 ₄₅	3 ₁₉
63	2 ₆₁	2 ₉₁	3 ₄₃	3 ₇₄
64	3 ₂₈	4 ₀₃	2 ₈₉	2 ₂₆
65	2 ₇₄	3 ₀₉	3 ₅₄	3 ₂₃
66	2 ₅₈	3 ₂₆	3 ₉₃	3 ₀₃
67	2 ₅₃	3 ₁₁	2 ₅₀	2 ₁₂

Tabela 17 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra B), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

(continuação)

Cultura B	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
68	2 ₈₀	3 ₆₄	3 ₄₂	2 ₈₀
69	3 ₀₆	3 ₁₃	3 ₅₃	3 ₂₉
70	3 ₁₆	3 ₃₉	3 ₃₁	2 ₆₈
71	3 ₀₂	3 ₂₁	3 ₁₃	2 ₉₆
72	4 ₂₈	5 ₅₇	4 ₂₅	4 ₀₀
73	5 ₆₅	5 ₃₂	4 ₁₇	4 ₀₄
74	5 ₀₀	5 ₂₄	5 ₃₇	6 ₈₃
75	5 ₂₈	4 ₉₀	4 ₁₀	3 ₈₁
76	5 ₀₉	5 ₉₃	5 ₃₇	4 ₉₀
77	5 ₃₆	5 ₄₁	5 ₇₂	5 ₃₆
78	4 ₃₃	4 ₆₆	5 ₄₉	4 ₁₈
79	4 ₀₀	5 ₅₅	5 ₈₉	5 ₃₄
80	5 ₁₆	5 ₂₈	5 ₇₀	5 ₄₃

Viscosidade = foi determinada através do tempo que demoram para fluir 4 ml do caldo de fermentação através de um capilar de vidro de 0,8 cm de diâmetro e 25 cm de largura à temperatura de 25°C.

tempo de escoamento em segundos e centésimos de segundos.



Tabela 18 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra C), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

Cultura C	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
2	3 ₀₃	3 ₂₇	2 ₉₉	2 ₅₁
5	3 ₃₃	4 ₂₃	3 ₄₇	3 ₇₈
7	2 ₅₂	3 ₄₃	2 ₇₃	2 ₅₅
10	2 ₅₇	3 ₀₇	3 ₃₉	3 ₀₉
12	2 ₅₉	2 ₇₈	3 ₀₀	2 ₄₁
14	2 ₈₅	2 ₉₉	3 ₀₆	2 ₇₁
15	3 ₄₉	3 ₈₂	2 ₅₅	2 ₅₂
17	2 ₅₁	3 ₂₁	2 ₆₈	2 ₁₇
18	3 ₁₈	3 ₈₅	3 ₂₃	2 ₅₃
20	3 ₂₁	3 ₄₆	3 ₃₅	3 ₂₅
22	2 ₅₁	3 ₀₃	3 ₆₅	2 ₃₉
26	2 ₀₈	2 ₉₆	3 ₅₃	3 ₁₉
27	2 ₈₅	3 ₇₃	2 ₇₄	2 ₄₉
30	2 ₈₅	3 ₇₇	3 ₆₇	2 ₅₄
32	2 ₉₁	2 ₉₂	3 ₇₀	3 ₈₇
37	2 ₇₃	2 ₂₇	3 ₁₅	2 ₇₀
41	3 ₁₃	3 ₈₇	3 ₀₃	2 ₇₃
42	2 ₇₃	3 ₁₅	3 ₅₃	2 ₄₆
43	2 ₇₁	3 ₁₉	3 ₉₀	2 ₁₉
44	2 ₅₂	3 ₀₃	2 ₄₄	2 ₂₃
51	3 ₂₃	3 ₀₆	3 ₀₂	2 ₉₉
52	3 ₁₇	3 ₆₃	2 ₆₁	2 ₅₂
57	2 ₄₅	3 ₂₉	3 ₈₃	3 ₀₄
58	2 ₆₆	3 ₄₀	3 ₅₁	3 ₀₃
59	2 ₆₄	2 ₈₉	2 ₉₇	2 ₉₂
60	2 ₃₆	2 ₅₉	2 ₉₇	3 ₄₉
61	2 ₄₃	3 ₄₃	3 ₂₂	3 ₂₀
72	2 ₈₆	3 ₀₀	3 ₄₇	2 ₆₄

Viscosidade = foi determinada através do tempo que demoram para fluir 4 ml do caldo de fermentação através de um capilar de vidro de 0,8 cm de diâmetro e 25 cm de largura à temperatura de 25°C.

tempo de escoamento em segundos e centésimos de segundos.



Tabela 19 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra D), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

Cultura D	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
1	2 ₄₃	3 ₅₅	3 ₀₀	2 ₉₉
4	3 ₁₈	3 ₇₉	3 ₇₆	3 ₂₄
6	2 ₆₅	3 ₅₅	3 ₃₂	2 ₆₉
10	3 ₃₁	3 ₂₇	3 ₁₃	3 ₀₀
15	2 ₈₆	3 ₁₉	3 ₀₅	3 ₀₃
16	3 ₀₃	3 ₀₇	3 ₇₃	2 ₈₄
21	3 ₀₈	3 ₁₈	3 ₃₄	2 ₆₁
22	2 ₉₉	3 ₁₇	3 ₃₂	3 ₂₁
23	2 ₉₆	3 ₂₆	3 ₁₃	3 ₀₉
24	3 ₄₇	3 ₇₂	2 ₆₅	2 ₅₂
32	2 ₇₂	3 ₁₇	3 ₃₅	2 ₆₂
34	2 ₅₀	3 ₂₁	3 ₂₈	3 ₂₂
35	2 ₇₇	3 ₅₄	3 ₁₀	2 ₉₄
39	3 ₇₂	3 ₇₄	3 ₄₂	3 ₃₂
44	3 ₃₁	3 ₁₅	3 ₁₇	3 ₈₇
45	2 ₆₁	3 ₄₉	2 ₈₈	2 ₄₀
51	2 ₆₉	3 ₀₈	3 ₅₆	2 ₇₃
52	3 ₃₀	3 ₄₅	3 ₆₆	2 ₄₆
54	2 ₉₃	3 ₀₉	2 ₆₃	2 ₁₉
55	2 ₅₉	3 ₀₀	3 ₇₅	2 ₂₃
56	3 ₇₃	3 ₂₃	3 ₀₆	2 ₉₉
58	2 ₅₄	3 ₂₂	2 ₄₇	2 ₅₂
64	2 ₉₉	3 ₂₀	3 ₄₉	3 ₀₄
66	2 ₄₉	3 ₄₉	3 ₇₃	3 ₀₃
71	3 ₄₇	2 ₆₂	2 ₆₀	2 ₅₀
75	3 ₄₇	3 ₇₆	2 ₆₆	2 ₄₉
79	2 ₅₃	3 ₀₉	3 ₁₉	3 ₀₀
81	3 ₆₅	2 ₅₉	2 ₄₃	2 ₂₄

Viscosidade = foi determinada através do tempo que demoram para fluir 4 ml do caldo de fermentação através de um capilar de vidro de 0,8 cm de diâmetro e 25 cm de largura à temperatura de 25°C.

tempo de escoamento em segundos e centésimos de segundos.



Tabela 20 - Determinação da viscosidade do caldo de fermentação utilizando bactérias gomosas de rápido crescimento, isoladas de amostras de solo (amostra E), num meio de cultura sintético e incubação de 30°C durante 24; 48; 72 e 96 horas, com agitação constante a 210 rpm

Cultura E	Crescimento 24h	Crescimento 48h	Crescimento 72h	Crescimento 96h
1	3₃₉	3₀₉	2₆₉	2₀₆
5	2 ₉₉	3 ₃₀	3 ₀₃	2 ₄₅
6	3₂₀	3₅₁	3₁₀	2₈₈
9	3 ₈₁	3 ₁₅	2 ₉₈	2 ₂₀
10	2₆₂	3₄₀	2₅₉	2₂₃
11	2 ₈₅	3 ₂₉	3 ₀₃	2 ₇₀
12	3₈₂	3₆₁	3₁₆	2₇₆
14	2 ₇₇	3 ₂₅	3 ₂₀	2 ₇₁
15	2₃₇	3₂₆	3₂₀	2₉₄
16	2 ₈₇	3 ₀₇	3 ₅₈	2 ₉₇
18	3₅₈	3₈₀	3₀₇	2₂₃
19	2 ₇₀	3 ₅₃	3 ₀₀	2 ₅₉
20	2₈₀	3₃₄	3₅₈	2₈₄
22	3 ₀₇	3 ₅₉	3 ₂₉	2 ₈₃

Viscosidade = foi determinada através do tempo que demoram para fluir 4 ml do caldo de fermentação através de um capilar de vidro de 0,8 cm de diâmetro e 25 cm de largura à temperatura de 25°C.

tempo de escoamento em segundos e centésimos de segundos.

ANEXO IV



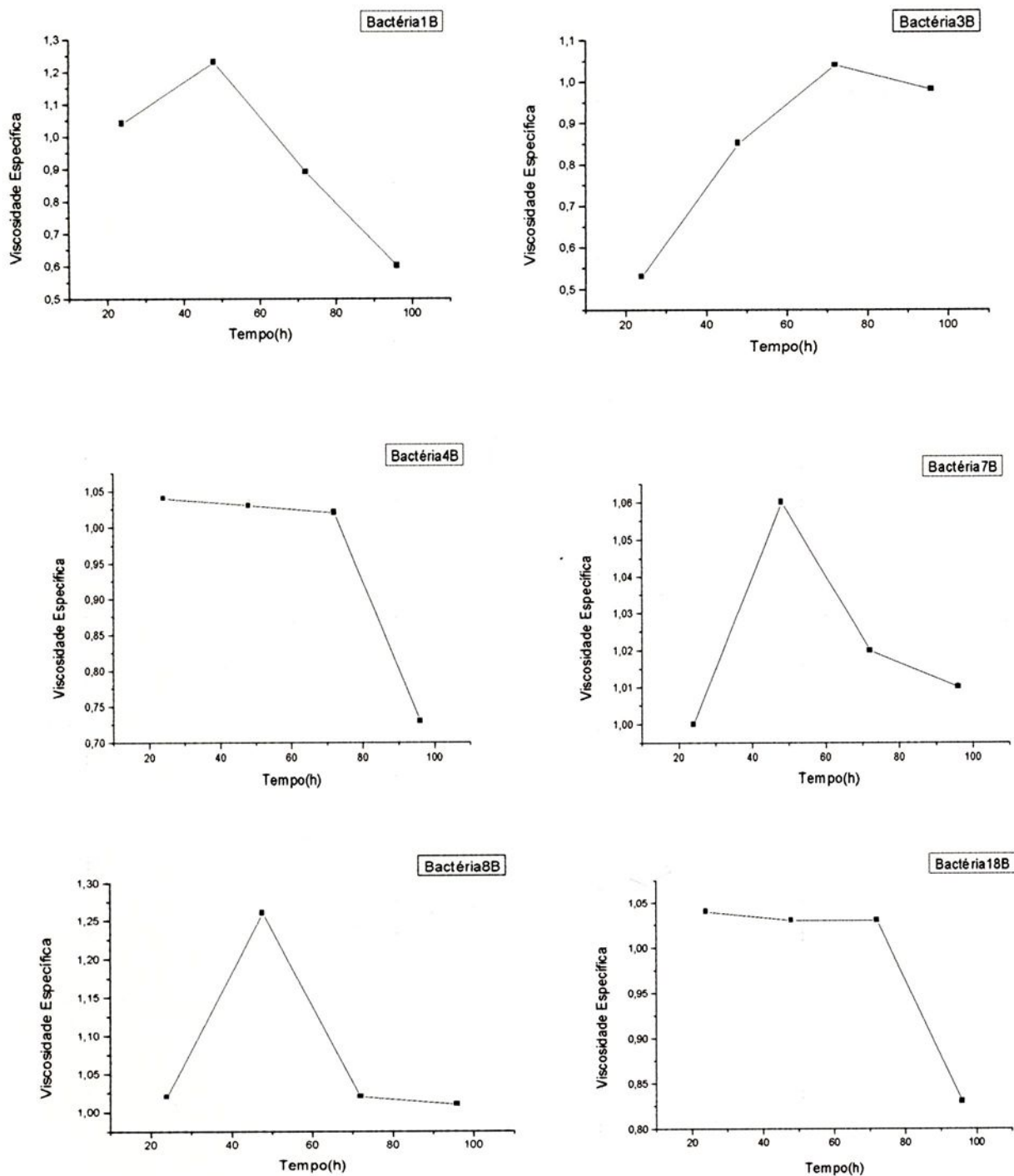


Figura 1 - Determinação da Viscosidade do caldo de fermentação, em intervalos de 24h, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.

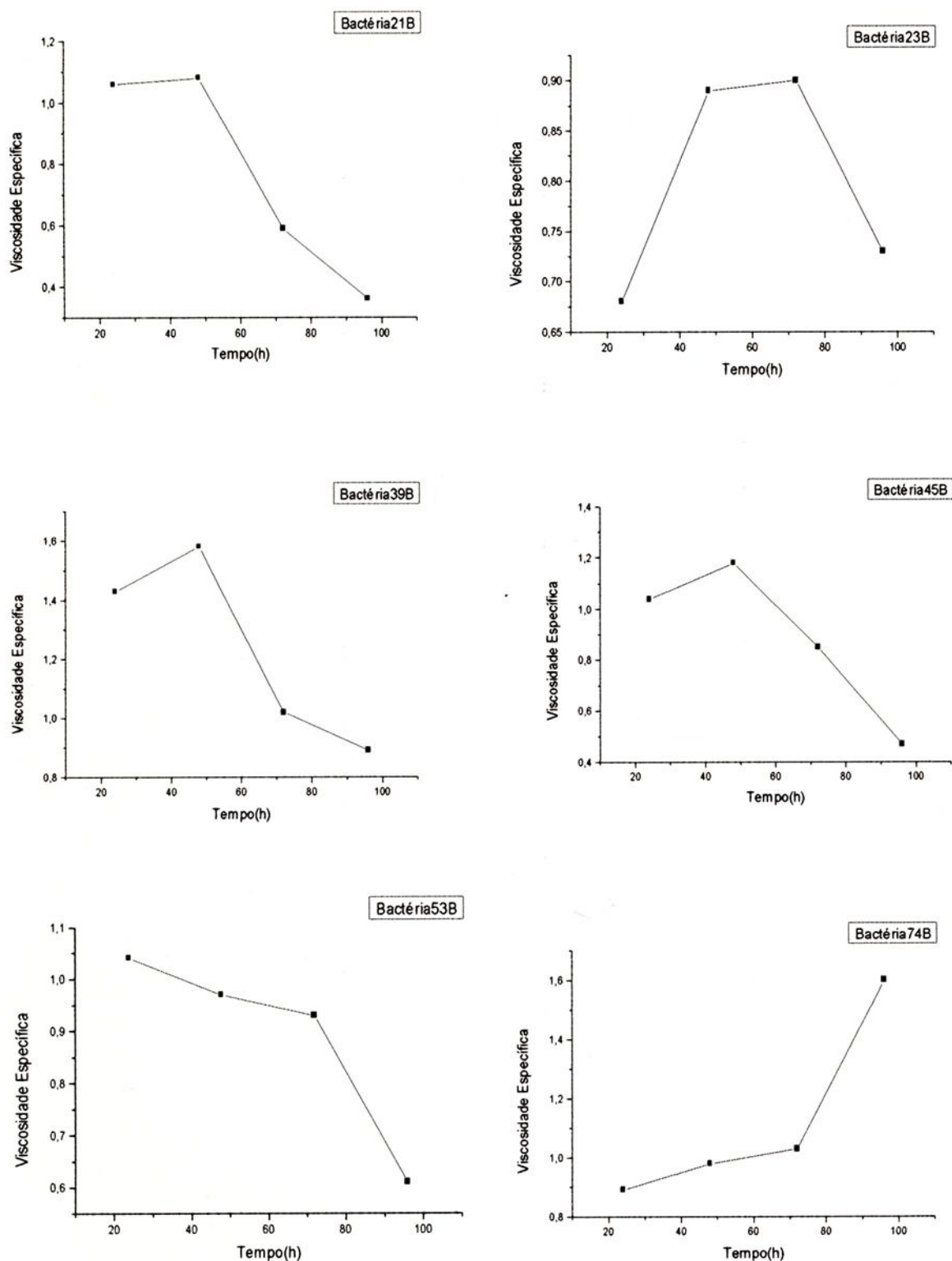


Figura 2 - Determinação da Viscosidade do caldo de fermentação, em intervalos de 24h, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.

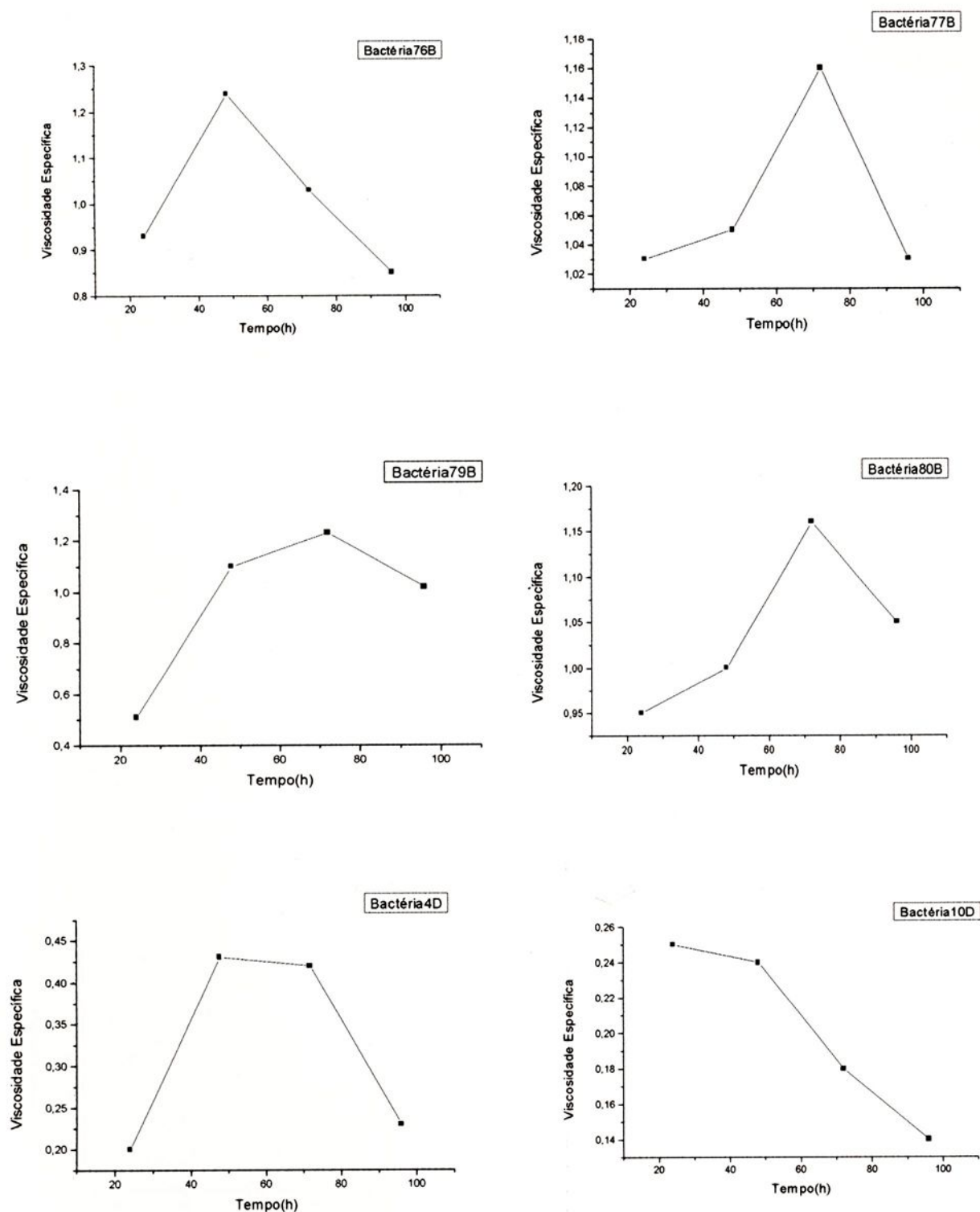


Figura 3 - Determinação da Viscosidade do caldo de fermentação, em intervalos de 24h, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.

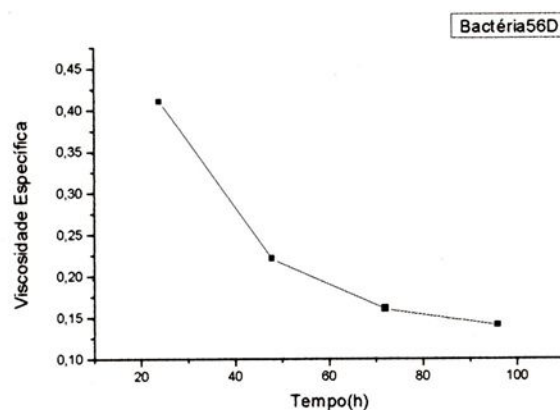
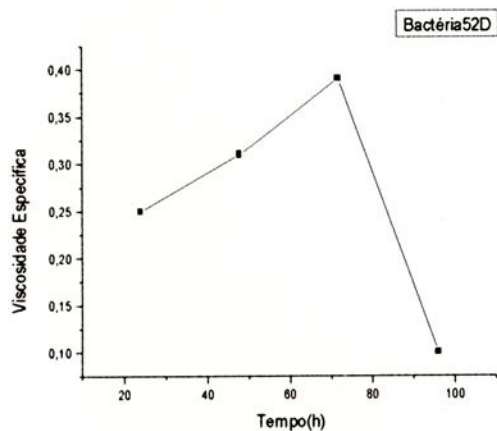
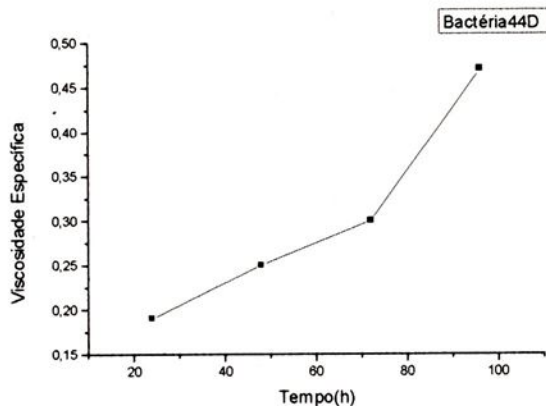
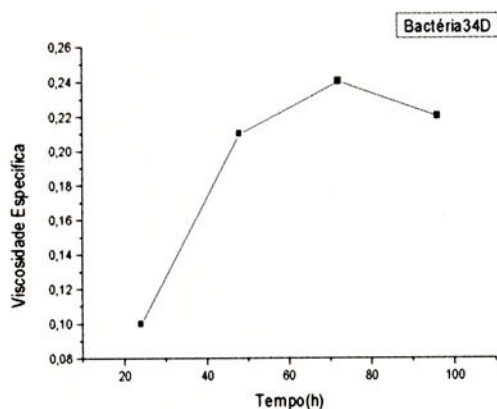
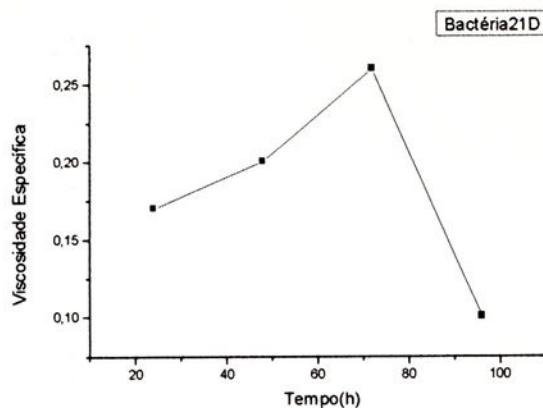
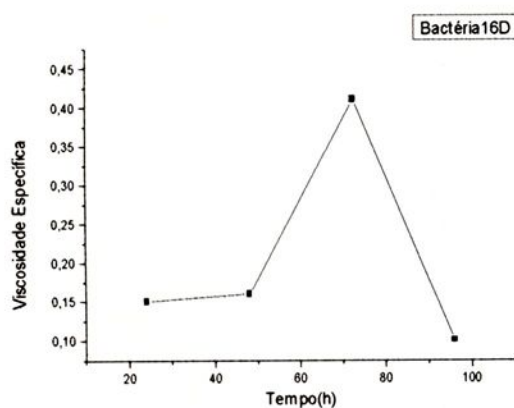


Figura 4 - Determinação da Viscosidade do caldo de fermentação, em intervalos de 24h, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.

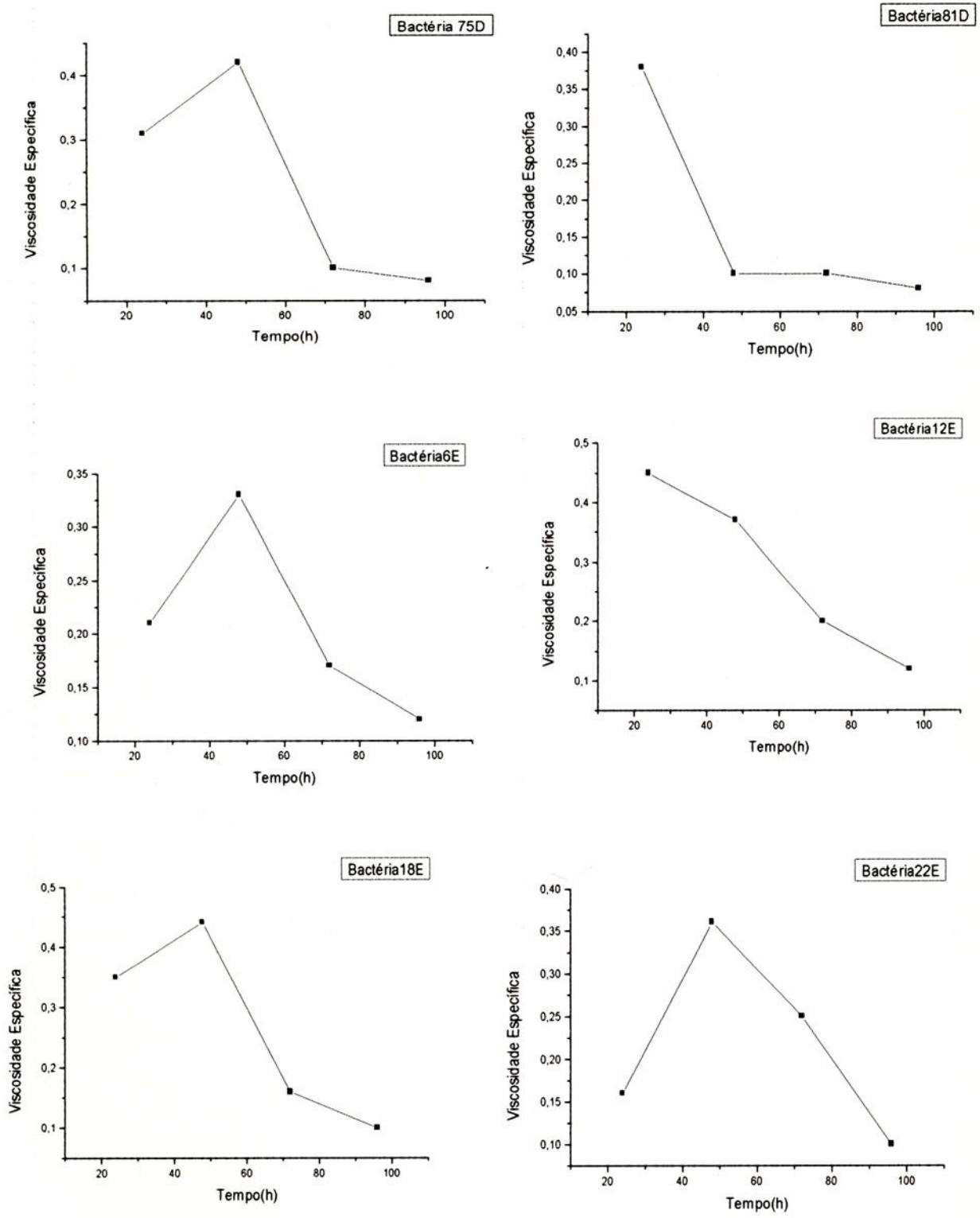


Figura 5 - Determinação da Viscosidade do caldo de fermentação, em intervalos de 24h, durante um tempo de incubação de 96 horas a 30°C e 210 rpm.

ANEXO V



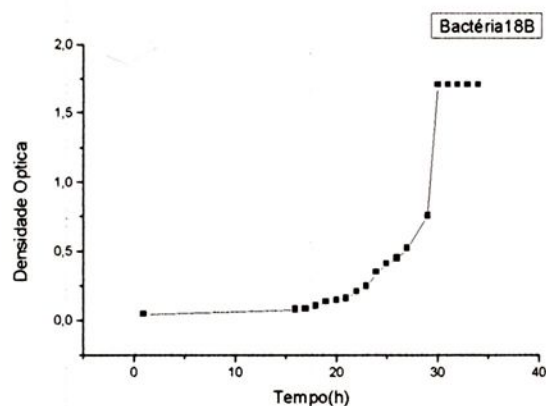
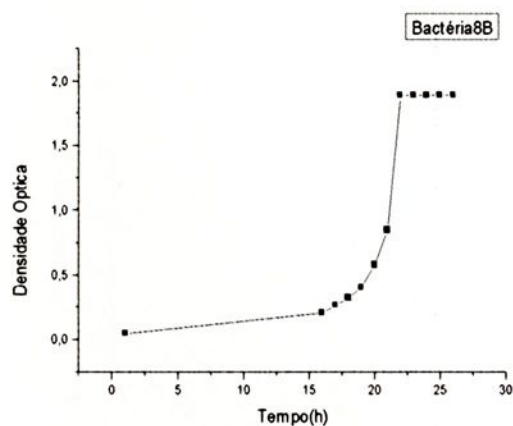
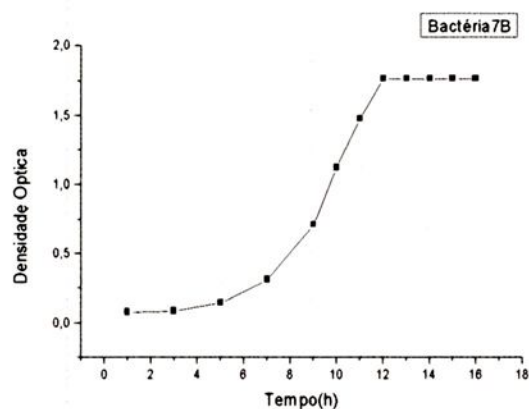
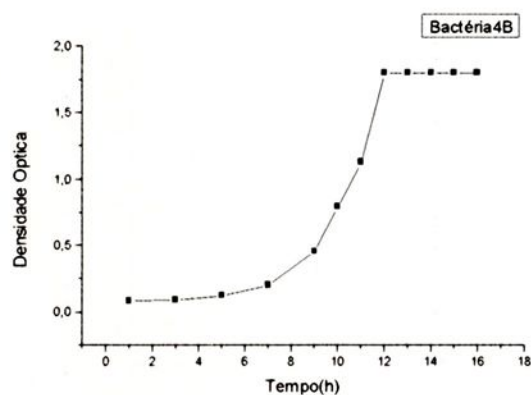
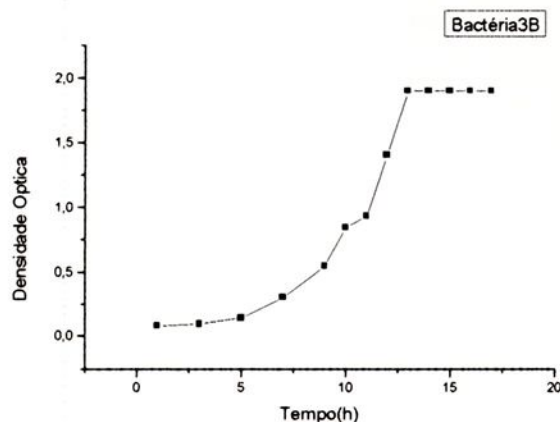
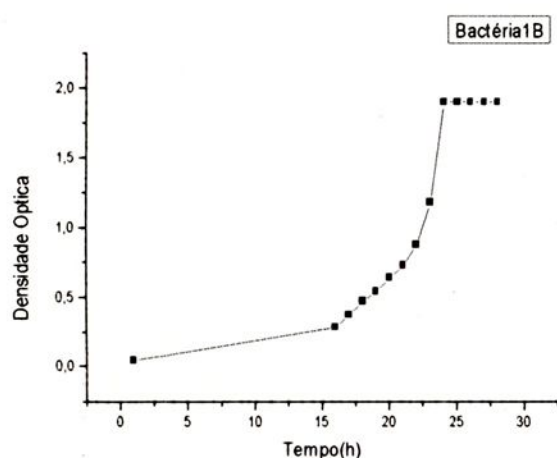


Figura 14 - Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48h a 30°C e 210 rpm medida num espectrofotômetro a 520nm.

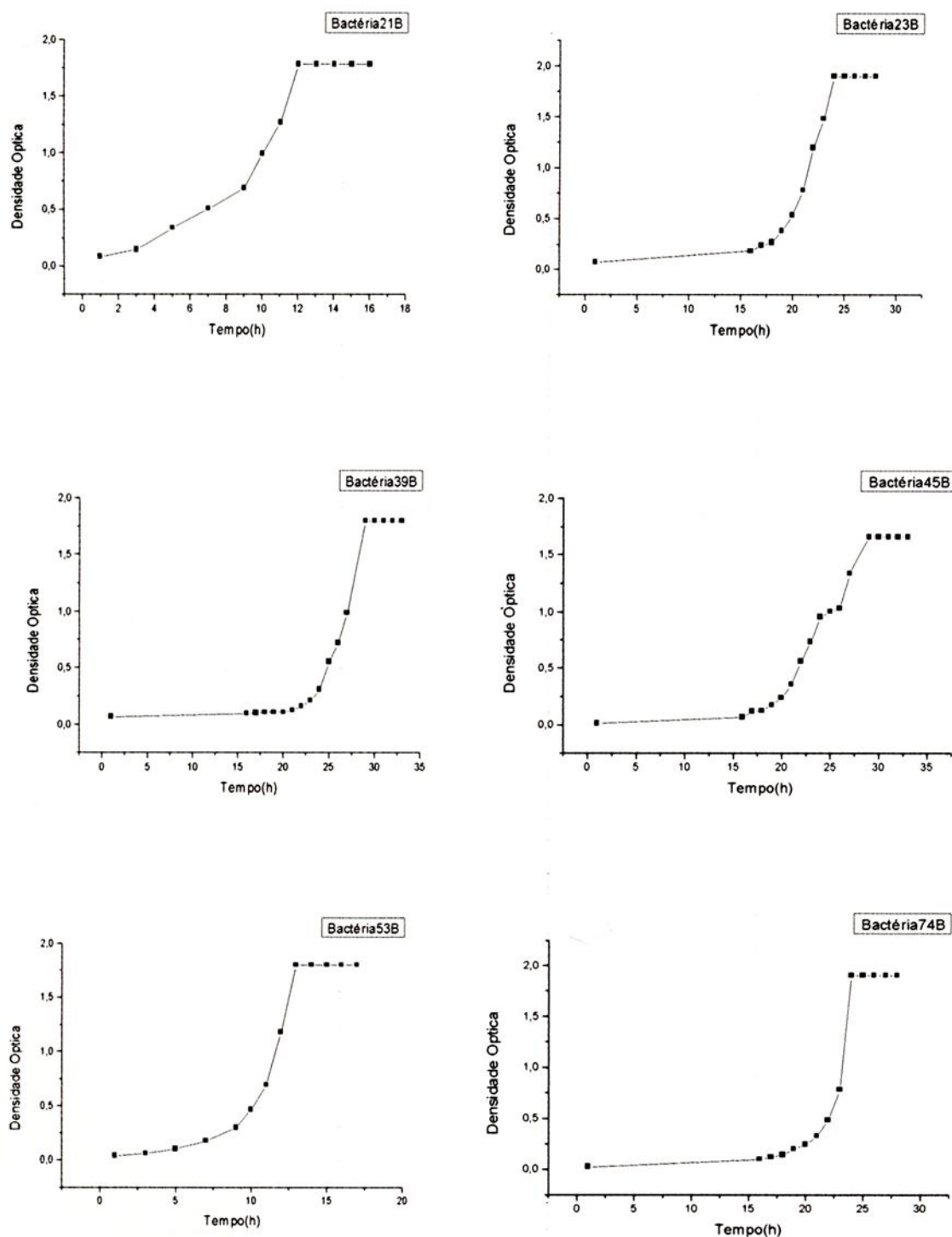


Figura 15 - Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48h a 30°C e 210 rpm medida num espectrofotômetro a 520nm.

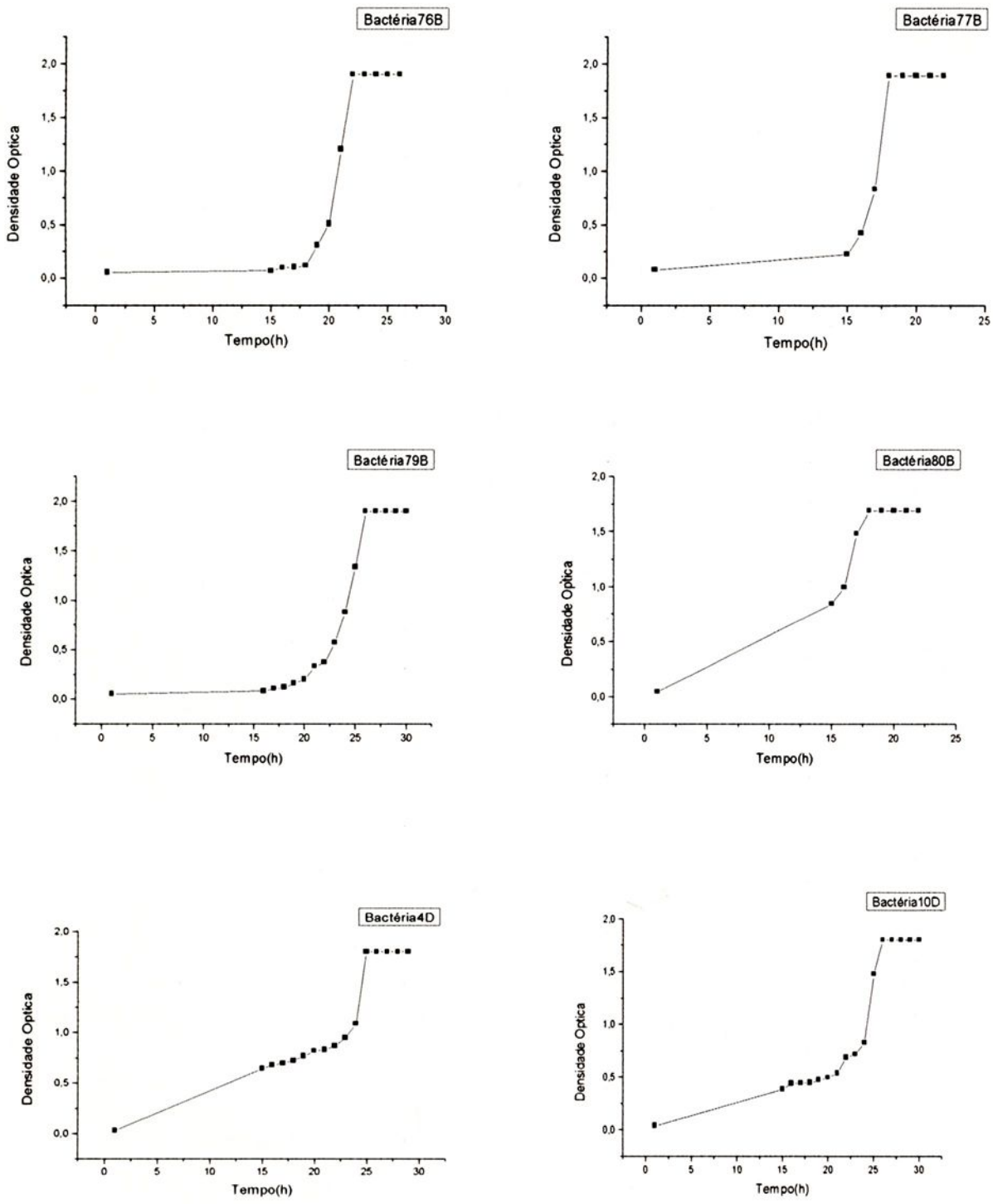


Figura 16 - Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48h a 30°C e 210 rpm medida num espectrofotômetro a 520nm.

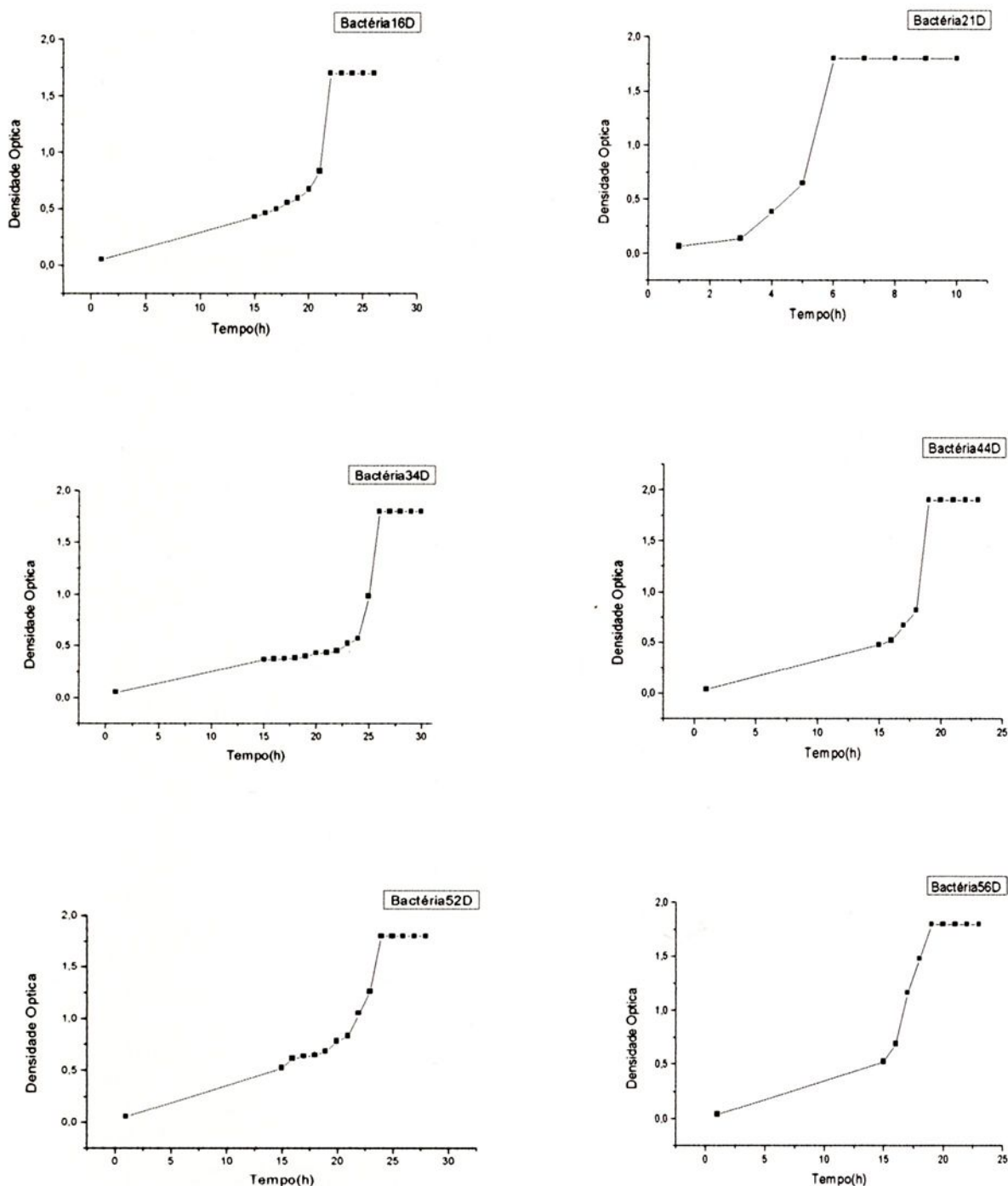


Figura 17 - Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48h a 30°C e 210 rpm medida num espectrofotômetro a 520nm.

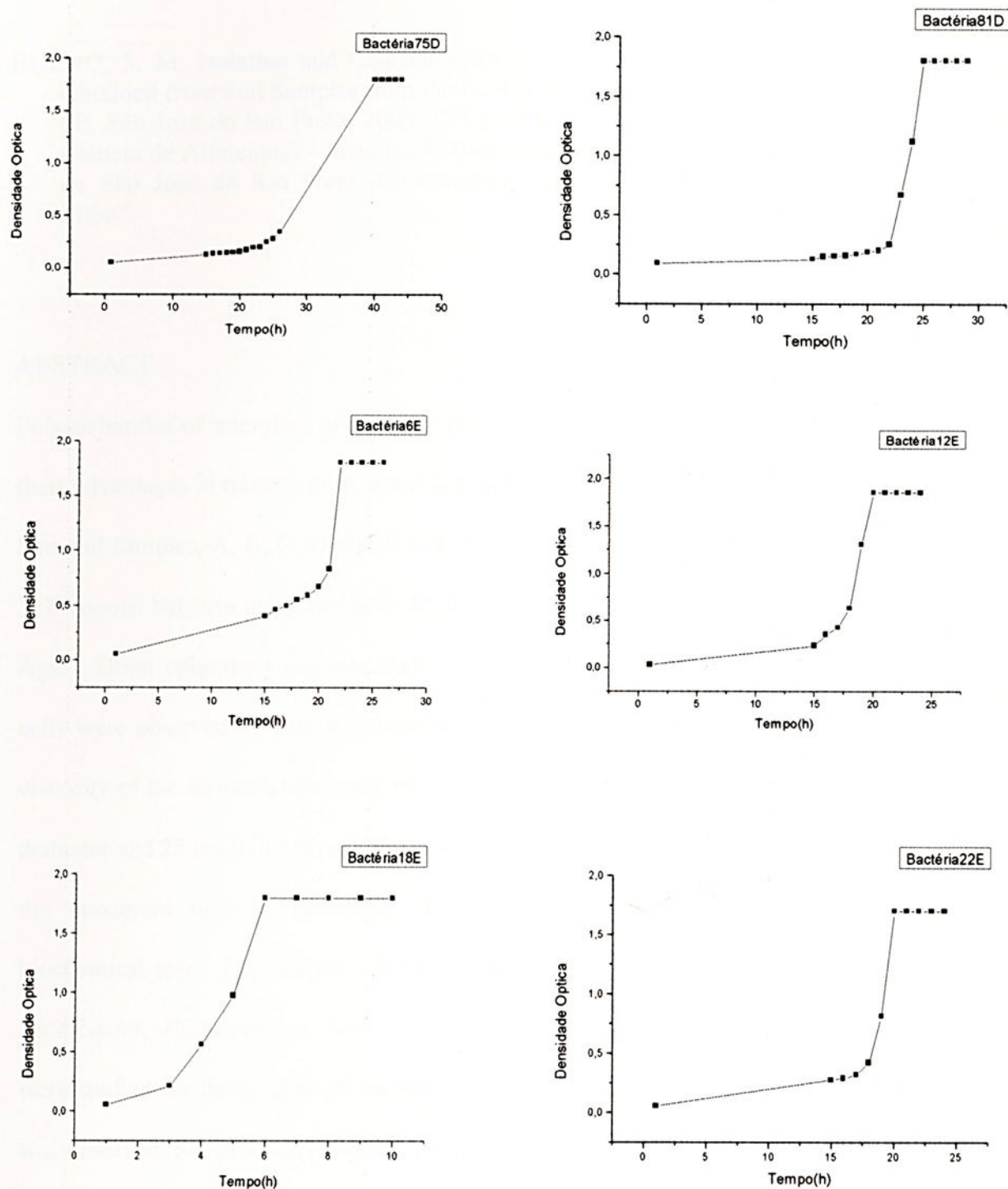


Figura 18 - Representação da cinética de crescimento das bactérias isoladas, durante um tempo de incubação de 48h a 30°C e 210 rpm medida num espectrofotômetro a 520nm.

BUENO, S. M. Isolation and Characterization of Polysaccharide-producing Bacteria Obtained from Soil Samples from the Ecological Station of São José do Rio Preto - SP. São José do Rio Preto, 2000. 155 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Polysaccharides of microbial origin have been extensively studied, as a consequence of their advantages in relation to hydrocolloids derived from algae and plants. In this study five soil samples, A, B, C, D and E were analyzed. From these samples were isolated 322 viscous bacteria using the tube dilution technique and sown in PCA (Plate Count Agar). Gram coloration was undertaken and the morphological characteristics of the cells were observed. A new selection of 178 fast-growing bacteria was made and the viscosity of the fermentation broth was determined through a glass capillary 0,8 cm in diameter and 25 cm in length at 25°C, to obtain the most productive bacteria, as well as the maximum time of incubation. Of these, 30 bacteria were selected for the biochemical tests. The analysis of these results, showed that the genera present are: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*. Growth kinetics were studied for these same 30 bacteria and the time taken to reach maximum growth was observed. Six productive bacteria were selected and identified as belonging to the genera *Pseudomonas* and *Arthrobacter*, which were denominated as: 3B, 4B, 7B, 21B, 18E and 21D. Optimum conditions for polysaccharides production were studied using culture medium containing glucose or sucrose in concentrations 1, 2, 3, 4 and 5% respectively. The effect of the incubation temperature variation was also verified (25,



30 and 35°C) and the effect of different initial pH values (5, 6, 7 and 8) culture medium. The results obtained showed that concentrations of the carbon source up to 2%, pH = 7,0 and a temperature of 30°C presented the best production of polysaccharide. Rheological studies were carried out on the fermentation broth of the bacterium designated as 4B, using a rheometer of concentric cylinders equipped with thermostatic bath. The influence of fermentation time was studied and readings were made after 24, 48 and 72 hours of incubation, using, separately, sucrose and glucose as sources of carbon. The influence of the concentrations of salts was determined in each source of carbon; the salts used were NaCl, KCl and CaCl₂ in concentrations of 0.5; 1.0; 2.0 and 3.0%. It was observed that the fermentation broth behaves as a non-Newtonian fluid presenting pseudoplastic behaviour. Of the carbon sources used, sucrose presented the most viscous broth after 24 and 48 hours, while glucose did so after 72 hours of fermentation. With relation to the effect of the addition of salts, CaCl₂ presented the largest influence on the viscosity of the fermentation broth.

Key-word: Soil bacteria; polysaccharides production; rheology



