

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE ISOLADOS BACTERIANOS PARA USO EM
PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E AGROINDUSTRIAIS**

**Laís Postai Sacco
Tecnóloga em Biocombustíveis**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE ISOLADOS BACTERIANOS PARA USO EM
PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E AGROINDUSTRIAIS**

Laís Postai Sacco

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

2017

S119p Sacco, Laís Postai
Potencial de isolados bacterianos para uso em processos biotecnológicos e agroindustriais / Laís Postai Sacco. -- Jaboticabal, 2017
xix, 96 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Marita Vedovelli Cardozo, Everlon Cid Rigobelo, Celso Antonio Jardim, Suzan Pantaroto de Vasconcellos
Bibliografia

1. Biorremediação. 2. Biofertilizante. 3. Enzimas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:561.23

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

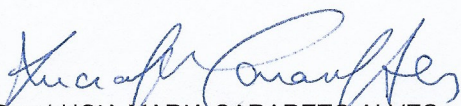
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: POTENCIAL DE ISOLADOS BACTERIANOS PARA USO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E AGROINDUSTRIAIS

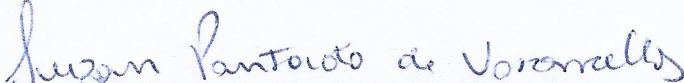
AUTORA: LAÍS POSTAI SACCO

ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. SUZAN PANTAROTO DE VASCONCELLOS
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas / UNIFESP / Diadema/SP



Prof. Dr. CELSO ANTONIO JARDIM
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP



Pós-doutoranda MARITA MEDOVELLI CARDOZO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de junho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LAIS POSTAI SACCO - nascida em 30 de Outubro de 1988, no município de Jaboticabal – SP, é Tecnóloga em Biocombustíveis, formada pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC – Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”) em dezembro de 2010. Em agosto de 2011 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e de Plantas (Departamento de Tecnologia), onde defendeu sua dissertação de mestrado em julho de 2013. Em agosto de 2013 iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e de Plantas (Departamento de Tecnologia). Em 9 de junho de 2017 defendeu sua tese de doutorado em Microbiologia Agropecuária.

Aos meus pais, José Roberto e Maria Lucia.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, pela oportunidade, orientação, paciência, ensinamentos e dedicação.

À Profa. Dra. Eliana Lemos pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e plantas – LBMP.

Ao Dr. João Carlos Campanharo, por sempre me auxiliar.

À Dra. Tereza Cristina Luque Castellane, pelo auxílio e ensinamentos.

Ao Gustavo Costa, pelo companheirismo, paciência, auxílio e apoio.

A todos do laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e plantas – LBMP que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

SUMARIO

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução	1
2. Histórico do estudo.....	1
3. Revisão de Literatura	3
3.1. Exopolissacarídeos	3
3.2. Enzimas proteolíticas.....	5
3.3. Bactérias solubilizadoras de fosfato e promotoras de crescimento vegetal	7
4. Referências bibliográficas.....	10
CAPÍTULO 2 – Characterization and applications of exopolysaccharides from two isolated Pandoraea strains from residue degrading consortia cellulosic biomass	18
1. Introduction.....	19
2. Material and methods.....	20
2.1. Microorganisms and culture conditions	20
2.2. EPS production and extraction	21
2.3. Cell Biomass Determination	21
2.4. Biochemical characterization of the EPS.....	21
2.5. Fourier Transform Infrared analysis	22
2.6. NMR analysis.....	22
2.7. Determination of EPS monosaccharide composition using RP-HPLC	22
2.8. Rheological measurements	23
2.8.1. Steady state flow	23
2.8.2. Oscillatory flow	23
2.9. Applications of EPS	24
2.9.1. Anti-biofilm activity EPS	24
2.9.2. Emulsifying activity	24
2.10. Data Analysis	25
3. Results and discussion.....	25
3.1. EPS production, cell biomass and final pH growth values.....	25
3.2. Spectrum of FTIR analysis	27
3.3. NMR analysis.....	27
3.4. Determination of EPS monosaccharide composition using RP-HPLC	29
3.5. Rheological measurements	30
3.5.1. Steady state flow	31

3.5.2. Oscillatory flow	33
3.6. Emulsifying activity	35
3.7. Anti-biofilm activity EPS	37
4. Conclusions	38
Acknowledgment	39
Conflict of interest	39
References	39
CAPÍTULO 3 – Screening de isolados bacterianos com atividade proteolítica alcalina úteis em processos biotecnológicos	46
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. Material e Métodos	48
2.1. Micro-organismos	48
2.2. Extração da enzima	49
2.3. Determinação da atividade de proteolítica	50
2.4. Análise estatística	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4. Conclusões	52
5. Referências bibliográficas	52
CAPÍTULO 4 – Isolados bacterianos com potencial aplicação agrícola como solubilizadores de fosfato e produtores de auxinas	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. Material e Métodos	58
2.1. Bactérias utilizadas	58
2.2. Capacidade das estirpes em solubilizar fosfato inorgânico insolúvel	59
2.3. Determinação da concentração de fosfato inorgânico solúvel	60
2.4. Quantificação colorimétrica de ácido indol acético	60
2.5. Detecção de compostos indólicos por CLAE	61
2.6. Detecção de ácidos orgânicos	61
2.7. Efeito da inoculação das bactérias no desenvolvimento de plantas	61
2.7.1. Esterelização das sementes	61
2.7.2. Teste em planta.....	62
2.7.3. Análise de micro e macro nutrientes nas plantas.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1. Quantificação de fosfato solubilizado, pH e produção de ácidos orgânicos pelas bactérias	64
3.2. Detecção e quantificação dos compostos indólicos	69
3.3. Teste de desenvolvimento em planta	72
4. Conclusão	83
5. Referências bibliográficas	84
Apêndice	90
CAPÍTULO 5 – Considerações finais	95

POTENCIAL DE ISOLADOS BACTERIANOS PARA USO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E AGROINDUSTRIAIS

RESUMO – Consórcios de bactérias se constituem em comunidades microbianas que podem possuir um conjunto de diferentes vias metabólicas que podem mediar a degradação das diferentes moléculas. Além disso, esses consórcios de micro-organismos podem fornecer enzimas com grande utilidade em processos biotecnológicos aplicados a indústria. Estas enzimas estão sendo amplamente aplicadas em diversos setores da indústria, devido às vantagens como especificidade das enzimas catalizadoras, o baixo custo e, a facilidade de sua produção em larga escala, não produzir efeitos tóxicos nem gerar resíduos tóxicos ao ambiente. Levando em consideração o potencial dos consórcios microbianos e as vantagens das enzimas microbianas em processos biotecnológicos, esse trabalho teve como objetivo a aplicação de bactérias isoladas dos consórcios, em diversos processos biotecnológicos e agroindustriais. Foram utilizados dois consórcios para o isolamento dos micro-organismos provenientes de solo com alta taxa de degradação de biomassa. Os consórcios foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar e carboximetilcelulose (CMC), assim como em outros resíduos da agroindústria como palha de milho, casca de amendoim, originando desta forma outras comunidades as quais foram utilizadas no isolamento de bactérias. Foram estudados dois isolados bacterianos produtores de exopolissacarídeos (EPS), a caracterização destes EPS e aplicação deles em biorremediação ou como agente antibiofilme. Além de serem isoladas bactérias produtoras de proteases, uma enzima muito utilizada na indústria. Foi realizado um *screening* destes isolados bacterianos com atividade proteolítica alcalina e se observou que 4 isolados possuem atividade para ser explorada em diferentes segmentos da indústria e em processos de biorremediação. Observou-se ainda que os isolados bacterianos obtidos têm capacidade de solubilizar fosfato insolúvel, portanto foi realizada a aplicação de bactérias solubilizadoras de fosfato e produtoras de auxinas em sementes de feijão guandu, o que permitiu a seleção de dois isolados promissores para a utilização como inoculantes.

Palavras-chave: biorremediação, biofertilizante, enzimas, exopolissacarídeos

POTENTIAL OF BACTERIAL ISOLATES FOR USE IN BIOTECHNOLOGICAL AND AGRIBUSINESS PROCESSES

ABSTRACT – Bacteria consortia have different microbial communities, which may possess a set of different metabolic pathways that can mediate the degradation of different molecules. In addition, these consortia of microorganisms can provide enzymes with great utility in biotechnological processes applied to industry. These enzymes are being widely applied in various industry sectors, due to the advantages such as the specificity of the catalytic enzymes, the low cost, the ease of its large scale production, and because they do not produce toxic effects nor generate toxic waste to the environment. Taking into account the potential of microbial consortia and the advantages of microbial enzymes in biotechnological processes this study aimed to apply bacteria isolated from the consortia in various biotechnological and agribusiness processes. Two consortia were used to isolate microorganisms isolated from soil with high rate of biomass degradation. The consortia were cultivated in sugarcane bagasse and carboxymethyl cellulose (CMC), as well as other agribusiness residues such as maize straw and peanut shells, thus originating other communities that were used for the isolation of bacteria. The characterization of two bacterial isolates producing exopolysaccharides (EPS), the characterization of these EPS and the application in bioremediation or as an anti biofilm agent were carried out. In addition to being isolated producing-proteases bacteria, it is an enzyme widely used in industry. A screening of these bacterial isolates with alkaline proteolytic activity was carried out and as a result the 4 isolates have activity to be exploited in different segments of the industry and in bioremediation processes. These bacterial isolates have the ability to solubilize insoluble phosphate, therefore the application of phosphate-solubilizing bacteria and auxin producers in pigeon bean seeds were carried out, which allowed the selection of two promising isolates for use as inoculants.

Key-words: bioremediation, biofertilizer, enzymes, exopolysaccharides

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIA** – ácido indol-3-acético
- AIAd** - indol-3-acetaldeído
- ATP** - adenosina trifosfato
- IAN** - indol-3-acetonitrila
- IAM** - indol-3-acetamida
- laaM** – triptofano-2-monooxigenase
- IAOX** - indol-3-acetaldoxima
- ILA** – ácido indol-3-láctico
- IPyA** - indol-3-pirúvico
- EPS** - exopolímeros
- ORFs** - open reading frame
- TAM** - triptamina
- TOL** – indol-3-etanol
- TRP** - triptofano

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O uso da biomassa lignocelulósica é uma opção viável e uma alternativa para a produção de biocombustíveis em substituição aos derivados de petróleo. Os resíduos agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar, as cascas de amendoim, arroz, palha de milho e até mesmo os resíduos florestais são exemplos de materiais derivados de biomassa, ricos em carboidratos, lignina, proteínas, gorduras e, em menor grau, por várias outras substâncias como as vitaminas. Na natureza, os micro-organismos são responsáveis pela degradação da lignocelulose em cooperação (WONGWILAIWALIN et al., 2010).

Existem diferentes comunidades microbianas em um consórcio, e estas podem possuir um conjunto diferente de vias metabólicas que podem mediar a degradação das diferentes moléculas que constituem a biomassa. Além disso, essas comunidades podem fornecer enzimas com grande utilidade em processos biotecnológicos (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2011).

O uso de enzimas microbianas em vários processos biotecnológicos aplicados à indústria tem sido amplamente explorado devido às vantagens relacionadas ao uso desses biocatalisadores em várias transformações químicas. Dentre as características das reações enzimáticas pode-se destacar a especificidade das enzimas catalizadoras, o baixo custo e, a facilidade de sua produção em larga escala. Além disso, as reações das enzimas microbianas permitem estabilidade em processos físicos e químicos, que também podem ser facilmente manipulados e normalmente não produzem efeitos tóxicos nem geram resíduos tóxicos ao ambiente (CUZZI et al., 2011).

2. Histórico do estudo

Nesse trabalho foram utilizados dois consórcios bacterianos para o isolamento de bactérias. O primeiro consórcio foi originado de solo de área de cultivo comercial de cana-de-açúcar com colheita mecanizada, apresentando palhada em

decomposição. O segundo consórcio foi obtido de material retirado do depósito de bagaço de cana-de-açúcar em uma usina de etanol. Os consórcios foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar e carboximetilcelulose (CMC), assim como em outros resíduos da agroindústria como palha de milho, casca de amendoim. Esses cultivos diferenciados originaram outras comunidades as quais foram utilizadas no isolamento de bactérias. Sacco (2013), em sua dissertação de mestrado, isolou bactérias a partir de consórcios degradadores de biomassa, identificou os isolados através de análises do 16S rRNA e avaliou a produção de enzimas como celulasas, amilases, proteases e isolados solubilizadores de fosfato.

Posteriormente, estudos com esses isolados mostraram que eles apresentavam características importantes e aplicáveis em diferentes processos. Dentre as características estudadas verificou-se a produção de grânulos de poli-hidroxialcanoato e compostos com propriedades bioemulsificantes importantes (SACCO et al., 2016). Neste estudo teste de emulsificação com inclusões de PHB nas concentrações de 750 e 3000 µg/ mL das estirpes *Pseudomonas* sp. (AS1) e *Burkholderia* sp. (AB4) demonstraram que esse material tem características que podem contribuir significativamente para as aplicações do processo de emulsificação em biotecnologia ambiental e biorremediação.

Em outro estudo com isolados desse consórcio foi sequenciado o genoma de um isolado, classificado como *Chitinophaga* no qual foram identificadas várias ORFs (Open Reading Frame) que podem ter interesse na melhor caracterização do gênero e na aplicação biotecnológica das enzimas codificadas por eles. Foram observadas sequências de metabolismo de potássio, enxofre e fósforo, aquisição e metabolismo de ferro, metabolismo proteico e de carboidratos (KISHI et al., 2017).

Desta forma outros isolados obtidos do consórcio poderão apresentar características, aplicações distintas e importantes dentro da chamada *White biotechnology*, em que os biocatalisadores (enzimas e micro-organismos) são os principais instrumentos da biotecnologia aplicada nas áreas produtivas.

Levando em consideração o potencial dos consórcios microbianos, as vantagens das enzimas microbianas em processos biotecnológicos, nosso grupo desenvolveu trabalhos que utilizaram consórcios bacterianos degradadores da biomassa para a quebra da lignocelulose e sua utilização, principalmente para a

produção de bioetanol. Esses consórcios são constituídos por bactérias que isoladamente tem potencial para aplicação em biotecnologia, biorremediação e em agronomia. Portanto, nesse trabalho será abordado o estudo de aplicações dos isolados bacterianos dos consórcios em diversas aéreas agroindustriais.

3. Revisão de Literatura

3.1. Exopolissacarídeos

Exopolímeros (EPS) são biopolímeros extracelulares que são produzidos durante o processo metabólico de micro-organismos como bactérias, fungos e algas azul-esverdeadas (AMJRES et al., 2014).

A produção de EPS microbiano apresenta várias vantagens quando comparada ao EPS proveniente de outras fontes: produção em questão de dias, comparado a 3-6 meses no caso das plantas; eficiência energética, no caso das microalgas (utilizam energia solar para a produção); possibilidade de utilização de resíduos industriais como o glicerol, resíduo de hidrocarboneto e CO₂ como fonte de carbono e ausência de concorrência com as terras aráveis. Além disso, os EPSs são naturalmente exsudados pela maioria dos micro-organismos para o ambiente extracelular, facilitando a sua recuperação (DONOT et al., 2012).

Os exopolissacarídeos têm importantes funções ecológicas e fisiológicas, e desempenham papéis especiais na proteção dos micro-organismos que os produzem. Acredita-se que o EPS protege as células contra substâncias antimicrobianas, dessecação, bacteriófagos e estresse osmótico (LAWS; GU; MARSHALL, 2001).

Com relação à constituição bioquímica o EPS é dividido em dois grupos, os homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos, após hidrólise, originam apenas um tipo de unidade de monossacarídeo, por exemplo, celulose, alginato ou dextrana. Os heteropolissacarídeos produzem após hidrólise, mais de um tipo de unidade de monossacarídeos, sendo compostos por unidades repetidas de monossacarídeos, variando de tamanho entre dissacarídeos a

heptasacarídeos, por exemplo, xantana, ácido hialurônico, heparina (HUSSAIN et al., 2017).

O interesse em EPS aumentou consideravelmente nos últimos anos porque estes compostos são candidatos para muitas aplicações comerciais nos setores de saúde, bionanotecnologia, alimentos, cosmético e meio ambiente (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014). Um exemplo de heteropolissacarídeo com diversas aplicações é a goma xantana, produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas* durante o cultivo aeróbio, é utilizada em várias áreas como elemento espessante. A goma xantana é o primeiro biopolímero natural produzido em escala industrial (KRSTONOSIC et al., 2015). Essa goma é composta por glicose, manose; e ácidos glucurônico, pirúvico e acético. Além disso, esse polímero é resistente a variações de pH (CHIVERO et al., 2015).

As propriedades do EPS são influenciadas pela sua composição, que é afetada pela disponibilidade de nutrientes, bem como outros fatores, tais como a sua massa molecular e a localização de grupos funcionais (SARDARI et al., 2017). As estruturas químicas únicas e complexas do EPS, que são polímeros com diferentes propriedades funcionais, os tornam interessantes para várias aplicações industriais como no processamento de alimentos, no setor farmacêutico e de petróleo (CASTELLANE, LEMOS; LEMOS, 2014).

Vários polissacarídeos microbianos são utilizados como bioemulsificantes devido a sua capacidade de estabilizar a mistura entre água e compostos hidrofóbicos. Bioemulsificadores são facilmente biodegradáveis, menos tóxicos, e têm atividade sob uma variedade ampla de condições, quando comparado aos emulsificadores químicos. Além disso, as propriedades emulsificantes e estabilizadoras do EPS ampliam o espectro de potenciais aplicações na indústria de óleo e petróleo, biorremediação do solo e da água (KANMANI et al., 2013).

Moretto et al. (2015) estudaram a atividade emulsificante utilizando o EPS das bactérias *Rhizobium tropici*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer* sp., *Rhizobium* sp., e estes foram capazes de emulsificar azeite, óleo de girassol, óleo de soja, hexano, tolueno e óleo diesel. Do mesmo modo, Meneghine et al. (2016) isolaram uma *Sphingomonas* sp. C7 de água doce cujo EPS foi caracterizado e apresentou

propriedades emulsificantes, apresentando um índice de emulsificação de 70% para gasolina, querosene e óleo residual de fritura.

Outra característica do EPS está relacionada ao biofilme. Biofilmes formados por bactérias potencialmente patogênicas são considerados uma causa importante de infecções crônicas e recorrentes, particularmente devido a sua capacidade de aderir em superfícies médicas (VALLE et al., 2006). Os biofilmes bacterianos são comunidades de micro-organismos que vivem numa matriz autoproduzida composta de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (KAVITA et al., 2014). O EPS é um componente comum do biofilme e sua produção é uma característica importante do biofilme. Em várias bactérias, o aumento da formação de biofilme está sempre correlacionado com o aumento da produção de EPS. Durante o processo de formação de biofilme, utilizando polímeros de EPS, células bacterianas iniciam a adesão à superfície, e o desenvolvimento de micro colônias (JIANG et al., 2011).

Por outro lado existem EPS com atividade antibiofilme, estes exopolissacarídeos atuam como biossurfactantes, modificando as propriedades físico-químicas das superfícies e alterando as interações bacterianas dentro de biofilmes mistos (GONCALVES et al., 2014). Kanmani et al. (2011) relataram que o EPS do *Streptococcus phocae* PI80 tem a habilidade de inibir a formação de biofilme de bactérias patogênicas.

3.2 Enzimas proteolíticas

Enzimas são substâncias ou macromoléculas biológicas produzidas por um organismo vivo que atua como um catalisador para provocar uma reação bioquímica específica. São como os catalisadores em uma reação química que ajudam a acelerar as reações biológicas / bioquímicas (GURUNG et al., 2013). Além disso, enzimas podem ser selecionadas geneticamente e podem ser quimicamente modificadas para melhorar suas principais propriedades: estabilidade, substrato-especificidade e atividade específica (ADRIO; DEMAIN, 2014). Atualmente as enzimas são utilizadas em várias áreas tais como na fabricação de alimentos, cosméticos, produtos medicinais, e como ferramenta de pesquisa e desenvolvimento (BINOD et al., 2013).

Um grupo de enzimas muito utilizado na indústria são as proteases, são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de proteínas por clivagem de ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos. As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, mais de 65% do mercado total de enzimas industriais (IBRAHIM et al., 2015).

As proteases microbianas são classificadas em vários grupos, dependendo se eles são ativos em condições ácidas, neutras ou alcalinas, e sobre as características do sítio ativo da enzima como, metalo (EC.3.4.24), aspártico (EC.3.4.23), cisteína ou sulfidrilo (EC.3.4.22) ou serina (EC.3.4.21) (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Baseado em seu comportamento ácido-base, as proteases são classificadas em 3 grupos, proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm melhor desempenho entre pH 2,0-5,0 e na maioria das vezes são produzidas por fungos. Proteases que tem um pH 7 como ótimo são chamados de proteases neutras, e geralmente são de origem vegetal. Enquanto proteases com atividade ótima na faixa de pH 8 ou mais são classificadas como alcalinas (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Os micro-organismos do solo produzem proteases para reciclar matéria orgânica do solo, garantindo assim a nutrição microbiana. As proteases também desempenham um papel nas interações dos organismos do solo através da clivagem das proteínas da parede celular. O pH catalítico ideal das proteases microbianas varia de 3,0 a 12, sendo que a maioria dos micro-organismos isolados de solos possuem atividades de protease ótima em pH 8-9 e a temperaturas de 40 a 60°C (VRANOVA; REJSEK; FORMANEK, 2013). Alguns gêneros bacterianos reconhecidamente proeminentes na produção de proteases alcalinas são: *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Lactobacillus* (JISHA et al., 2013).

As proteases alcalinas bacterianas têm mais importância comercial nas indústrias de lavanderia, alimentos, couro e seda; devido a sua elevada capacidade de produção e atividade catalítica, além disso, tornam adequadas para a utilização na indústria de detergentes. Na indústria de detergentes para roupas, as proteases ajudam a remover manchas das roupas com base em proteínas. Na indústria têxtil as proteases podem ser utilizadas para retirar a camada de goma rígida de sericina a partir da fibra de seda crua para obter melhor brilho e suavidade. Tratamentos com

protease podem modificar a superfície de fibras de lã e seda para fornecer acabamentos novos e exclusivos (NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005).

O processamento do couro envolve vários passos como imersão, retirada de pelos e curtimento. Os métodos convencionais da indústria de couro envolvem produtos químicos perigosos. O uso de enzimas como alternativa aos produtos químicos melhorou a qualidade do couro e reduziu a poluição ambiental. As proteases são utilizadas para a hidrólise seletiva de constituintes não colagenosos da pele e para a remoção de proteínas não fibrilares tais como albuminas e globulinas (JISHA et al., 2013).

Na indústria de alimentos, as proteases alcalinas têm sido utilizadas na preparação de hidrolisados de proteínas de elevado valor nutritivo. Os hidrolisados proteicos são utilizados em formulações alimentares infantis, produtos dietéticos terapêuticos específicos e fortificação de sucos de fruta (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.3. Bactérias solubilizadoras de fosfato e promotoras de crescimento vegetal

O fósforo é um dos principais macronutrientes para as células vivas, ele é essencial para o crescimento e desenvolvimento biológico. Depois do nitrogênio é o macro nutriente mais importante para o crescimento das plantas e representa aproximadamente 0,2% do peso seco desses organismos. As plantas obtêm do solo o fósforo para suas necessidades metabólicas (BEHERA et al., 2014).

Regiões com clima tropical e subtropical geralmente apresentam solos ácidos, os quais são considerados extremamente deficientes em fósforo (INGLE; PADOLE, 2017). Os solos contêm muito pouco fósforo (0,02-0,05%) dos quais apenas 0,1% está disponível para as plantas, assim, na agricultura o fósforo é aplicado no solo como fertilizantes fosfatados solúveis para melhorar o desenvolvimento vegetal e a produção em geral. Entretanto, nesse processo de fertilização, apenas uma pequena quantidade (1%) é utilizada pelas plantas e o restante (-99%) é rapidamente convertido em complexos insolúveis; devido a reações de precipitação com Al^{+3} e Fe^{+3} em solos ácidos e Ca^{+2} em solos calcários

(ABBASI; MUSA; MANZOOR, 2015). Conseqüentemente, as grandes quantidades de fertilizantes fosfatados que são utilizadas para aumentar o crescimento das plantas causam impacto negativo no que se diz respeito ao ambiente e economia. A eutrofização das águas superficiais é um dos principais problemas que podem ser causados pelo excesso de fertilizantes fosfatados aplicados nos sistemas agrícolas (PARK et al., 2011).

Por outro lado é conhecido o papel de diversos micro-organismos do solo e água que participam da transformação dos principais elementos químicos na natureza. Com relação ao fósforo sabe-se que existem populações de micro-organismos (bactérias e fungos) solubilizadores de fosfato no solo e na rizosfera das plantas. Esses micro-organismos solubilizadores de fosfato têm atraído atenção dos pesquisadores e produtores agrícolas por sua possibilidade de ser usado como inoculantes do solo para melhorar o crescimento e o rendimento da planta pela liberação de fosfatos que se encontram de formas químicas indisponíveis para elas (BEHERA et al., 2014).

As bactérias solubilizadoras de fosfato pertencem a vários gêneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Acromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterococcus* e *Enterobacter* (ANZUAY et al., 2015).

O principal mecanismo das bactérias solubilizadoras de fosfato é a diminuição do pH do ambiente através da produção de ácidos orgânicos. Estes ácidos orgânicos carregam grupos hidroxil e carboxil que quelam cátions (Al, Fe, Ca) ligados ao fosfato, tornando-os solúveis por desprendimento desses cátions. Dentre os ácidos orgânicos sintetizados pelas bactérias solubilizadoras de fosfato, o ácido indol-3-acético (AIA) é o mais importante (SHAHID et al., 2015).

O ácido indol-3-acético, cuja biossíntese requer como precursor o L-triptofano, é a mais importante auxina e regula várias funções fisiológicas e morfológicas nas plantas (GLICK, 2012). Este fito hormônio desempenha um papel central na divisão celular, alongamento, desenvolvimento de frutos e senescência. O AIA é transportado através do floema, formando gradientes de concentração e acumulando em diferentes tecidos (DUCA et al., 2014).

Duas vias principais para a biossíntese do AIA foram propostas em plantas, a via independente de triptofano e a via dependente de triptofano. Na biossíntese independente de triptofano indol-3-glicerol fosfato ou indolo é o precursor provável, mas pouco se sabe sobre a via bioquímica para AIA. Na biossíntese dependente de triptofano, várias rotas têm sido postuladas: a rota do indol-3-acetamida (IAM), a rota do ácido indol-3-piruvico (IPyA), triptamina (TAM) e a rota do Indol-3-acetaldoxima (IAOX) (MANO; NEMOTO, 2012).

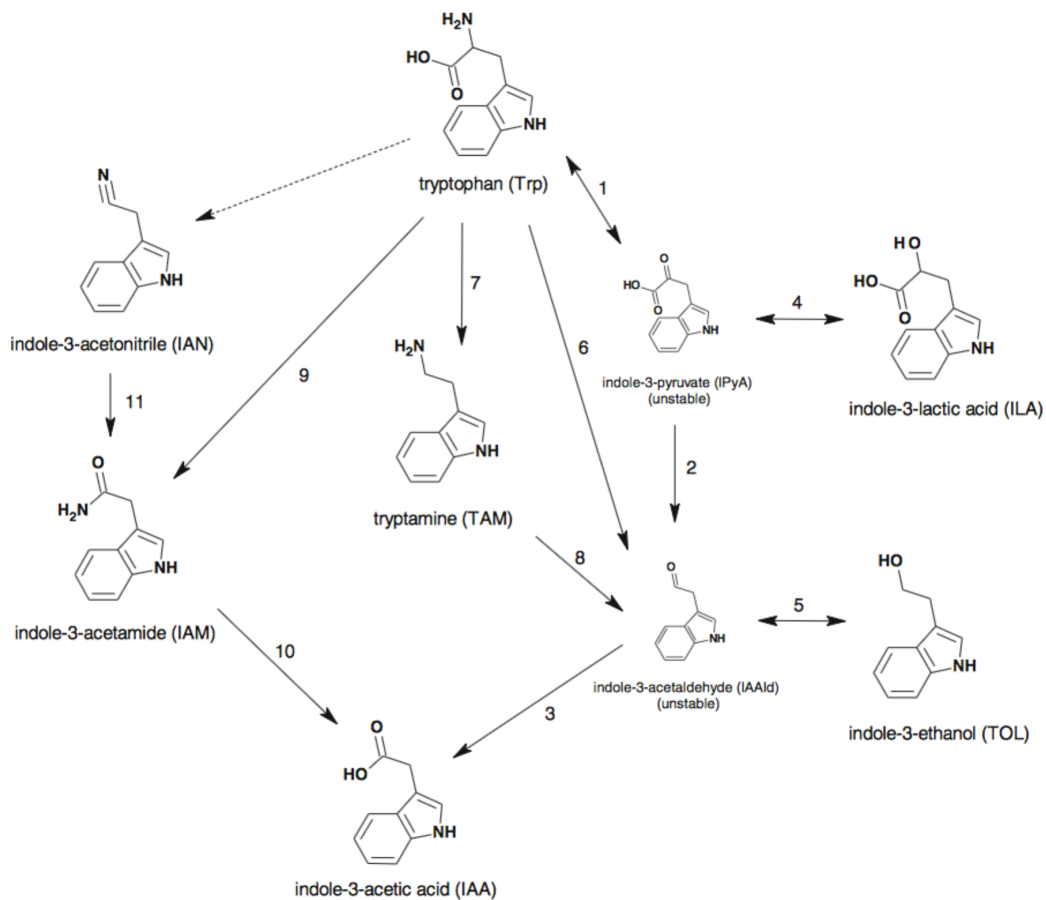


Figura 1: Diagrama simplificado das vias dependentes de triptofano para a biossíntese de AIA em bactérias. Fonte: SZKOP; BIELAWSKI, 2013

Estudos *in vitro* demonstraram que alguns micro-organismos podem produzir pequenas quantidades de auxinas na ausência do triptofano; entretanto, na presença, os micro-organismos produzem quantidades muito maiores de auxinas (NAVEED et al., 2015). As três principais vias biossintéticas do AIA, relatadas em bactérias, são as do ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetaldeído e indol-3-acetonitrila

(DUCA et al., 2014). A rota do ácido indol-3-pirúvico (IPyA) é a principal via de biossíntese de AIA em plantas. Em bactérias a produção de AIA pela rota do IPyA é descrito em uma ampla variedade de micro-organismos como a bactéria fito patogênica *Pantoea Agglomerans*, e as bactérias benéficas como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Enterobacter cloacae*. A primeira etapa nessa rota é a conversão do triptofano em IPyA por uma aminotransferase. Depois o IPyA é descarboxilado em indol-3-acetaldeído (AIAd) pela Indol-3-piruvato descarboxilase, e na última etapa o AIAd é oxidado em AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

A produção de AIA pela rota do ácido indol-3-acetaldeído (IAM) acontece em duas etapas. Primeiro o triptofano é convertido em IAM pela enzima triptofano-2-monooxigenase (Iaam). Na segunda etapa, o IAM é convertido em AIA pela IAM hidrolase (Iaah) (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). O AIA produzido pela via do IAM por bactérias fito patogênicas induz a formação de tumores e galhas nas plantas (LAMBRECHT; OKON; VANDE BROEK, 2000).

O caminho do indol-3-acetonitrila (IAN) tem sido amplamente estudado em plantas. A última etapa nesse caminho é a conversão do IAN em AIA por uma nitriase (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Essa auxina funciona em respostas de defesa das plantas contra tensões bióticas (HANSEN; HALKIER, 2005).

Galdiano Júnior et al. (2011) isolaram bactérias produtoras de auxinas da raiz da *Cattleya walkeriana*. Estes isolados pertencem aos gêneros *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp. e foi detectada as auxinas ácido indol-3-acético, indol-3-láctico, indol-3-acetaldeído e ácido indol-3-piruvico.

4. Referências bibliográficas

ABBASI, M. K.; MUSA, N.; MANZOOR, M. Mineralization of soluble P fertilizers and insoluble rock phosphate in response to phosphate-solubilizing bacteria and poultry manure and their effect on the growth and P utilization efficiency of chilli (*Capsicum annuum* L.). **Biogeosciences**, v. 12, p. 4607–4619, 2015. Disponível em: <10.5194/bg-12-4607-2015>.

ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v.4, n.1, p. 117-139, 2014. Acesso em: < <http://dx.doi.org/10.3390/biom4010117>>.

AHEMAD, M. Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. **3 Biotech**, v. 5, p. 111–121, 2015. Disponível em:< [10.1007/s13205-014-0206-0](http://dx.doi.org/10.1007/s13205-014-0206-0)>.

AMJRES, H.; BÉJAR, V.; QUESADA, E.; CARRANZA, D.; ABRINI, J.; SINQUIN, C. Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonasstenophila* HK30. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72,p.117–124,2014.Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052>>.

ANZUAY, M. S.; LUDUENA, L. M.; ANGELINI, J. G.; FABRA, A.; TAURIAN, T. Beneficial effects of native phosphate solubilizing bacteria on peanut (*Arachis hypogaea* L) growth and phosphorus acquisition. *Symbiosis*, V. 66, n. 2, p. 89-97, 2015. Disponível em: < DOI: [10.1007/s13199-015-0337-z](http://dx.doi.org/10.1007/s13199-015-0337-z)>.

BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97-110, 2014. Disponível em: < <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>>.

BINOD, P.; PALKHIWALA, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes – Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286.

CASTELLANE, T. C. L., LEMOS, M. V. F., LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.066>>.

CHIVERO, P.; GOHTANI, S.; YOSHII, H.; NAKAMURA, A. Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions. **Food Research International**, v.70, p. 7-14, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.025>>.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S.B.; Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de bactérias de *Baccharis dracunculifolia* d.c (ASTERACEA). **Global Science Technology**, v. 4, p. 56-68, 2011.

CHUNG, H.; PARK, M.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; SONG, J.; CHO, H.; SA, T. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biology Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1970–1974, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.025>>.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>>.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014. Disponível em: < DOI: 10.1007/s10482-013-0095-y>.

FU, Y.; ZU, Y.; LIU, W.; EFFERTH, T.; ZHANG, N.; LIU, X.; KONG, Y. Optimization of luteolin separation from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves by macroporous resins. **Journal of Chromatography**, v. 1137, n. 2, p. 145-152, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.067>>.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 729-737, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000300008>>.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>>.

GONCALVES, M. S.; DELATTRE, C.; BALESTRINO, D.; CHARBONNEL, N.; ELBOUTACHFAITI, R.; WADOUACHI, A.; BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P.; FORESTIER, C. Anti-Biofilm Activity: A Function of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide. **Plos One**, v.9, n.6, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099995>>.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002. Disponível em: < DOI 10.1007/s00253-002-0975-y>.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-18, 2013. Acesso em:< <http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121>>.

HANSEN, B. G.; HALKIER, B. A. New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 221, n. 5, p.603-606, 2005. Disponível em:< DOI: 10.1007/s00425-005-1553-1>.

HUSSAIN, A.; ZIA, K. M.; TABASUM, S.; NOREEN, A.; ALI, M.; IQBAL, R.; ZUBER, M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10–27, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>>.

IBRAHIM, A. S. S.; AL-SALAMAH, A. A.; EL-BEDAWI, Y. B.; EL-TAYEB, M. A.; ANTRANIKIAN, G. Detergent, solvent and salt compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization. **Extremophiles**, v. 19, n. 5, p. 961-971, 2015. Disponível em: < [doi:10.1007/s00792-015-0771-0](https://doi.org/10.1007/s00792-015-0771-0)>.

INGLE, K. P.; PADOLE, D. A. Phosphate Solubilizing Microbes: An Overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 844-852, 2017.

IQBAL, A.; HASNAIN, S. Auxin Producing *Pseudomonas* Strains: Biological Candidates to Modulate the Growth of *Triticum aestivum* Beneficially. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 1693-1700, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.49206>>.

JIANG, P.; LI, J.; HAN, F.; DUAN, G.; LU, X.; GU, Y.; YU, W. Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from Marine Bacterium *Vibrio* sp. QY101. **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011. Disponível em:< <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018514>>.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2013.13005>>.

KANMANI, P.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4827–4833, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.118>>.

KANMANI, P.; SUGANYA, K.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PATTUKUMAR, V.; PAARI, K. A.; ARUL, V. Synthesis and Functional Characterization of Antibiofilm Exopolysaccharide Produced by *Enterococcus faecium* MC13 Isolated from the Gut of Fish. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 169, n. 3, p. 1001–1015, 2013. Disponível em: <DOI 10.1007/s12010-012-0074-1>.

KAVITA, K.; SINGH, V. K.; MISHRA, A.; JHA, B. Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 29-35, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.099>>.

KRSTONOSIC, V.; DOKIC, L.; NIKOLIC, I.; MILANOVIC, M. Influence of xanthan gum on oil-in-water emulsion characteristics stabilized by OSA starch. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 9-17, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.024>>.

KISHI, L. T.; LOPES, E. M.; FERNANDES, C. C.; FERNANDES, G. C.; SACCO, L. P.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Draft Genome Sequence of a *Chitinophaga* Strain Isolated from a Lignocellulose Biomass-Degrading Consortium. **Genome Announcements**, v. 5, n. 3, p. 1-2, 2017. Disponível em: < doi: 10.1128/genomeA.01056-16>.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interaction. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01732-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01732-7)>.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 597–625, 2001. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00084-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00084-2)>.

LI, G. Y.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; YIN, J. A novel nonionic surfactant- and solvent-stable alkaline serine protease from *Serratia* sp. SYBC H with duckweed as nitrogen source: production, purification, characteristics and application. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 845–853, 2011. Disponível em: < DOI: 10.1007/s10295-010-0855-x>.

MANO, Y., NEMOTO, K. The pathway of auxin biosynthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 1-20, 2012. Acesso em: < [doi:10.1093/jxb/ers091](http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers091)>.

MENEGHINE, A. K.; MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; ALVES, L. M. C. Production, Characterization and Bioemulsifying Activity of an Exopolysaccharide Produced by *Sphingomonas* sp. Isolated from Freshwater. **Journal of Polymers Environment**, p. 1-7, 2016. Disponível em: < [doi:10.1007/s10924-016-0878-0](http://dx.doi.org/10.1007/s10924-016-0878-0)>.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; OMORI, W. P.; SACCO, L. P.; LEMOS, E. G. M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291–298, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.056>>.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 197-203, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582005000200009>>.

NAVEED, M.; QURESHI, M. A.; ZAHIR, A. Z.; HUSSAIN, M. B.; SESSITSCH, A.; MITTER, B. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonizations of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Annals Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1381-1389, 2015. Disponível em: < DOI: 10.1007/s13213-014-0976-y>.

PANHWAR, Q. A.; NAHER, U. A.; JUSOP, S.; OTHMAN, R.; LATIF, M. A.; ISMAIL, M. R. Biochemical and Molecular Characterization of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria in Acid Sulfate Soils and Their Beneficial Effects on Rice Growth. **Plos One**, v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>>.

PARK, J.H.; BOLAN, N.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2-3, p. 829-836, 2011. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.095>>.

SACCO, L.P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SACCO, L. P.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, L. M. C. Properties of Polyhydroxyalkanoate Granules and Bioemulsifiers from *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. Isolates Growing on Glucose. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 178, p. 990–1001, 2016. Disponível em: < DOI 10.1007/s12010-015-1923-5>.

SARDARI, R. R. R.; KULCINSKAJA, E.; RON, E. Y. C.; BJORNSDOTTIR, S.; FROJONSSON, O. H.; HREGGVIOSON, G. O.; KARLSSON, E. N. Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. **Carbohydrate polymers**, v.156, p.1-8, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.062>>.

SHAHID, M.; HAMEED, S.; TARIQ, M.; ZAFAR, M.; ALI, A.; AHMAD, N. Characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria for enhanced sunflower growth and yield-attributing traits. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1525-1536. Disponível em: <DOI 10.1007/s13213-014-0991-z>.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007. Acesso em: < DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>.

VALLE, J.; RE, S. DA.; HENRY, N.; FONTAINE, T.; BALESTRINO, D.; LATOUR-LAMBERT, P.; GHIGO, J.M. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12558–12563, 2006. Disponível em: < doi: 10.1073/pnas.0605399103>.

TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E; GRATIVOL, A.D. Bacterial biodegradation of petroleum and oil compounds. **Revista Virtual Química**, v. 2, p. 78-87, 2011. Acesso em: < doi: 10.5935/1984-6835.20110013>.

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 23-32, 2013. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.003>.

WONGWILAIWALIN, S.; RATTANACHIMSRI, U.; LAOTHANACHAREON, T.; EURWILAICHTR, L.; IGARASHI, Y.; CHAMPREDA, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 6, p. 283-290, 2010. Disponível em: < http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.07.013>.

CAPÍTULO 2- Characterization and applications of exopolysaccharides from two isolated *Pandoraea* strains from residue degrading consortia cellulosic biomass

Laís Postai Sacco; Tereza Cristina Luque Castellane; Tiago Carregari Polachini, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos; Lucia Maria Carareto Alves.

Artigo submetido para a revista: FEMS Microbiology Letters

Abstract

Little information is available on the biotechnological properties of exopolysaccharides (EPS) from the species within the Burkholderiaceae family, such as *Pandoraea* species. For this reason, the rheological, chemical and Infrared (IR) spectroscopy with Attenuated Total Reflection (ATR) studies for two strains belonging to the genus *Pandoraea* were carried out. The anti-biofilm activity and emulsifying activity of these two strains were then investigated. The EPS from both strains are heteropolysaccharides composed of six monosaccharides with different functional groups, with carbonyl and hydroxyl groups identified as the preeminent functional groups in the purified EPS. The EPS produced by the *Pandorea pnomenusa* MS5 inhibited biofilm production by the pathogenic strain *Burkholderia cepacia*. The polymers showed non-Newtonian fluid characteristics such as shear-thinning and gel-like behavior in aqueous solutions, and both EPS demonstrated hydrocarbon/oil emulsifying capabilities. These results demonstrate that the EPS of *P. pnomenusa* strains could be attractive for use in industrial and environmental applications.

Key words: Antibiofilm; bioemulsifier; biopolymer; bioremediation; pseudoplastic; rheological properties.

1. Introduction

Members of the *Pandoraea* genus (*Pandoraea apista*, *Pandoraea pnomenusa*, *Pandoraea norimbergensis*, *Pandoraea pulmonicola* and *Pandoraea sputorum*) belonging to the β -Proteobacteria class were described by Coenye et al. (2000), and are often mistakenly identified as *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) or *Ralstonia* species (SCHNEIDER; QUEENAN; BAUERNFEIND, 2006). *Pandoraea* species have been found in clinical samples including blood, water, food, powdered milk, soil, and sludge (COENYE et al., 2000), and some of these species are able to produce various biopolymers such as exopolysaccharides (EPS), a mucilaginous material with biological and biotechnological importance (HUSSAIN et al., 2017). EPS from bacteria form a disperse coating around the cells which contributes to bacterial protection against a variety of environmental stress (KIELAK et al., 2017), and several other biological processes (e.g. infection) (HERASIMENKA et al., 2007).

EPS can be easily separated from the cell by centrifugation or filtration. For most microbial EPS, their biosynthesis process can be divided into: assimilation of a carbon substrate; intracellular synthesis of polysaccharides; and EPS exudation of the cell (LIU et al., 2016). In general, EPS have been divided into two classes based on their composition and biosynthesis: the heteropolysaccharides which consist of multiple sugar types and are synthesized by the combined action of different types of glycosyltransferase enzymes, and homopolysaccharides which are made up of a single type of monosaccharide, like dextran or levan (DONOT et al., 2012). The physicochemical, biological and biotechnological properties of EPS depend on their primary structure, molecular mass, and sugar composition (POLI; ANZELMO; NICOLAUS, 2010).

Microbial EPS exhibit several biological functions, such as cell support in various functions, protection from biotic stress, competition, and abiotic stress that might include temperature, light intensity or pH (DONOT et al., 2012). In addition to this biological importance, EPS produced by different bacteria are also used in a large range of commercial applications in food production, packaging, textiles, cosmetics, pharmaceuticals and the chemical industry (WANG et al., 2008).

In the past five years, some researchers have revealed rhizobia as effective producers of EPS with biosurfactant and bioemulsifier properties (CASTELLANE et al., 2015),(MORETTO et al., 2015),(CASTELLANE et al., 2017) as well as the *Sphingomonas* sp (MENECHINE et al., 2016). They are more advantageous than the chemically synthesized molecules mainly because of biodegradability, generally low toxicity, and their ability to be produced from cheap, raw materials which are available in large quantities. In addition, they can remain effective even at extreme conditions of pH, temperature, and salinity (BUTT; BUTT, 2016).

Furthermore, some studies suggest that microbial EPS can perform functions that inhibit or destabilize the biofilm of different bacteria, indicating an essential role in microbial competition (RENDUELES; KAPLAN; GHIGO, 2013).

Given that there are no reports about the characterization and applications of exopolysaccharides from *Pandoraea* genus, the aim of this study was the preliminary characterization of EPS produced by two *Pandoraea* strains isolated from residue containing decomposing cellulosic biomass, using chemical, chromatographic and spectroscopic techniques. We also aimed to investigate some important properties, such as EPS antibiofilm potential against the *Burkholderia cepacia* pathogenic bacterium, and emulsifying activity for their future industrial applications.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

For this study, AS3 and MS5 *Pandoraea pnomenua* (*P. pnomenua*) strains were isolated from a bacterial consortium isolated from soil containing decomposing sugar cane bagasse (SACCO, 2013). These isolates were previously identified by sequence analyses of the 16S rDNA, compared with international databases and subsequently analyzed using BlastN. The 16S rRNA gene sequences from AS3 and MS5 were deposited in the NCBI Genbank with accession numbers KP076215 and KP233818, respectively.

2.2. EPS production and extraction

The isolates were initially cultivated in previously optimized EPS-producing liquid medium PGY (CASTELLANE et al., 2017), containing 10 g L⁻¹ glycerol at an initial pH of 6.9, 30°C, with 150 rpm shaking for 24 hours. For the evaluation of EPS production, aliquots of the corresponding cultures were transferred to Erlenmeyer flasks containing liquid PSY at a final concentration of 10% (v/v) according to Castellane et al. (2015b).

After 96h of incubation, the bacterial suspensions were centrifuged at 12000 x g, 4°C, for 50 minutes. Cold 96% ethanol was added to the supernatant obtained after centrifugation at an ethanol to supernatant ratio of 3:1 (v/v) to precipitate the EPS (BREEDVELD; ZEVENHUIZEN; ZEHNDER, 1990) and then refrigerated at 4°C for 24 hours. Once again, the samples were centrifuged (12000 x g, 4°C, 50 minutes) to separate the precipitate from the solvent. The precipitate was washed twice with 70% ethanol followed by dialysis, and then dried using a Hetovac VR-1 lyophilizer until a constant weight was observed.

2.3. Cell Biomass Determination

Cell growth was determined by measuring the optical densities of the samples, using a UV- visible spectrophotometer (Biophotometer, Eppendorf AG22331) at 600 nm. At the end of incubation, 10-mL samples of culture broth were collected and centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The biomass paste was washed three times with 0.85 %w/v saline solution. The paste was dried in a hot air oven set at 50 °C until a constant weight was attained while not allowing the cells to be charred.

2.4. Biochemical characterization of the EPS

The concentration of protein and in the EPS samples was measured, using crystallized bovine albumin (Sigma Co., U.S.A.) as a standard, according to the method from Bio-Rad Bradford Protein Assay with BSA (bovine serum albumin; Bio Rad Co., Technical note 1069) at a UV adsorption of 595 nm (BRADFORD, 1976).

The total carbohydrate content was measured using the phenol-sulphuric assay with glucose (FOX; ROBYT, 1991).

2.5. Fourier Transform Infrared analysis

Fourier transform infrared (FTIR) is an instrument able to detect the functional groups of purified EPS. Each dried EPS sample (1 mg) was pressed into pellets using a 16 mm diameter mold and then analyzed in an Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectrometer (ATR-FTIR) (Bruker-VERTEX 70, Germany) according described by (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015).

2.6. NMR analysis

Solid-state ^{13}C NMR spectra of EPS were acquired using a 9.4 T AvanceIII, 400 Bruker spectrometer. The solid-state spectra were acquired using a Variable Amplitude Cross Polarization Magic Angle Sample Spinning sequence (VACP-MAS). The speed of rotation was 9 kHz, and the proton 90 pulse was 4 μs . The contact time was 1 ms (MARTINS et al., 2006).

2.7 Determination of EPS monosaccharide composition using RP-HPLC

To evaluate the monosaccharide composition of the EPS produced by the bacterial strains, the monosaccharides were derivatized following the methods of (FU; O'NEILL, 1995) with modifications by Castellane, Lemos e Lemos (2014). A Shimadzu-10A High Performance Liquid Chromatography System was used, consisting of two LC-10AD pumps, a SPD-M10Avp photodiode array UV-VIS detector (245 nm), a CTO-10Avp chromatography oven (30°C), and the injected volume was exactly 20 μL . The monosaccharide derivatives were separated on a Restek (150×4.6 mm, 5 μm) column. The standard monosaccharides (mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose, and xylose) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.8. Rheological measurements

The samples were suspended in purified water at 20°C at a concentration of 5 g L⁻¹. The samples were then stored for at least 24 hours to ensure their full hydration.

The Rheological measurements were performed using an AR-2000EX Rheometer (TA Instruments, Delaware, USA) with a cone-plate geometry (60 mm diameter) and a gap of 52 μm, at 25°C. Samples of 2 mL were introduced into the rheometer, with 5 minute measurement intervals. All tests were performed in duplicate and a new sample was used for each replicate.

2.8.1. Steady state flow

The flow curves were determined using a shear rate control experiment in which the maximum shear rate value was 100 1/s. The time dependence of shear stress was evaluated by the displacement or overlapping of the rheograms obtained by descending shear rate (100 1/s to 0.1 1/s) and ascending shear rate curves (0.1 1/s to 100 1/s). The consistency index 'K' and the flow behavior index 'n' were determined using the Steffe (STEFFE, 1996) power law model given by the equation $\eta = K\dot{\gamma}^{(n-1)}$, where η is the apparent viscosity (Pa·s) and $\dot{\gamma}$ is the shear rate (1/s). The values of 'K' and 'n' were obtained respectively from the intercept and from the slope of the log–log plot of apparent viscosity versus shear rate.

2.8.2. Oscillatory flow

Rheological oscillatory flow was carried out at low strain amplitude using a fixed strain of 0.001 (0.1%), which was found to be in the range of linear viscoelasticity through strain sweep tests. Frequency sweeps were performed between 0.01 Hz (0.0628 rad/s) and 10 Hz (62.83 rad/s) at a constant temperature (25°C) to obtain the mechanical spectra. Temperature ramps were analyzed in the range of 10–80°C at an average constant frequency of 1 Hz, strain of 0.001 (0.1%) and

heating rate of 0.5 °C/min.

2.9. Applications of EPS

2.9.1. Antibiofilm activity EPS

This assay was performed in a 96-well polystyrene microplate. The bacterium *Burkholderia cepacia* were inoculated into a liquid growth medium TY (tryptone 5 g/L; yeast extract 3,0 g/L; CaCl₂.2H₂O 0,87 g/L, pH 7) in the presence of different concentrations (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL) of two antimicrobial agents, EPS from AS3 and MS5 *P. pnomenusa* strains, and biofilm developed by the strains in the absence of EPS was used as control. The microplate was incubated for 48 h, at 30°C, without agitation. To quantify the biofilm formation after the incubation period, the culture medium containing unattached cells was removed by hitting the inverted microtiter plate on absorbent paper, followed by three washes with 200 µL of sterile saline. After the removal of excessive salt solution, 150 µL of methanol was added for 20 minutes for fixation and then the biofilm coated microtiter plate was dried overnight. Next, the deep-well microtiter plate was stained with 200 µL of Crystal Violet solution of 0.1% (w / v) in water for 15 minutes at room temperature. The plate was washed with water and lightly dried at room temperature with absorbent paper, followed by the addition of 150 µL of 95% ethanol for 30 minutes. The optical density (OD) of the stained bacterial biofilm was measured with the aid of an automated reader Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) at a wavelength of 570 nm (SOUSA et al., 2008). The experiment was performed in five replicates.

2.9.2. Emulsifying activity

For the evaluation of their emulsifying index, EPS from *P. pnomenusa* (AS3 and MS5) were resuspended in purified water at concentrations of 1 and 5 g L⁻¹. Hydrophobic substrate (hydrocarbon or oil) was added to the EPS solution (hydrophobic substrate: EPS in a ratio of 3:2, v/v), vortexed vigorously for 2 min. and allowed to stand at room temperature. After 24 and 168 hours, the emulsification

index was measured using the following equation, denoted E_{24} and E_{168} respectively: $E_{24}=(he/hT) \times 100$ (COOPER; GOLDENBERG, 1987), where the he (mm) is the height of the emulsion layer and hT (mm) is the overall height of the mixture. All of the tests were performed in triplicate. The tested hydrophobic substrate included diesel oil, hexane, oils (sunflower and peanut) purchased at local supermarket, vaseline and glycerol.

2.10. Data Analysis

All results, with the exception of the FTIR analysis, were analyzed by variance Program Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2002), and the averages of the others tests were compared by Tukey test at 5% significance levels.

3. Results and discussion

3.1. EPS production, cell biomass and final pH growth values

P. pnomenusa AS3 and MS5 strains were both able to produce EPS. For both strains the results indicated that, after 96 hours of growth on liquid PSY at 30°C, they produced 3.99 and 4.06 g L⁻¹, respectively (Table 1). After this incubation period, the samples became highly viscous under cultured conditions, containing an excess of sucrose as a carbon source. In the literature there are no reports on the exopolysaccharide production of *P. pnomenusa*. However, results obtained by Ferreira et al. (2010) show that the non-*Bcc* soil isolates such as *Burkholderia xenovorans* LB400, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, and *Burkholderia phymatum* STM815 can produce about 2.6 g L⁻¹ of EPS, after 3 days of growth.

Table 1. Evaluation of the differences in the Cell dry weight (CDW), exopolysaccharide production (EPS) and final pH between the isolates of the *Pandoraea pnomenusa* (AS3 and MS5), after 96 hours of growth on liquid PSY at 30°C.

Species (Strains)	CDW (g L ⁻¹)	EPS (g L ⁻¹)	EPS/CDW	pH _f
<i>Pandoraea pnomenusa</i> (AS3)	0.497a	3.99a	7.48a	6.77a
<i>Pandoraea pnomenusa</i> (MS5)	0.553a	4.06a	7.38a	6.78a

pH_f = final pH (initial pH 6.9)

Values are averages of triple determinations.

Same letters on the lines do not differ significantly by the Tukey test ($p < 0.05$).

The cellular biomass production values of the AS3 and MS5 strains were 0.497 and 0.553 g L⁻¹, respectively (Table 1), but these results are not statistically significant by Tukey test (5%).

The evaluation of the efficiency of the EPS synthesis originating from the relationship between total EPS and CDW showed no significant difference between the MS5 and AS3 strains, which had efficiencies of 7.38 and 7.48, respectively. Additionally, the initial culture pH is an important factor that may affect the induction or inhibition of EPS biosynthesis as well as the cell membrane, cell morphology and structure (KIM et al., 2005); the final and initial culture pH has been investigated here. As shown in Table 1, the post-incubation pH was between 6.78 and 6.77.

Both EPS from *P. pnomenusa* strains (AS3 and MS5) had similar total carbohydrate content, and proteins were detected in lower amounts ($\leq 0.40\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) (Table 2). The low quantity of protein in the EPS indicated that the extraction and purification procedures used were quite effective at yielding high quality EPS (HAN et al., 2015).

Table 2. Mass of Protein and Carbohydrate observed per milligram of EPS extracted, after 96 hours of growth on liquid PSY at 30°C.

Samples	Mass (mg g ⁻¹)*	
	Carbohydrate	Protein
<i>Pandoraea pnomenusa</i> (AS3)	877.48a	0.14b
<i>Pandoraea pnomenusa</i> (MS5)	612.28a	0.40a

* Values are averages of triple determinations.
Same letters on the lines do not differ significantly by the Tukey test ($p < 0.05$).

3.2. Spectrum of FTIR analysis

FTIR shows that molecules possess specific frequencies at which they can vibrate corresponding to vibrational modes (MISHRA; JHA, 2009). The results for FTIR analysis of EPS samples are shown in Figure 1. The FTIR spectra of EPS produced by the AS3 and MS5 *P. pnomenusa* strains indicate similar chemical composition. The IR bands around 3300 cm⁻¹ are related to the stretching vibration of O-H in the constituent sugar residues (KANMANI et al., 2011). The OH group is responsible for the water solubility (LIM et al., 2005). Carboxyl or hydroxyl groups are also known to be involved in the metal-binding process through links that facilitate the stability of ion polymer complexes (COZZI, 1968).

The bands around 2920 cm⁻¹ are generated due to asymmetric and symmetric stretching of methylene. The band at approximately 1700 cm⁻¹ is associated with carbonyl stretching C=O of esters. The band at 1400 cm⁻¹ is related to C-O-C stretching in the glucopyranose rings (ZHAO et al., 2005), and the peak at 1000 cm⁻¹ is assigned to characteristics of polysaccharides (NATARAJ et al., 2008).

3.3. NMR analysis

The C NMR spectrum showed that both EPS seem to share a similar structure (Figure 2). The signals from 60 to 110 ppm, have been assigned to the six carbon of

the EPS pyranoid ring. The signals between 62 and 75 ppm have been assigned to C6 carbons, the signal at 104.5 ppm to C1, the carbon bonded to two oxygen atoms (CASTELLANE et al., 2017). The broad peak at 175 ppm can be attributed to carboxyl groups present in uronic and pyruvic acids. The signals around 21.3 ppm indicate the presence of a methyl group from rhamnose, a deoxy sugar and pyruvic acid (KIELAK et al., 2017),(CASTELLANE et al., 2017). The observations are in agreement with the results of EPS monomer characterization (Table 3).

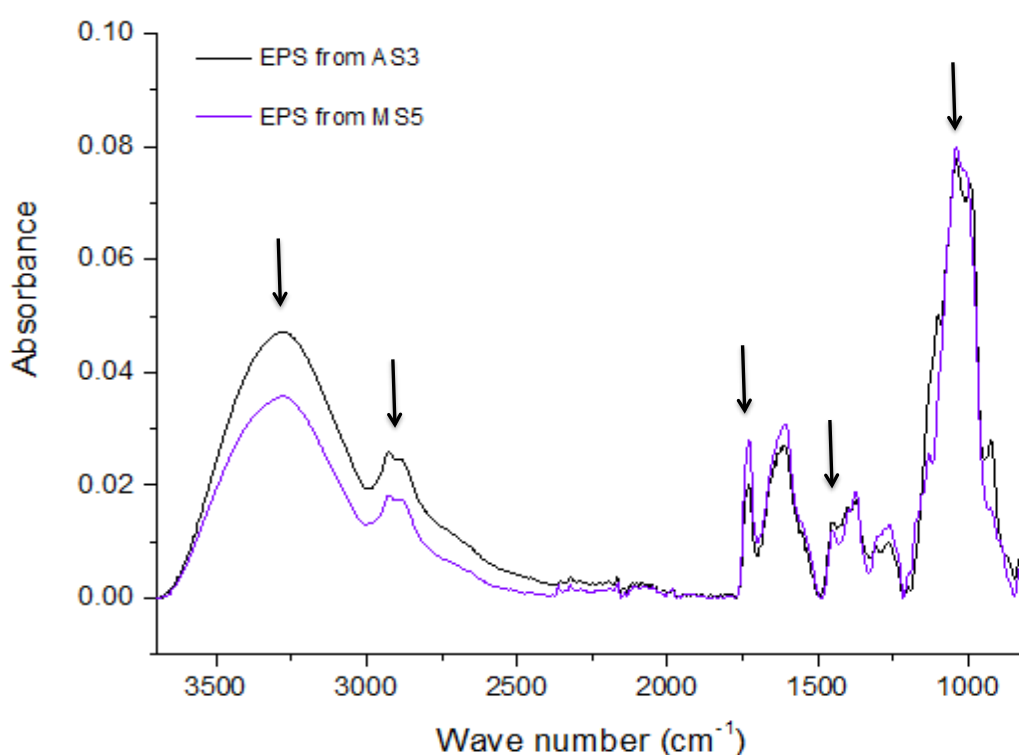


Figure 1: Spectrum of FTIR produced by exopolysaccharides AS3 and MS5 *Pandoraea pnomenusa* strains.

3.4. Determination of EPS monosaccharide composition using RP-HPLC

Exopolysaccharides produced by the AS3 and MS5 strains of *P. pnomenusa* were hydrolyzed for monomer identification. The production process of EPS by these isolates in the presence of sucrose has been reported here first. Analysis of standard PMP-sugars and hydrolyzed samples of EPS (EPS from AS3 and MS5 strains) by HPLC are shown in Table 3. The chromatogram profiles were very similar for AS3 and MS5 *P. pnomenusa* strains (data not shown), each containing six peaks. As shown in Table 3, the two exopolysaccharides from AS3 and MS5 are heteropolysaccharides containing six types of sugar residues; the most common are monosaccharides, such as D-glucose (68.1 and 69.6%, respectively) and D-galactose (25.25 and 25.03%, respectively).

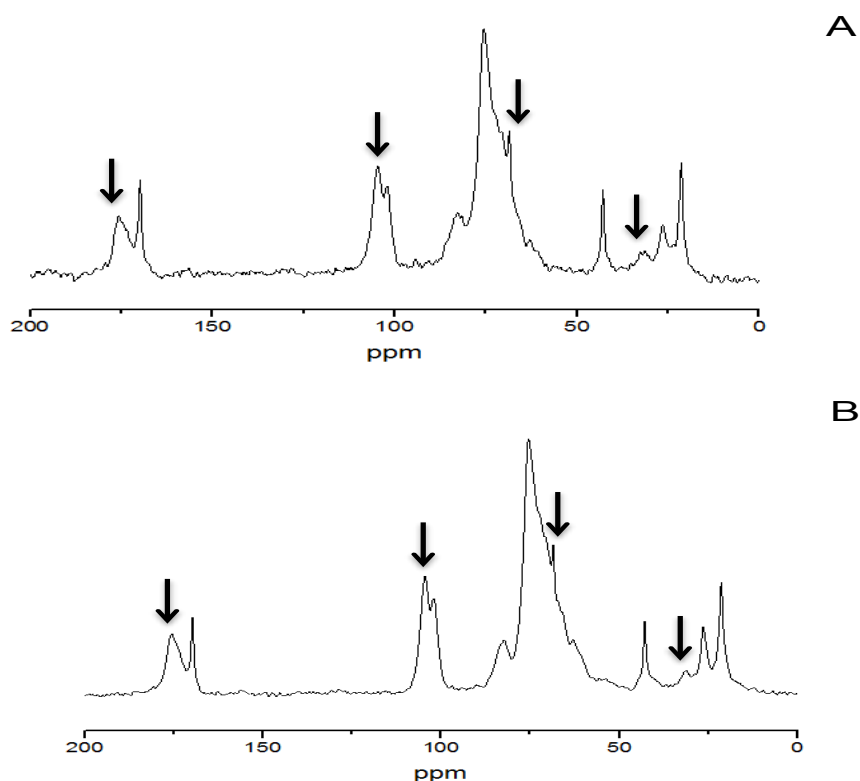


Figure 2: ^{13}C CP-MAS NMR spectra of the EPS samples of AS3 (A) MS5 (B) *Pandoraea pnomenusa* strains.

Table 3. Monomer compositions (mol%) of EPS produced by two *Pandoraea pnomenusa* strains cultured in PSYL for 6 days at 30 °C.

Samples	Monomer compositions (mol%) ⁽¹⁾					
	Man	Rha	GlcA	GalA	Glc	Gal
EPS from <i>Pandoraea pnomenusa</i> (AS3)	2.74b	0.26a	0.27a	0.51a	68.36b	26.33a
EPS from <i>Pandoraea pnomenusa</i> (MS5)	2.87a	0.28a	0.11b	0.22b	69.63a	25.62a

⁽¹⁾Man, mannose, Rha, rhamnose; GlcA, glucuronic acid; GalA, galacturonic acid; Glc, glucose; Gal, galactose.

Rhamnose is the lowest abundant sugar in these samples (0.29%), and other traces of monosaccharide constituents include mannose and galacturonic acid. Cuzzi et al. (2014) reported that the *Burkholderia pyrrocinia* BTS7 strain produces the EPS named cepacian, which consists of D-glucose, mannose, D-galactose, and the unusual D-rhamnose together with a glucuronic acid fully substituted on its hydroxyl groups. The sugars that constitute the EPS cepacian, with the exception of glucuronic acid, were all present in both samples (AS3 and MS5). Sugar composition depends on the kind of microorganism studied. For example, Rhizobia species studied by Castellane et al. (2015), where the major sugar component of EPS from the six rhizobia species were reported as D-glucose and D-galactose, these molecules representing more than 90% of the monosaccharide composition. Xantan gum is mainly composed of D-glucose, D-mannose and D-glucuronic acid. This composition depends on a number of factors during the production process (DE MÔNACO LOPES et al., 2015). Differences in the sugars and their relative proportions contributes to the unique structures of EPS and their varying properties (SAJNA et al., 2013).

3.5. Rheological measurements

3.5.1 Steady state flow

The rheograms of the aqueous solutions of EPS produced by the *P. pnomenusa* AS3 and MS5 strains were determined, in duplicate. The flow curves of ascending and descending shear rates of the EPS solutions from the AS3 and MS5 strains were acquired in order to evaluate possible time dependence of shear stress. Comparing the two curves for each sample at any fixed same shear rate, less than 2% variation in the resulting shear stress was observed. The overlap of these two curves indicate no thixotropy occurred for either EPS, i.e. the solutions have the capacity to reorganize and rebuild their structure after shearing. The structure regeneration ability is a desirable property for many applications such as coating, food, ink and oil (HAN et al., 2016). Therefore, only the ascending flow curves for each sample are represented in Figure 3 (left).

In general, the rheological profiles were very similar for both biopolymers. Both EPS solutions showed a shear-thinning behavior characterized by the decrease in apparent viscosity with increasing shear rate (Figure 3 – right).

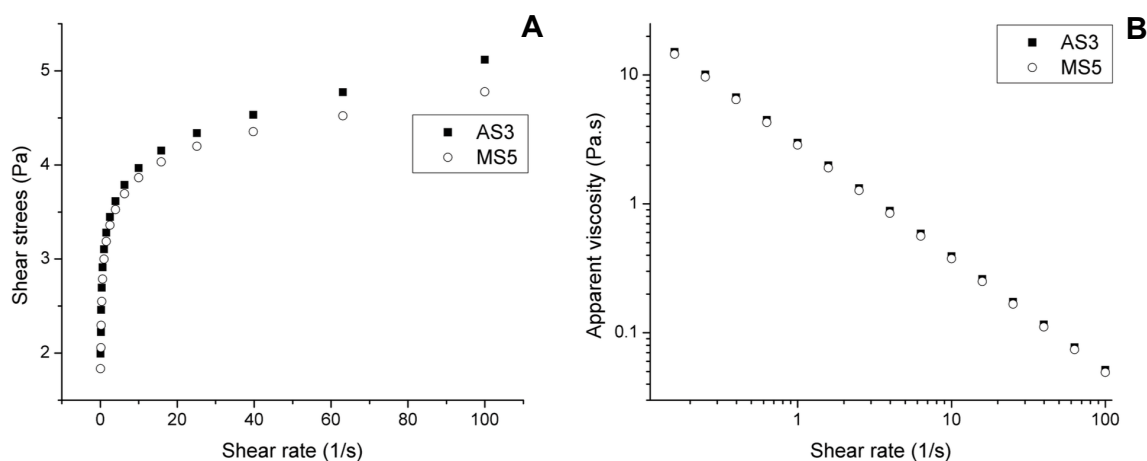


Figure 3: Flow curve of the exopolysaccharides solutions from AS3 and MS5 strains at a 5 g L⁻¹ concentration. These flow curves were measured at 25°C (A). Apparent viscosity as a function of deformation rate (B).

Table 4. Coefficients of the power law model for the *P. pnomenus* species (AS3 and MS5 strains) solutions at a 5 g L⁻¹. Results are the fitting parameters of the average shear stress of three replicates, where (n) represents the flow behavior index and (K) is the consistency coefficient, obtained by the Ostwald-de Waele model: $\eta = K \dot{\gamma}^{(n-1)}$.

Type of exopolyssacharide	K	n	R ²
EPS of AS3 (5 g L ⁻¹)	2.983	0.118	0.983
EPS of MS5 (5 g L ⁻¹)	2.859	0.118	0.966

Using a linear regression between $\ln(\eta)$ and $\ln(\dot{\gamma})$, the consistency index (K) and flow behavior index (η) of AS3 and MS5 *P. pnomenus* at 5 g L⁻¹ concentration and 25°C could be determined. The high values of correlation coefficient (R²)

represent not only a good agreement between experimental data and the model, but also the reliability of the values shown in Table 4. Considering the flow behavior index was lower than unit (~ 0.11 for both polymers), the pseudoplastic behavior was reinforced. According to Freitas et al. (2014), polysaccharides in aqueous solutions commonly present shear-thinning properties. Specifically, EPS produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061 (HAN et al., 2015), *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CASTELLANE; OTOBONI; LEMOS, 2015) and SEMIA 4080 (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014) also showed pseudoplastic characteristics and good emulsification activity. Viscosity reduction as shear rate increases is an important feature in some industrial operations, making the fluid flow easier at vigorous shear rate conditions such as pumping, mixing, spray drying, etc. Our research group has analyzed several EPS produced by different species of bacteria and we have found a large variation in chemical compositions and physical properties among the EPS from different strains of the same species. However, we have observed that both of the EPS studied in this paper have shear-thinning property, which is an important characteristic for any biopolymer. Some important exopolysaccharides such as xanthan gum show high apparent viscosity with pseudoplastic behavior, which makes it an effective thickener and stabilizer in the food industry (KATZBAUER, 1998). This property is important for various processes involved in food processing, such as mixing, pouring and pumping, where different operative shear rates are applied (HAN et al., 2015).

3.5.2. Oscillatory flow

Dynamic viscoelastic measurements were performed as a function of frequency and temperature to obtain G' and G'' . The resulting properties G' and G'' are attributes of viscoelastic materials that exhibit simultaneously solid and liquid behavior, as in polysaccharide solutions. They refer to the elastic and viscous characteristics, respectively, and are useful for giving insight into the microstructure of polymer solutions (Yu et al. 2016).

For oscillatory measurements, a strain of 0.001 (0.1%) was defined, for which both solutions were present in the linear viscoelasticity region for the studied frequency range. So, frequency sweeps were performed in the range of 0.01 and 10 Hz, resulting in the mechanical spectra of Figure 4 (left). Storage modulus G' had greater loss than modulus G'' , with frequency dependence and no crossing-over for both EPS, representing a weak gel behavior (Steffe 1996). According to Mezger et al. (2006) the solid-like behavior is also linked to higher gel stability over time. Mechanical spectra of EPS solutions presented similar data to that reported by Han et al. (2016) for xanthan gum. In addition, the approach among their flow curves highlights the possibility of using EPS as a substitute thickening agent instead of xanthan gum.

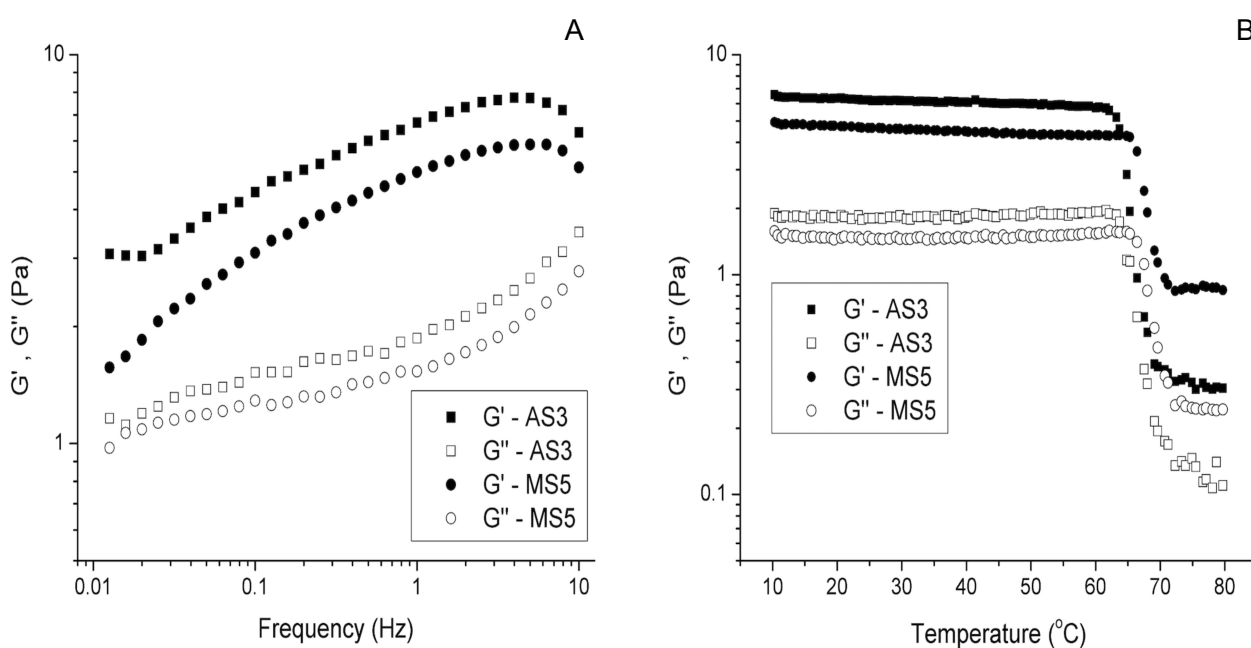


Figure 4: Mechanical spectra of the exopolysaccharides solutions from AS3 and MS5 strains at a 5 g L⁻¹ concentration. These flow curves were measured at 25°C (A). Temperature dependence of storage modules (G') and loss modules (G'') as a function of temperature (B).

The flow pattern of EPS solutions were also analyzed after increasing the temperature from 10 to 80 °C at constant strain and frequency. The temperature ramps in Figure 4 (right) illustrate that both EPS solutions acted like weak gels with $G' > G''$ and little temperature dependence up to 64 °C and after 70 °C, approximately. Even the values of G' and G'' rapidly decreased between 64 °C and 70 °C, and the solutions maintained their gel-like structure. Han et al. (2016) related this phenomenon to a substantial decrease in apparent viscosity at higher temperatures, which is probably linked to the temperature at which some gels begin to melt, as occurred for the EPS studied by Zhou et al. (2014).

3.6. Emulsifying activity

Emulsification tests were conducted with diesel oil, hexane, liquid vaseline, glycerol, peanut oil and sunflower oil; their capacities for emulsification and stabilization are shown in Table 5. The EPS from AS3 *P. pnomenusa* formed consistent emulsions with diesel, hexane, vaseline, peanut and sunflower oil in the concentration of 1 g L⁻¹. In the concentration of 5 g L⁻¹, the diesel did not form emulsion, but emulsified glycerol that did not form emulsion at the concentration of 1 g L⁻¹. Hexane, Vaseline, glycerol, peanut and sunflower oil showed higher emulsification indices at a concentration of 5 g L⁻¹. In the literature there are no reports about the emulsification activity of the EPSs produced by *P. Pnomenusa*. However, similar observations were reported with biopolymers produced by other bacterial species. Moretto et al. (2015) reported an emulsion using the EPS LBMP-01 (*Rhizobium tropici*) with hexane, which has a higher emulsification index (89.94%) at a concentration of 5 g L⁻¹ of EPS, compared with the emulsification index at a concentration of 1 g L⁻¹ (22.30%). In both concentrations, all hydrocarbons/oils exhibited stability. The criteria for determining the emulsion-stabilizing capacity of an emulsifier consists of evaluating its ability to maintain at least 50 % of the original emulsion volume 24 h after its formation (WILLUMSEN; KARLSON, 1997).

The EPS MS5 was unable to emulsify diesel and glycerol at a concentration of 1 g L⁻¹, but it could emulsify hexane, vaseline, peanut and sunflower oil. At a

concentration of 5 g L⁻¹ the EPS MS5 emulsified all oils, except for diesel, and it showed a higher emulsifying index for both the glycerol and peanut oil. Once the emulsification index is evaluated, this information can be used to estimate the appropriate amount of bioemulsifier required, e.g., for use in environmental pollution treatment plants (SACCO et al., 2016).

Table 5: Emulsifying activity of EPS of *Pandoraea* isolates at different concentrations for some types of hydrocarbons and oils.

EPS (g L ⁻¹)	Hydrocarbons/oil	Emulsifying index (%) ^a			
		EPS _{AS3}		EPS _{MS5}	
		E ₂₄	E ₁₆₈	E ₂₄	E ₁₆₈
1	Diesel	12.28 A	7.65 A	0.0 A	0.0 A
	Hexane	20.28 B	12.44 B	13.96 A	13.00 A
	Vaseline	4.65	2.75	8.84	9.60
	Glycerol	0.00	0.00	0.00	0.00
	Peanut	37.66	9.50	42.42	9.06
	Sunflower	<i>51.85 A</i>	<i>38.39 A</i>	<i>49.01 A</i>	<i>44.67 A</i>
5	Diesel	0.0 B	0.0 B	0.0 A	0.0 A
	Hexane	44.22 A	46.95 A	14.27 A	7.09 A
	Vaseline	31.15	29.25	13.58	7.57
	Glycerol	<i>71.29</i>	<i>37.70</i>	<i>66.06</i>	<i>37.76</i>
	Peanut	<i>51.34</i>	30.82	<i>65.38</i>	9.94
	Sunflower	<i>58.09 A</i>	<i>42.10 A</i>	<i>51.74 A</i>	<i>11.85 B</i>

Values in italics: emulsifier index (E₂₄) with values above 50%

^aThe results are expressed as percentages of the total occupied by the emulsion. The values are the averages of at least three determinations.

3.7. Antibiofilm activity EPS

The antibiofilm potential of EPS (AS3 and MS5) against a pathogenic strain of *Burkholderia cepacia* was studied. Biofilm formation in *Burkholderia cepacia* was found to be the same at all concentrations of EPS AS3 used concentrations (Figure 3). However, the inhibition of *Burkholderia cepacia* biofilm formation was clearly observed in the presence of EPS MS5. A maximum inhibition was observed at the concentrations of 0.25 and 0.50 of EPS MS5 and no increase in the inhibitory effect was observed with a higher concentration (1mg/mL). Biofilm formation is a common trait of Bcc strains and has been associated with the persistence of Bcc infections and the increased resistance to antibiotics, in contrast with planktonic cells (SUPPIGER et al., 2013). Rushton et al. (2013) reported that members of the Bcc have been isolated as contaminants in a variety of industrial processes, such as petroleum products, antimicrobial solutions, preserved pharmaceuticals, preserved cosmetics and toiletries. Outbreaks of Bcc infection in vulnerable individuals have occurred from the use of contaminated antimicrobial/preserved industrial products. Thus, inhibition of biofilm formation by EPS can be important for use in cases where such occurrences have negative consequences.

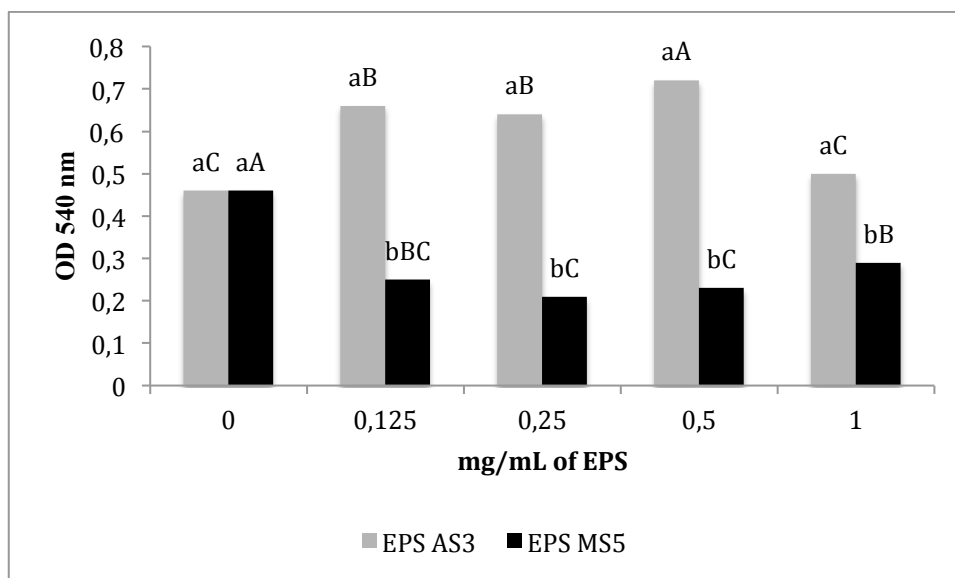


Figure 5: Antibiofilm activity of EPS from *P. pnomenusa* AS3 and MS5 against *Burkholderia cepacia*. Lowercase letter: comparison between concentrations of EPS effect from the same isolate. Capital letter: comparison between the EPS effect from two isolates in each concentration.

4. Conclusions

In this study, the bacterial EPS of AS3 and MS5 strains belonging to *Pandoraea pnomenusa*, were characterized. Both EPS were characterized as heteropolysaccharide. They possess pseudoplastic behavior, in addition to solid-like characteristics under the studied conditions of frequency and temperature. The EPS MS5 showed antibiofilm formation ability, using only small amounts of EPS (0.25 and 0.5 mg/mL), against the pathogenic strain *Burkholderia cepacia*. Furthermore, the EPS from AS3 and MS5 strains may be used form emulsions with diesel, hexane, vaseline, glycerol, peanut and sunflower oils. Considering their good intrinsic viscosity, these EPS could be attractive for industrial applications as an antibiofilm agent, or be used to achieve optimal emulsification effects in environmental biotechnology and bioremediation.

Acknowledgment

The authors acknowledge the Program of Agricultural Microbiology FCAV/UNESP Campus Jaboticabal and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing a PROAP doctoral scholarship. We are grateful to Luis Alberto Conalgo from the Embrapa Instrumentação Agropecuária, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, São Carlos, Brazil, for their help in FTIR and NMR spectroscopy analysis.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. Acesso em:<:10.1016/0003-2697(76)9052>

BREEDVELD, M. W.; ZEVENHUIZEN, T. M.; ZEHNDER, A. J. B. Osmotically induced oligo and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* Su47. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 2511–2519, 1990.

BUTT, A.; BUTT, A. Biosurfactants and their Potential Applications for Microbes and Mankind : An Overview 11, 2016.

CASTELLANE, T.C.L.; CAMPANHARO, J.C.; COLNAGO, L.A.; COUTINHO, I.D.; LOPES, É.M.; LEMOS, M.V.F.; DE MACEDO LEMOS, E. G. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **Internatioanal Journal of Biological Macromolecules**. n 96, p. 361–369, 2017. Acesso em:<10.1016/j.ijbiomac.2016.11.123>.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E.G.D.M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2014.04.066>.

CASTELLANE, T.C.L.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G. DE M. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Rhizobia Species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1566–1575, 2015a. Acesso em: <10.1590/01000683rbc20150084>.

CASTELLANE, T.C.L.; PERSONA, M.R.; CAMPANHARO, J.C.; DE MACEDO LEMOS, E.G. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015b. Acesso em: <10.1016/j.ijbiomac.2015.01.007>.

COENYE, T., FALSEN, E., HOSTE, B., OHLEN, M., GORIS, J., GOVAN, J., GILLIS, M., VANDAMME, P. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, V. 50, p. 887–899, 2000. Acesso em: <10.1099/00207713-50-2-887>.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Microbiology**, v. 53, p. 224–229, 1987. Acesso em: <0099-2240/87/020224>.

COZZI, D. Chromatographic studies Preparation of acetylated alginic acid A cetyl determination and preparation of ammonium acetyl alginate The acetyl determination and the preparation of ammonium acetyl alginate. *Journal of Chromatography*, v. 40, p. 130–137, 1968.

CUZZI, B.; HERASIMENKA, Y.; SILIPO, A.; LANZETTA, R.; LIUT, G.; RIZZO, R.; CESCUTTI, P. Versatility of the *Burkholderia cepacia* complex for the biosynthesis of exopolysaccharides: A comparative structural investigation. **PLoS One**, v. 9, n. 1–10, 2014. Acesso em: <10.1371/journal.pone.0094372>.

DE MÔNACO LOPES, B.; LESSA, V.L.; SILVA, B.M.; MARCO AURÉLIO FILHO, D.A.S.C.; SCHNITZLER, E.; LACERDA, L.G. Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food Nutrition Research*, V. 54, 2015.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951–962, 2012. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2011.08.083>.

FERREIRA, A.S.; LEITÃO, J.H.; SILVA, I.N.; PINHEIROS, P.F.; SOUSA, S.A.; RAMOS, C.G.; MOREIRA, L.M. Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Applied Environmental Microbiology*, v. 76, p. 441–450, 2010. Acesso em: <10.1128/AEM.01828-09>.

FOX, J.D.; ROBYT, J.F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, p. 93–96., 1991. Acesso em: <10.1016/0003-2697(91)90300-I>.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; GOUVEIA, A.R.; PINHEIRO, C.; TORRES, C.A. V.; GRANDFILS, C.; REIS, M.A.M. Controlled production of exopolysaccharides from enterobacter A47 as a function of carbon source with demonstration of their film and emulsifying abilities. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 641–657, 2014. Acesso em: <10.1007/s12010-013-0560-0>.

FU, D.T., O'NEILL, R. A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, 1995. Acesso em: <10.1006/abio.1995.1294>.

HAN, M.; DU, C.; XU, Z.Y.; QIAN, H.; ZHANG, W.G. Rheological properties of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Sporidiobolus pararoseus* JD-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 603–613, 2016. Acesso em: <10.1016/j.ijbiomac.2016.04.035>.

HAN, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 230–237, 2015. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2014.08.044>.

HERASIMENKA, Y.; CESCUTTI, P.; IMPALLOMENI, G.; CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; ZANETTI, F.; RIZZO, R. Exopolysaccharides produced by clinical strains belonging to the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Cystic Fibrosis** v. 6, p. 145–152, 2007. Acesso em: <10.1016/J.JCF.2006.06.004>.

HUSSAIN, A.; ZIA, K.M.; TABASUM, S.; NOREEN, A.; ALI, M.; IQBAL, R.; ZUBER, M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10–27, 2017. Acesso em: <10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>.

KANMANI, P.; SATISH KUMAR, R.; YUVARAJ, N.; PAARI, K.A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4827–4833, 2011. Acesso em: <10.1016/j.biortech.2010.12.118>.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 81–84, 1998. Acesso em: <10.1016/S0141-3910(97)00180-8>.

KIELAK, A.M.; CASTELLANE, T.C.L.; CAMPANHARO, J.C.; COLNAGO, L.A.; COSTA, O.Y.A.; CORRADI DA SILVA, M.L.; VAN VEEN, J.A.; LEMOS, E.G.M.; KURAMAE, E.E. Characterization of novel Acidobacteria exopolysaccharides with potential industrial and ecological applications. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41193, 2017. Acesso em: <10.1038/srep41193>.

KIM, H.O.; LIM, J.M.; JOO, J.H.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1175–1182, 2005. Acesso em: <10.1016/j.biortech.2004.09.021>.

LIM, J.M.; JOO, J.H.; KIM, H.O.; KIM, H.M.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W. Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata* TG-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 296–303, 2005. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2005.04.004>.

LIU, J.; WANG, X.; PU, H.; LIU, S.; KAN, J.; JIN, C. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1113–1124, 2016. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2016.10.084>.

MARTINS, M.A.; FORATO, L.A.; MATTOSO, L.H.C., COLNAGO, L.A. A solid state ¹³C high resolution NMR study of raw and chemically treated sisal fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 127–133, 2006. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2005.10.034>.

MENEHINE, A.K.; MORETTO, C.; CASTELLANE, T.C.L.; CARARETO ALVES, L.M. Production, Characterization and Bioemulsifying Activity of an Exopolysaccharide Produced by *Sphingomonas* sp. Isolated from Freshwater. **Journal of Polymers and Environment**, 2016. Acesso em: <10.1007/s10924-016-0878-0>.

MEZGER, M.; REICHERT, H.; SCHÖDER, S.; OKASINSKI, J.; SCHRÖDER, H.; DOSCH, H.; PALMS, D.; RALSTON, J.; HONKIMÄKI, V. High-resolution in situ x-ray study of the hydrophobic gap at the water-octadecyl-trichlorosilane interface. **Proceeding of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 103, p. 18401–4, 2006. Acesso em:<10.1073/pnas.0608827103>.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382–3386, 2009. Acesso em: <10.1016/j.biortech.2009.02.006>.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T.C.L.; LOPES, E.M.; OMORI, W.P.; SACCO, L.P.; LEMOS, E.G. DE M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291–298, 2015. Acesso em: <10.1016/j.ijbiomac.2015.07.056>.

NATARAJ, S.; SCHOMÄCKER, R.; KRAUME, M.; MISHRA, I.M.; DREWS, A. Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration. **Journal of Membrane Science**, v. 308, p. 152–161, 2008. Acesso em: <10.1016/j.memsci.2007.09.060>.

POLI, A.; ANZELMO, G.; NICOLAUS, B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1779–1802, 2010. Acesso em: <10.3390/md8061779>.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J.B.; GHIGO, J.M. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 334–346, 2013. Acesso em: <10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x>.

RUSHTON, L.; SASS, A.; BALDWIN, A.; DOWSON, C.G.; DONOGHUE, D.; MAHENTHIRALINGAM, E. Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of *Burkholderia cepacia* complex bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, p. 2972–2980, 2013. Acesso em: <10.1128/AAC.00140-13>.

SACCO, L.P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SACCO, L.P.; CASTELLANE, T.C.L.; LOPES, E.M.; DE MACEDO LEMOS, E.G.; ALVES, L.M.C. Properties of Polyhydroxyalkanoate Granules and Bioemulsifiers from *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. Isolates Growing on Glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 178, p. 990–1001, 2016. Acesso em: <10.1007/s12010-015-1923-5>.

SAJNA, K.V.; SUKUMARAN, R.K.; GOTTUMUKKALA, L.D.; JAYAMURTHY, H.; DHAR, K.S.; PANDEY, A. Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 84–89, 2013. Acesso em: <10.1016/j.ijbiomac.2013.04.025>.

SCHNEIDER, I.; QUEENAN, A.M.; BAUERNFEIND, A. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, p. 1330–1335, 2006. Acesso em: <10.1128/AAC.50.4.1330-1335.2006>.

SILVA, F.A.S. de, AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71–78, 2002.

SOUSA, C.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. *Staphylococcus epidermidis* glucose uptake in biofilm versus planktonic cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 423–426, 2008. Acesso em: <10.1007/s11274-007-9478-4>.

STEFFE, J.F. 1996. Rheological methods in food process engineering. Freeman press.

SUPPIGER, A.; SCHMID, N.; AGUILAR, C.; PESSI, G.; EBERL, L. 2 Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Virulence**, v. 4, p. 400–409, 2013. Acesso em: <10.4161/viru.25338>.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 283–288, 2008. Acesso em: <10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011>.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415–423, 1997. Acesso em: <10.1007/BF00056425>.

YU, L.; XU, X.; ZHOU, J.; LV, G.; CHEN, J. Chain conformation and rheological behavior of exopolysaccharide from *Bacillus mucilaginosus* SM-01. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 165-174, 2016. Acesso em: <10.1016/j.foodhyd.2016.11.013>

ZHAO, G.; KAN, J.; LI, Z.; CHEN, Z. Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. **Carbohydrate Polymers**, V. 61, p. 125–131, 2005. Acesso em: <10.1016/j.carbpol.2005.04.020>.

ZHOU, H.; SCHÖN, E.-M.; WANG, M.; GLASSMAN, M.J.; LIU, J.; ZHONG, M.; DÍAZ DÍAZ, D.; OLSEN, B.D.; JOHNSON, J.A. Crossover experiments applied to network formation reactions: Improved strategies for counting elastically inactive molecular defects in PEG gels and hyperbranched polymers. **Journal of the American Chemical Society**, V. 136, p. 9464–9470, 2014.

CAPÍTULO 3- *Screening* de isolados bacterianos com atividade proteolítica alcalina úteis em processos biotecnológicos

Screening of bacterial isolates with useful alkaline proteolytic activity in biotechnological processes

Laís Postai Sacco, Erica Mendes Lopes, Elwi Machado de Sierra, Lúcia Maria Carareto Alves.

Artigo publicado na revista Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal (SP), v. 8, Número Especial, 2016. (ISSN 2178-9436).

Resumo

As enzimas proteolíticas constituem uma das mais importantes classes de enzimas hidrolíticas. Elas quebram ligações peptídicas de proteínas, resultando em pequenos peptídeos e aminoácidos livres, que podem ser utilizados e absorvidos por células vivas e são importantes em vários processos industriais, como a indústria farmacêutica e alimentícia. Este trabalho teve como objetivo estudar a atividade proteolítica alcalina de isolados bacterianos de um consórcio degradador da biomassa. Foram detectados 4 isolados produtores de halo para protease, realizada a extração da enzima e quantificada a proteína total. A atividade proteolítica foi mensurada utilizando azocaseína 0,5% como substrato. Foi possível observar que os quatro isolados possuem boa atividade proteolítica alcalina, e têm potencial para serem utilizados em indústria de tratamento de couro, alimentícia, farmacêutica e descontaminação de água poluída.

Palavras-chave: Alcalina. Enzima. Protease.

Abstract

Proteolytic enzymes are one of the most important classes of hydrolytic enzymes. They break proteins peptide bonds, resulting in smaller peptides and free amino acids, which can be used and absorbed by living cells, and they also are important in various industrial processes such as in the pharmaceutical and food industries. The aim of this work was to study the alkaline proteolytic activity of bacterial isolates of a consortium that degrades biomass. We detected four isolated that produce protease when the enzyme was extracted and total protein was quantified. The proteolytic activity was performed using azocasein 0.5% as substrate. We observed that the four isolates have good alkaline proteolytic activity and potential to be used in the industry of leather processing, food, and pharmaceutical and in the decontamination of polluted water.

Keywords: Alkaline. Enzyme. Protease.

1. Introdução

Proteases são um importante grupo de enzimas que são responsáveis por 60% do total de vendas mundiais de enzimas industriais (OSKOUIE et al., 2008). Estas são uma das mais importantes classes de enzimas hidrolíticas, pois quebram ligações peptídicas de proteínas, resultando em pequenos peptídeos e aminoácidos livres, que podem ser utilizados e absorvidos por células vivas (PARK et al., 2013). Por outro lado, as proteases microbianas alcalinas são utilizadas em vários setores da indústria como, processamento de couro e penas, indústria têxtil e de seda, produção de alimentos, indústria farmacêutica e de detergente, e tratamento de água poluída (GUPTA & LORENZ, 2002).

Apesar das proteases serem enzimas hidrolíticas comuns a vários organismos na natureza, tecnologicamente os micro-organismos servem como fonte principal das mesmas por causa do seu rápido desenvolvimento, do espaço limitado requerido para o cultivo e da facilidade com que eles podem ser manipulados

geneticamente. Essa última característica tem levado à síntese de novas enzimas com propriedades alteradas que são desejáveis para as suas várias aplicações em diferentes processos industriais (CHU, 2007).

Baseado em seu comportamento ácido-base, as proteases são classificadas em 3 grupos, proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas tem melhor desempenho entre pH 2,0-5,0 e na maioria das vezes são produzidas por fungos. Proteases que tem um pH 7 como ótimo são chamados de proteases neutras, e geralmente são de origem vegetal. Enquanto proteases com atividade ótima na faixa de pH 8 ou mais são classificadas como alcalinas (GUPTA et al., 2002).

As proteases alcalinas utilizadas na indústria de detergente, são na maioria ativas em pH 8-12, e entre a temperatura de 50-70 °C (AL-SHEHR et al., 2004). Na indústria de couro as proteases alcalinas aceleram o processo de retirada de pelos, porque as condições alcalinas promovem a dilatação da raiz do cabelo, promovendo uma fácil retirada do pelo do couro (GUPTA et al., 2002).

As indústrias e o mercado de enzimas estão sempre em busca de métodos novos e mais baratos para aumentar a produção de várias enzimas, dentre as quais as proteases, e para a diminuição do preço e melhora da eficiência desses catalisadores biológicos (MUKHERJEE et al., 2008).

Neste trabalho foi realizada a avaliação da atividade proteolítica de isolados bacterianos de um consórcio de bactérias degradadoras da biomassa no sentido de se obter organismos produtores de proteases alcalinas com possíveis aplicações na indústria.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos

As bactérias foram isoladas de um consórcio degradador de biomassa de resíduos vegetais. Utilizando o método de diluição seriada, em meio de cultura sólido PGE contendo, K_2HPO_4 (0,5g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2g/L); NaCl (0,1g/L); Extrato de levedura (1g/L); Glicose (10g/L); Ágar (9g/L); pH 6,8. Os isolados foram selecionados utilizando placas contendo o meio de cultivo sólido YM (SOUZA et al.,

2008) suplementado com skin milk (leite desnatado). As placas foram incubadas a 30°C durante 5 dias. A formação de halo identificou os organismos produtores de protease. Os isolados foram identificados pela análise de sequenciamento do gene ribossomal 16S (16SrDNA), comparados com seqüências de nucleotídeos depositadas no banco de dados Genbank/ NCBI database, utilizando a ferramenta BLAST (Basic local Alignment Search Tools). As seqüências foram submetidas ao Sequin-NCBI, onde foi gerado o número de acesso para cada organismo. Foram selecionados os isolados AS2 classificado como *Pseudomonas* sp. (KP233816), CB9 e MS5 classificados como *Pandoraea pnomenusa* (KP233817 e KP233818) e o MB5 classificado como *Burkholderia* sp. (KP233813).

2.2. Extração da enzima

Os isolados bacterianos cresceram em meio de cultivo PGE líquido durante 72 horas. E a cultura bacteriana foi centrifugada 10600 x g 4°C, durante 10 minutos e o sedimento celular foi utilizado para a extração das enzimas. Ao resíduo bacteriano foi adicionado 500µL de tampão de extração (acetato de magnésio 5mM, glicerol 15%, beta-mercaptanol, Tris-HCl 0,1M). A suspensão foi centrifugada durante 5 minutos, e adicionado 500 µL de tampão de extração com 1 mg/mL de lisozima no sedimento celular. Esse material foi incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugado (10600 x g, 4°C, durante 5 minutos) e o sedimento foi ressuspenso com tampão de sonicação (glicerol 15%, Tris-HCl 0,1M pH 8,8). A sonicação foi realizada utilizando sonicador Branson Sonifer 250 com pulsos de 10 segundos, 60 W durante 3 minutos, o material foi centrifugado (10600 x g, 4 °C, 30 minutos) sendo então o sobrenadante coletado e usado para a avaliação da atividade proteolítica.

A quantidade de proteína total no extrato enzimático foi estimada utilizando o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e uma curva com o padrão BSA (Albumina de Soro Bovino).

2.3. Determinação da atividade de proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada em triplicata, utilizando 100 µl do extrato enzimático obtido de cada isolado frente ao substrato azocaseína 0,5% em 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0. A reação foi incubada durante 4 horas a 37°C sendo parada pela adição de 50 µL ácido tricloroacético 20% (v:v), as amostras foram centrifugadas a 106000 x g 30 °C, durante 40 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo com 112 µl de NaOH 500 mM. A absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro a 442 nm.

2.4. Análise estatística

Foi utilizado delineamento experimental em parcelas subdivididas, com 2 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos principais foram constituídos por 4 linhagens bacterianas e os secundários por 4 faixas de pH. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas segundo teste de Tukey (5%).

3. Resultados e Discussão

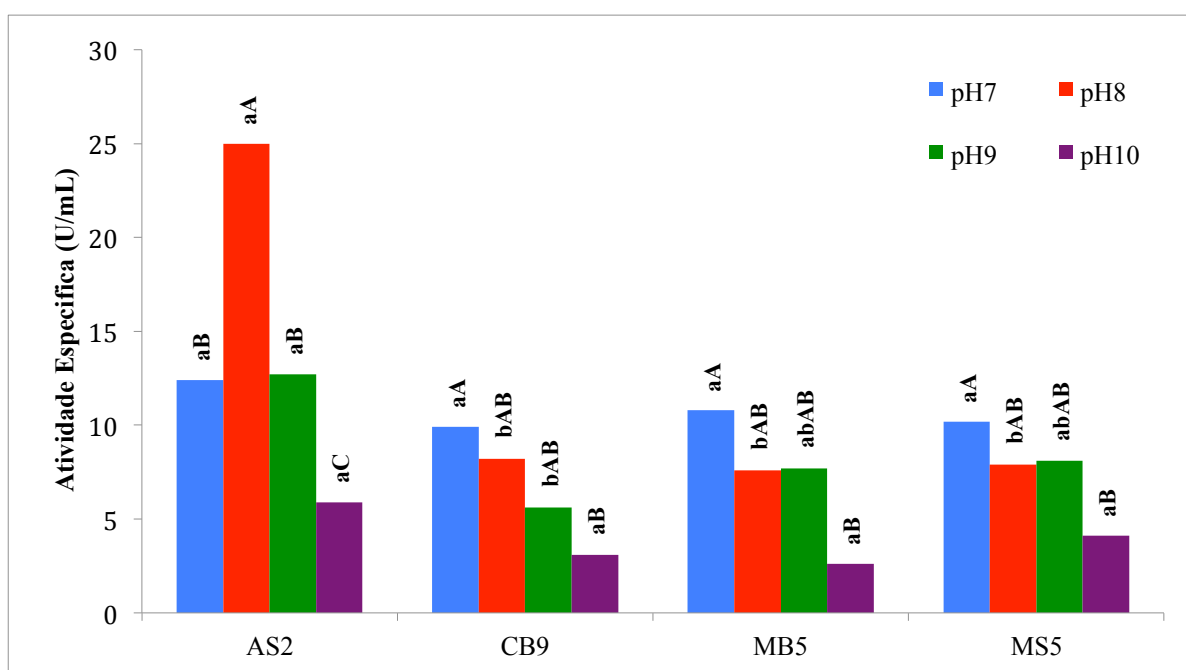
Na figura 1 é apresentada a atividade proteolítica específica das 4 linhagens. A linhagem *Pseudomonas* sp. (AS2) apresentou melhor atividade em pH 8 (25,09 U/mg), atividade de 12 U/mg em pH 9 e em pH 7,0 e em pH 10 apresentou a menor atividade (5,95 U/mg).

A linhagem *Pandoraea pnomenusa* (CB9) apresentou maior atividade proteolítica em pH 7 (10,86 U/mg), seguido pelo pH 9 que mostrou 7,72 U/mg de atividade, desempenho semelhante ao pH 8 o qual apresentou 7,67 U/mg, e a menor atividade foi no pH 10 (2,61 U/mg).

Pode ser observado que *Burkholderia* sp. (MB5) apresentou maior atividade proteolítica em pH 7 (10,86 U/mg), em pH 8 e 9 as atividades não diferenciaram estatisticamente 7,67 U/mg e 7,72 U/mg; respectivamente. E a menor atividade proteolítica foi apresentada no pH 10 (2,61 U/mg).

A atividade proteolítica do *Pandoraea pnomenusa* (MS5) apresentou melhor desempenho em pH 7 (10,29 U/mg), seguido pelo pH 9 (8,16 U/mg), atividade similar ao pH 8 (7,96 U/mg), e em pH 10 apresentou menor desempenho (4,14 U/mg).

Figura 1 - Atividade proteolítica específica em pH 7, 8, 9 e 10 dos isolados *Pseudomonas* sp. (AS2), *Pandoraea pnomenusa* (CB9 e MB5), *Burkholderia* sp. (MS5). Letra maiúscula: comparação da atividade proteolítica do isolado entre os pH 7, 8, 9 e 10. Letra minúscula: comparação entre cada pH 7, 8, 9 e 10 de todos os isolados.



As duas linhagens de *Pandoraea pnomenusa* (CB9 e MB5), apresentaram desempenho de atividade proteolítica semelhantes em todos os pH. Dentre as quatro linhagens bacterianas, *Pseudomonas* sp. (AS2) foi o que apresentou maior atividade proteolítica em pH 8 (25,09 U/mg). Já foi descrito na literatura (ERTAN et al., 2015) uma linhagem de *Pseudomonas* sp. (RC) isolada de leite refrigerado em meio LB suplementado com *skim milk* apresentou halo indicando a hidrólise da proteína, entretanto a enzima purificada apresentou melhor atividade em pH 6,5.

4. Conclusões

Foi possível observar que os quatro isolados estudados possuem atividade proteolítica alcalina e têm potencial para serem utilizados em indústria de tratamento de couro, alimentícia, farmacêutica e descontaminação de água poluída. O isolado *Pseudomonas* sp. destacou-se pois apresentou a maior atividade proteolítica em pH 8 (25,09 U/mg) considerando-se a utilização nos ensaios de extratos enzimáticos brutos, a purificação dessa enzima poderá proporcionar uma melhora na atividade específica e possibilidade de estudos mais avançados sobre suas características.

5. Referências bibliográficas

AL-SHEHRI, L.; ABDUL-RAHMAN, M.; Yassar, S. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihametaseer, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p.1631- 1635, 2004.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

ERTAN, H.; CASSEL, C.; VERMA, A.; POLIJAK, A.; CHARLTON, T.; ALDRICH-WRIGHT, J.; OMAR, S.M.; SIDDIQUI, K.S.; CAVICCHIOLI, R. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. Isolated from refrigerated milk: Role of calcium in improving enzyme productivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.113, p.1-8, 2015.

CHU, W. H. Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production from *Bacillus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p. 241–245, 2007.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R; BEG, Q.K; KHAN, S; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p. 381-395, 2002.

MARMUR, L. J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.208-218, 1961.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 315-322, 2006.

MUKHERJEE, P .K.; DAS, P; RAO, P.S.S. Time trends in MB-PB ratio among untreated leprosy patients attending a referral hospital in UP, India during 2001 to 2010. **Indian Journal of Leprosy**, v. 85, p. 59-64, 2008.

OSKOUIE, S.F.G.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 37–42, 2008.

PARK, M.H; WALPOLA, C; YOON, M.H. Purification and characterization of protease enzyme from *Burkholderia stabilis*. **African Journal of Microbiology**, v.12,n.2, p.1408- 1418, 2013.

RAO, M. B; TANKSALE, A. M; GHATGE, M. S; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597–635, 1998.

SHARMA, R.; SONI, S.; VOHRA, R.; GUPTA, L.; GUPTA, J. Purification and Characterisation of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1075–1084, 2002.

SOUZA, H.; OLIVEIRA, L.; ANDRADE, J. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 116-124, 2008.

CAPÍTULO 4 - Isolados bacterianos com potencial aplicação agrícola como solubilizadores de fosfato e produtores de auxinas

Laís Postai Sacco, Tereza Cristina Luque Castellane, Renato Fernandes Galdiano Junior, Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Lucia Maria Carareto Alves.

RESUMO

O fósforo é um macro elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, o déficit desse elemento pode afetar o desenvolvimento radicular, maturação da cultura e fixação de nitrogênio. É conhecido o papel de diversos micro-organismos do solo e água que participam da transformação dos principais elementos químicos na natureza, como as bactérias solubilizadoras de fosfato, que solubilizam o fósforo insolúvel em solúvel. Neste estudo, foi avaliada a eficiência de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato em produzir auxina e auxiliar no desenvolvimento de feijão guandu. Para isso foi utilizado consórcios microbianos degradadores da biomassa, para o isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato. Através do método de formação de halo transparente em meio de cultivo sólido NBRIP, foram isoladas 9 bactérias solubilizadoras de fosfato. Todos esses isolados solubilizam fosfato em meio líquido e produzem auxinas. Para avaliar a eficiência dos isolados no desenvolvimento de plantas foi realizada a inoculação das bactérias em sementes de feijão Guandu-forrageiro anão, destacando-se os isolados *Pandoraea pnomenusa* CB9 e *Pseudomonas* sp. AS1 que melhoraram os parâmetros biométricos das plantas. Demonstrando potencial como inoculantes para futuro testes em vasos e no campo.

Palavras-chave: ácidos orgânicos, feijão guandu, fertilizantes.

ABSTRACT

Phosphorus is a macro element essential for the development of plants; the deficit of

this element affects root development, crop maturation and nitrogen fixation. The role of various soil and water microorganisms involved in the transformation of the major chemical elements in nature, such as phosphate-solubilizing bacteria, which solubilize soluble insoluble phosphorus is known. In this study, the efficiency of phosphate-solubilizing bacterial isolates in producing auxin and aiding in the development of pigeon pea was evaluated. For this purpose, degrading microbial consortia of biomass were used for the isolation of phosphate-solubilizing bacteria. Through the transparent halo formation method in NBRIP solid culture medium, 9 phosphate-solubilizing bacteria were isolated. All these isolates solubilize phosphate in liquid medium and produce auxins. In order to evaluate the efficiency of the isolates in the development of plants, the inoculation of the bacteria was carried out in seeds of pigeon pea. Highlighting the *Pandoraea pnomenusa* CB9 and *Pseudomonas sp* AS1 isolated improved the biometric parameters of plants, demonstrating potential as inoculants for future potting and field trials.

Key-words: Organic acids, pigeon pea, fertilizer

1. Introdução

O fósforo é um macro nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta. É um componente de moléculas biológicas, como DNA, RNA, ATP e fosfolípidios. E a deficiência deste nutriente no solo, afeta o desenvolvimento radicular, haste e força do caule, maturação de culturas, e fixação de nitrogênio em leguminosas (KHAN; JOERGENSEN, 2009). Frequentemente esse elemento é o maior ou até mesmo o principal fator limitante para o crescimento das plantas.

Por outro lado, o fósforo é um elemento abundante no solo e pode ser encontrado nas formas orgânica e inorgânica. Entretanto, vários solos são considerados deficientes em fósforo por causa da sua concentração livre, a forma disponível para a planta. (BIANCO; DEFEZ, 2010).

Solos em todo o mundo são suplementados com fósforo inorgânico como fertilizantes químicos para apoiar a produção agrícola, entretanto o uso repetitivo de fertilizantes deteriora a qualidade do solo (TEWARI; DAS; MEHROTRA, 2004). Além disso, as plantas só conseguem utilizar pequenas quantidades dos fertilizantes fosfatados, e o restante, que é entorno de 70%, é rapidamente transformado tornando-se indisponível no solo por diferentes mecanismos. Desta forma, a aplicação frequente de fertilizantes químicos em áreas agrícolas, além de ter um alto custo leva a consequências ambientalmente indesejáveis (YU et al., 2011). Do mesmo modo, a aplicação repetida e inadequada de fertilizantes fosfatados pode afetar a comunidade microbiana e a bioatividade do solo resultando em uma redução do rendimento agrícola (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007).

O principal mecanismo fito-benéfico das bactérias solubilizadoras de fosfato é a diminuição do pH e a produção de ácidos orgânicos. Esses ácidos orgânicos transportam grupos hidroxil e carboxil que quelam cátions (Al, Fe, Ca), ligados ao fosfato do solo, tornando-os solúveis pelo desprendimento desses cátions. Dos ácidos orgânicos sintetizados pelas bactérias capazes de solubilizar fosfato, o ácido indol-3-acético (AIA) é considerado o mais importante dos agentes solubilizadores (SHAHID et al., 2015).

O ácido indol-3-acético (AIA) pertence a um grupo de moléculas genericamente denominado auxina, que são fito-hormônios, associados com diferentes processos nas plantas como: gravitropismo e fototropismo, diferenciação do tecido vascular, dominância apical, iniciação lateral e adventícia da raiz, estimulação da divisão celular e alongamento da haste e da raiz (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006). Alguns micro-organismos também possuem a capacidade de produção de auxinas que são importantes fatores de sinalização para esses organismos. Desta forma, as auxinas se apresentam como importantes moléculas na interação planta-microrganismo (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

A produção de AIA varia muito entre as diferentes espécies microbianas, bem como estirpes dentro de uma mesma espécie. Além disso, a produção de AIA também é influenciada pelas condições de cultura, estágios de crescimento e disponibilidade de substratos dos micro-organismos que sintetizam essa molécula (VIJILA, 2000); (KUMAR; RAM, 2012). O AIA bacteriano é sintetizado a partir de

triptofano, por uma ou mais vias, embora vias independentes possam existir. Entretanto, a produção do triptofano pelos micro-organismos é energeticamente dispendiosa, exigindo 75 ligações de fosfato de alta energia para a síntese de uma molécula, o maior custo metabólico dentre os aminoácidos. Desta forma, altos níveis de AIA geralmente só são produzidos quando existe triptofano em excesso no meio. A maioria das células bacterianas pode sintetizar o triptofano, mas a síntese de AIA é baixa, a menos que esse aminoácido seja fornecido exogenamente no meio de cultura (PATTEN; BLAKNEY; COULSON, 2013). Por outro lado, os exsudados radiculares das plantas são considerados como a principal fonte de triptofano na rizosfera que pode resultar na conversão microbiana de AIA (KRAVCHENKO et al., 2004); (KAMILOVA et al., 2006).

Considerando-se que micro-organismos solubilizadores de fosfato podem aumentar o desempenho global das plantas pelo fornecimento de fosfato solúvel; que esses micro-organismos do solo também beneficiam as plantas por outros mecanismos, como por exemplo, a produção de AIA, e ainda que esses dois processos possam estar associados, a prospecção de bactérias com potencial de solubilização de fosfato e/ou produção de AIA para finalidades agrícolas é importante.

Assim, objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato em produzir auxina e auxiliar no desenvolvimento de feijão guandu, o que demonstraria, portanto potencialidade para serem usados como inoculantes em áreas agrícola.

2. Material e Métodos

2.1. Bactérias utilizadas

Os isolados bacterianos utilizados nesse trabalho estão descritos na Tabela 1. Como anteriormente descrito foram isolados e são mantidos no Laboratório de Bioquímica, Micro-organismos e Plantas, Unesp de Jaboticabal. Os isolados bacterianos estudados (Tabela 1) foram obtidos de um consórcio microbiano degradador de biomassa lignocelulósica desenvolvido no mesmo laboratório. Eles

foram identificados através da análise de sequenciamento do gene 16S rRNA (SACCO, 2013) e comparação com sequências do National Center for Biotechnology Information GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o Blast. Para a manutenção e uso das células bacterianas em todos os ensaios desse trabalho, as células bacterianas foram pré-cultivadas em meio PGE líquido por 24 horas, a 30°C e agitação de 150 rpm.

Tabela 1. Sequências de 16S rRNA baseadas no banco de dados BLAST

Isolado	Número de acesso GenBank	pB*	%Id**	Blast GenBank
AS1	KP076214	1457	100	<i>Pseudomonas</i> sp
AS2	KP233816	1505	100	<i>Pseudomonas</i> sp
AS3	KP076215	1350	98	<i>Pandoraea pnomenusa</i>
CB8	KP233814	1457	99	<i>Burkholderia</i> sp
CB9	KP233817	1159	97	<i>Pandoraea pnomenusa</i>
MB5	KP233813	1443	99	<i>Burkholderia</i> sp
MS3	KP076217	1382	98	<i>Dyella jiangningensis</i>
MS4	KP076218	1330	99	<i>Rhizobium</i> sp
MS5	KP233818	1464	99	<i>Pandoraea pnomenusa</i>

*Tamanho do fragmento sequenciado em pares de bases; ** Porcentagem de identificação.

Fonte: Sacco, 2013

2.2.Capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico insolúvel

A presença de halo transparente em meio de cultivo sólido NBRIP (NAUTIYAL, 1999) indica solubilização do fosfato de cálcio insolúvel. Em placas de Petri contendo meio NBRIP foram inoculados 25µL de suspensão bacteriana, as placas foram incubadas a 30°C em estufa tipo BOD durante 5 dias. Após esse período foi medido o diâmetro das colônias bacterianas e dos halos formados através de paquímetro. A capacidade dos isolados de solubilizar fosfato inorgânico

insolúvel foi calculada pela relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio das colônias.

2.3. Determinação da concentração de fosfato inorgânico solúvel

Para a determinação da concentração de fosfato inorgânico solúvel foi transferido 10% do volume do pré-inoculo (item 2.1) para o meio NBRIP líquido. Os isolados foram cultivados (150 rpm, a 30°C por 48 horas). A concentração de fosfato inorgânico solúvel foi determinada segundo a metodologia de sulfo molibdato (STRICKLAND; PARSONS, 1965). Para isso foi adicionado 1 mL do sobrenadante da cultura bacteriana a um balão volumétrico de 50 ml, adicionado 10 ml da solução de sulfo molibdato, 5 ml da solução redutora e o volume foi completado com água destilada. A amostra foi homogeneizada e permaneceu em repouso durante 20 minutos. Uma prova em branco com água destilada e os mesmos reagentes foi conduzida em paralelo. A leitura foi realizada com um comprimento de onda de 660 nm, usando a prova em branco somente com os reagentes e água como referência.

2.4 Quantificação colorimétrica de ácido indol acético

A quantidade de ácido indol acético produzido pelas bactérias foi quantificada no meio de cultura suplementado com L-tryptophan (Merck). O meio foi inoculado com 10% de cada suspensão bacteriana no meio de cultivo PEG com 100 µg de L-triptofano, e permaneceu em agitação por 150 rpm, 30°C, no escuro, durante 5 dias. Foram centrifugados 2 mL de cada suspensão a 10000 rpm, 4°C, durante 30 minutos. Para quantificação foi utilizado 1mL do sobrenadante e 2 mL do reagente de Salkowski (GORDON; WEBER, 1951).

A concentração de auxina foi estimada utilizando a curva padrão preparada com concentrações conhecidas (5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125 µg/mL) de AIA (Sigma-Aldrich-USA), que gerou a equação $y = 0,0256x + 0,1104$; com um $R^2 = 0,97115$.

2.5. Detecção de compostos indólicos por Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Para confirmar a presença de compostos indólicos no sobrenadante das culturas, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os isolados foram cultivados na presença de triptofano (100 µg). A cultura bacteriana foi centrifugada a 10000 rpm, 4°C, durante 30 minutos. A extração de AIA foi conduzida conforme o protocolo de TSAVKELOVA et al. (2007). A análise por CLAE foi realizada utilizando uma alíquota de 5µl em uma coluna de fase reversa C18 (5µm 150x4.6mm) Restek e um detector de absorvância de UV regulado para medir sinal visível a 254 nm. A fase móvel composta de água: acetonitrila: ácido acético (40:60:1, v:v:v) pH 2,8. A velocidade de fluxo foi de 0,5 mL min⁻¹ e a pressão de 51 MPa. A presença de auxinas foi confirmada por comparação dos tempos de retenção de pico com os padrões.

2.6. Detecção de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio NBRIP líquido. O sobrenadante das culturas foi filtrado em membrana de éster de celulose. Os ácidos orgânicos foram separados utilizando coluna C18 (5µm 150x4.6mm) Restek. A fase móvel constituída de 0,1% de ácido fosfórico com fluxo de 1 mL/minuto. Os ácidos orgânicos foram monitorados utilizando um detector de absorvância de UV regulado para medir sinal visível de 210 nm, 25°C. Eles foram identificados e quantificados por comparação dos tempos de retenção e as áreas dos picos com soluções de ácidos puros (PATEL et al., 2011). Foram utilizados como padrões os ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico e maleico (Sigma Aldrich-USA).

2.7. Efeito da inoculação das bactérias no desenvolvimento de plantas

2.7.1. Esterilização das sementes

Foram utilizadas sementes de feijão Guandu-forrageiro anão (*Cajanus cajan*), Eco seeds gentilmente doadas pela empresa Sementes Piraí. As sementes foram imersas em etanol 70% durante dois minutos, transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio 2% durante dez minutos, enxaguadas dez vezes com água MilliQ autoclavada e posteriormente deixadas secar em fluxo laminar até o momento do uso (KUMAR et al., 2014).

2.7.2. Eficiência dos isolados bacterianos no desenvolvimento de plantas

Para avaliar a eficiência dos isolados no desenvolvimento de plantas foi realizada a inoculação das bactérias em sementes previamente esterilizadas de feijão Guandu-forrageiro anão. O desenvolvimento das plantas foi observado em ensaios utilizando-se a solução de (HOAGLAND; ARNON, 1950), descrita na Tabela 2. Foram realizados dois tratamentos referentes aos nutrientes da citada solução nutritiva: no primeiro tratamento foi aplicada a solução completa. No segundo tratamento foi usada a solução de Hoagland e Arnon com fosfato de cálcio (insolúvel). Para cada um dos tratamentos foram realizados ensaios com e sem a presença de bactérias.

Em fluxo laminar, com todos os materiais esterilizados, as sementes de feijão Guandu-forrageiro anão foram inoculadas com a bactéria por imersão, durante 45 minutos. Em tubos tipo Sigma foram adicionados 25 mL da solução de (HOAGLAND; ARNON, 1950), um suporte para a semente com Agar (10g/L água) e a semente inoculada ou não (Figura 1). Durante 4 dias, até as sementes perfurarem o ágar na direção da solução nutritiva, foram adicionados 25 µL de água esterilizada sobre as sementes,. Os tubos permaneceram em sala de cultivo, com fotoperíodo de 12 horas durante 15 dias. Após esse período, as plantas foram retiradas dos tubos e foram avaliados os seguintes parâmetros; número de folhas, comprimento da raiz e parte área, peso da raiz e parte área úmidas e secas em estufa de circulação de ar (65°C) até peso constante.

Tabela 2. Composição da solução nutritiva de Hoagland & Arnon.

Fertilizantes/ Sais da solução estoque	Concentração da solução estoque	Completo	-P	PCa
	g/L de água	Volume da solução estoque por L de água mL/L		
KH_2PO_4 (Mol L^{-1})	136,09	1	-	-
KNO_3 (Mol L^{-1})	101,11	5	5	6
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Mol L^{-1})	236,16	5	5	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Mol L^{-1})	247,47	2	2	-
KCl (Mol L^{-1})	74,56	-	1	-
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Mol L^{-1})	-	-	-	1
Solução de Micros (*)		1	1	1
Solução de Fe EDTA(**)		1	1	1

(*)- Em 1L: 2,86 g H_3BO_3 ; 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,10 g ZnCl_2 ; 0,04 g CuCl_2 ; 0,02 g $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. (**)- 24,9 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 24,25 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 33,2g EDTA-Na; 89 mL NaOH 1N completar em 800 mL H_2O . Arejar uma noite ao abrigo da luz, completar a 1 L de água.

2.7.3. Análise de micro e macro nutrientes nas plantas

As plantas de feijão foram separadas do ágar, secas em estufa de circulação de ar, a 50 °C, até as plantas atingirem peso constante. Depois as amostras foram trituradas em moinho e usadas para a análise micro e macronutrientes.

A digestão nítrico-perclórica foi realizada em tubos de digestão, para isso 0,5 grama de cada amostra foi adicionada a um tubo, aos quais foram adicionados 6 mL da solução nítrico-perclórica (2:1). Os tubos foram colocados em bloco digestor e submetidos a aquecimento, gradativamente até atingir 190°C. Quando a amostra se apresentou límpida, o bloco foi desligado e aguardou-se o material atingir temperatura ambiente, sendo então transferido para balão de 50 mL e o volume completado com água deionizada.

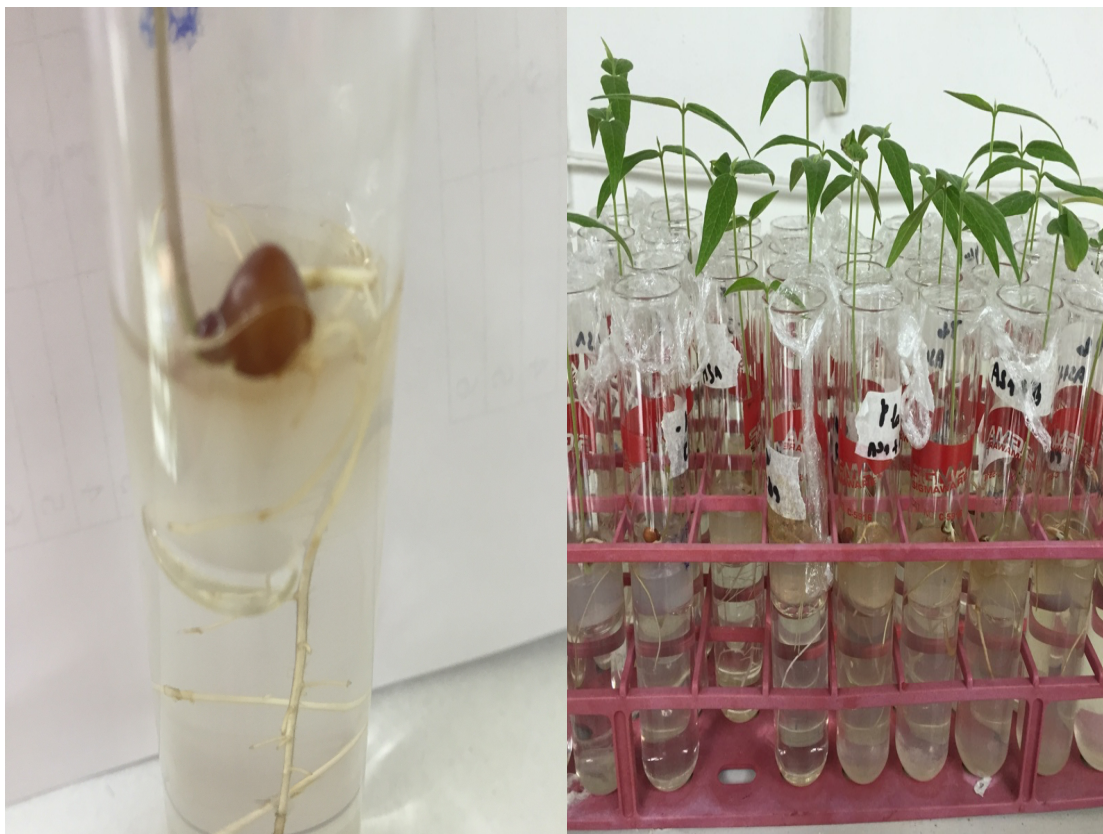


Figura 1: Teste de desenvolvimento em planta em tubos tipo Sigma Hoagland & Arnon (1950), utilizando um suporte para a semente realizado com ágar.

No material digerido foi realizada a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica (A-AS) dos metais Ferro, Manganês, Zinco, Cobre. Além disso, nesse material foi quantificado o teor de fósforo pelo método de sulfo molibdato (STRICKLAND; PARSONS, 1965).

3. Resultados e discussão

3.1. Quantificação de fosfato solubilizado, pH e produção de ácidos orgânicos pelas bactérias

A capacidade de solubilizar fosfato em meio sólido e líquido, alterar o pH do meio de cultivo e liberar ácidos orgânicos foi avaliada pelo cultivo dos diferentes isolados em meio com fosfato insolúvel. Em meio de cultivo sólido contendo fósforo

insolúvel, pode se calcular o Índice de Solubilização de Fosfato Insolúvel (ISFI), que é a razão entre o halo transparente ao redor das colônias bacterianas e o diâmetro das mesmas após 5 dias de cultivo. Na Tabela 3 pode ser observado que os diferentes isolados estudados apresentam ISFI que variam de 1,2 a 2,5 (*Pandorea pnomenusa* AS2 e *Dyella jiangningensis* MS3, respectivamente).

O método de difusão radial em meio de cultivo sólido utilizado é uma adaptação de metodologia para se avaliar a atividade de enzimas extracelulares produzidas em ensaios *in vitro* (LIN et al., 1991). Essa metodologia indica a atividade em forma qualitativa, correlacionando diretamente os diâmetros do halo de degradação e da colônia (Índice Enzimático). No ensaio apresentado em nosso trabalho o IE foi substituído pela denominação Índice de Solubilização de Fosfato Insolúvel (ISFI), considerando-se o desconhecimento do agente efetor na solubilização do fosfato. Essa metodologia é uma ferramenta prática que facilita e acelera a seleção e a comparação das atividades de diferentes isolados microbianos, uma vez que neste índice consideram-se diretamente a correlação entre o tamanho do halo e a capacidade de ação dos microrganismos (LIN et al., 1991; FUNGARO et al., 2002). FUNGARO et al. (2002) sugeriram que um IE maior que 1,0 seria indicação de efetiva produção e excreção de enzimas. Apropriando-se desse valor descrito pode-se considerar no presente caso, que todos os isolados estudados apresentam capacidade de solubilizar fosfato insolúvel. Além disso, o isolado MS3 de *Dyella jiangningensis* apresenta grande potencialidade no processo de solubilização do fósforo, pois no teste em meio sólido apresentou ISFI de 2,5.

Nos testes quantitativos de dosagem de fosfato solubilizado realizados por colorimetria pode-se observar (Tabela 3) que a concentração de fósforo solúvel no meio de cultura variou entre 130 a 290mg/L aproximadamente, e foi dependente da bactéria utilizada. A maior quantidade de fósforo solubilizado foi obtida pela *Pseudomonas* sp. AS2 (293,99 mg/L), seguida pelos isolados de *Pandoraea pnomenusa* AS3 (291,21 mg/L), *Rhizobium* sp. MS4 (290,40 mg/L) e *Pandoraea pnomenusa* MS5 (278,91 mg/L). A bactéria *Dyella jiangningensis* MS3 solubilizou a menor quantidade de fósforo (130, 50 mg/L), diferentemente do que foi observado no teste com cultivo em meio sólido, portanto o método usado para se analisar as

características solubilizadoras de fosfato por micror-organismos interfere nas conclusões classificatória dessa característica. Considerando-se que a metodologia em meio sólido é relativa e a dosagem colorimétrica de fosfato solúvel é quantitativa, resolvemos considerar os organismos com maior potencial de solubilizar fosfato, aqueles descritos no resultado do teste colorimétrico. Desta forma o isolado AS2 classificado como o *Pseudomonas* sp. pode ser considerado o organismos que melhor solubilizou fosfato *in vitro*.

Estudos de YU et al. (2011) com uma *Pseudomonas* sp. isolada do solo mostram, que após crescer 3 dias em meio líquido, essa bactéria foi capaz de tornar solúvel 204,27 mg/L de fósforo que estava no meio com fosfato tri cálcio insolúvel. De modo similar, LIU et al. (2014) isolaram um *Rhizobium* sp. (AX7) que após 3 dias em meio de cultura dissolveu 275 mg/L de fósforo, assim como, OLIVEIRA et al. (2009) isolaram uma *Burkholderia* sp. B5(L3) da rizosfera de milho cultivado no cerrado brasileiro, e com capacidade de solubilizar 175,4 mg/L de fósforo após 10 dias em meio de cultivo. No presente estudo os isolados CB8 e MB5 classificados como *Burkholderia* sp. CB8 solubilizaram 201,27 e 215,67 mg/L de fósforo, respectivamente. Os dados de literatura sugerem que os 4 primeiros isolados são promissores quanto ao possível uso a agrônomo de suas características solubilizadoras.

Podemos observar na Tabela 3 a capacidade das estirpes de solubilizar fosfato inorgânico insolúvel, segundo este teste a bactéria que apresentou maior solubilização de fosfato foi *Dyella jiangningensis* (MS3), resultado contrário à solubilização em meio de cultivo líquido. Segundo ANZUAY et al. (2013) a quantidade de fósforo solubilizada por cada isolado no meio líquido, não tem correlação com o diâmetro do halo produzido no meio sólido, indicando que a formação de halo não é o critério apropriado para a seleção de eficientes isolados solubilizadores de fosfato.

A acidificação do meio de cultura particularmente o meio NBRIP líquido, parece ser uma boa abordagem para identificar estirpes solubilizadoras de fosfato (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999), nesse sentido pela Tabela 3 pode-se observar que todos os isolados estudados acidificaram de modo similar o meio de cultivo os quais tiveram seu pH final entre 4,1 a 4,3.

Vários são os mecanismos de mobilização de fósforo pelos micror-organismos do solo que podem promover melhor desenvolvimento das plantas. Esses mecanismos podem ser divididos genericamente em dois grandes grupos que permitem direta ou indiretamente a disponibilidade do fosforo ou o aumento da captação do mesmo pelos vegetais. Produção de fito-hormônios e algumas enzimas específicas são ferramentas que podem estimular o desenvolvimento e crescimento de raízes e portanto facilitar a captação do fósforo. Por outro lado, a produção de ácidos orgânicos e efluxo de prótons são mecanismos relacionados á solubilização e disponibilização desse elemento (RICHARDSON; SIMPSON, 2011).

A produção de ácidos orgânicos pelos diferentes isolados estudados nesse trabalho foi avaliada através da análise em CLAE do meio de cultivo (Tabela 3). A concentração desses ácidos nas amostras foi baixa para todos os ácidos e os resultados foram apresentados apenas considerando-se produção (+) ou não (-). Foi possível observar que dos 9 isolados solubilizadores de fosfato somente 5 são produtores de ácidos orgânicos (Tabela 3). Foram detectados os ácidos orgânicos tartárico, láctico e málico na *Pseudomonas* sp. AS1 e na *D. jiangningensis* MS3. O isolado AS2 de *Pseudomonas* sp. produziu os ácidos tartárico, láctico, málico e maleico. Os isolados *P. pnomenusa* (AS3 e CB9) produziram os ácidos tartárico, láctico, maleico e málico. Os isolados *P. pnomenusa* MS5, *Burkholderia* sp. (CB8 e MB5) e o *Rhizobium* sp. MS4 não produziram ácidos orgânicos. Nossos resultados sugerem que não existe relação entre os diferentes tipos de ácidos produzidos pelas bactérias estudadas e a sua capacidade de disponibilizar o fósforo insolúvel, assim como não foi possível relacionar essa solubilização com alterações do pH no meio (variação de 4,1 a 4,3) descrito na Tabela 3.

Dados de trabalhos encontrados na literatura mostram uma grande variedade de ácidos produzidos por diversos micro-organismos solubilizadores de fósforo. ZENG, WU e WEN, 2016) isolaram a *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 da rizosfera na China, e este isolado produziu os ácidos gluconico, acético, pirúvico, tartárico, oxálico, 2-cetoglucónico, metanoico e láctico. Resultados similares foram encontrados por CHEN et al. (2006) que identificou 10 isolados como *Bacillus megaterium* solubilizadores de fosfato, produtores de diferentes tipos de ácidos orgânicos, porém o *B. megaterium* (CC-BC31) foi incapaz de produzir qualquer um

dos tipos desses ácidos. Cada isolado é independente em sua capacidade de solubilizar fosfato, quantidade e tipo de ácido secretado mesmo quando foram providos com as condições nutrientes semelhantes.

Tabela 3. Índice de solubilização fosfato inorgânico insolúvel (ISFI) , pH final do meio de cultivo líquido, quantidade de fósforo dissolvido e produção de ácidos orgânicos pelos isolados bacterianos solubilizadores de fosfato.

Isolado	ISFI*	pH do meio**	P solúvel (mg/L)	Ácidos orgânicos				
				T	L	C	MA	ME
<i>Pseudomonas</i> sp. AS1	1,3	4,32	208,45	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. AS2	1,2	4,19	293,99	+	+	-	+	+
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	1,8	4,23	291,21	+	+	-	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. CB8	1,4	4,28	201,27	-	-	-	-	-
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	1,5	4,28	264,63	+	+	-	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. MB5	1,3	4,34	215,67	-	-	-	-	-
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	2,5	4,34	130,50	+	+	-	-	+
<i>Rhizobium</i> sp. MS4	1,6	4,25	290,40	-	-	-	-	-
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	1,7	4,10	278,91	-	-	-	-	-

* Índice de solubilização fosfato inorgânico insolúvel (ISFI) - é a razão entre o diâmetro do halo de atividade (cm) e o diâmetro das colônias (cm) medidos após 5 dias de cultivo.

**pH inicial do meio de cultivo 7,0.

*** T, ácido tartárico; L, ácido láctico; C, ácido cítrico; MA, ácido málico; ME, ácido maleico.

3.2. Detecção e quantificação dos compostos indólicos

Diferentes quantidades de auxinas produzidas pelas culturas bacterianas foram identificadas pelo método colorimétrico e CLAE (Tabela 4). Métodos espectrofotométricos, que se baseiam na reação de indóis com o reagente de Salkowski e comparam o desenvolvimento de cor da mistura da reação com uma referência apropriada, são inespecíficos e fornecem apenas a determinação do teor total de indóis presentes nas amostras analisadas. Por outro lado, a análise por CLAE proporciona a quantificação de cada um dos metabólitos que podem existir no meio de cultivo individualmente (GLICKMANN; DESSAUX, 1995).

Existem cinco vias dependentes de triptofano para a produção de ácido indolacético (AIA) aonde Indol-3-acetamida (IAM), Indol-3-acetonitrilo (IAN), Triptamina (TAM), ácido indol-3-píruvico (IPyA) e Indole-3-acetaldeído (AIAd) são os principais compostos intermediários (CARRENO-LOPEZ et al., 2000; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Dependendo da capacidade metabólica do micro-organismo, ele tem uma tendência de produzir vários compostos indólicos junto com a produção de AIA. A produção de AIA por diferentes vias metabólicas nas bactérias podem estar associados a diversos efeitos nos vegetais. O ácido Indolacético produzido pela via de indol-3-acetamida está relacionado ao desenvolvimento de galhas ou tumores. Por outro lado a produção de AIA pela via do IPyA está relacionado à proliferação e crescimento das raízes (SZKOP; BIELAWSKI, 2013). Desta forma é importante identificar o tipo de derivado indólico produzido pelas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas para avaliar a influência no seu desenvolvimento.

A quantificação colorimétrica de compostos indólicos mostrou capacidade de produzir AIA por todos os isolados bacterianos (Tabela 4). A quantificação de AIA por essa metodologia variou em uma ampla faixa, de 3 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os isolados *P. pnomenusa* CB8 e *Pseudomonas* sp. AS1 apresentaram maior produção. Por outro lado, produziram AIA em menor quantidade os isolados *D. jiangningensis* MS3, *Burkholderia* sp. CB8, *Burkholderia* sp. MB5 e *P. pnomenusa* AS3.

Quando foram analisados os diferentes metabolitos relacionados às diferentes vias de produção de AIA nas bactérias (Tabela 4) verificou-se que o AIA

foi detectado em apenas 3 isolados *Pseudomonas* sp. AS1, *P. pnomenusa* CB9 e *D. jiangningensis* MS3.

O metabólito IPya foi observado somente na bactéria *D. jiangningensis* MS3, porém não foi possível quantificar. Em bactérias a produção de AIA pelo caminho do ácido indol-3-píruvico ocorre pela conversão do triptofano em ácido indol-3-píruvico, por uma aminotransferase (transaminação). No passo limitante de taxa, ácido indol-3-píruvico é descarboxilado para índol-3-acetaldeído (AIAld) pela indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC). No último passo, AIAld é oxidado em AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). O caminho do índol-3-pirúvico parece ser o principal contribuinte para o AIA livre, e é a única via que cada passo do triptofano para o AIA foi identificado (KORASICK; ENDERS; STRADER, 2013). O AIA produzido pela via do IPyA estimula a proliferação de raízes e crescimento (LAMBRECHT et al., 2000).

O composto ácido Indol-3-lactico (ILA) foi observados em todas as bactérias com exceção da *Pseudomonas* sp. AS1. Foram detectadas quantidades entre 1,47 e 2,93 µg/mL de ILA pelos isolados bacterianos. IMADA et al., (2017) quantificaram a produção de compostos indólicos do *R. tropici* CIAT899 por cromatografia líquida de ultra-desempenho-espectrometria de massas (UPLC-MS) e foi quantificado 1,90 µg/mL do composto indólico ILA. Szkop e Bielawski, (2013) quantificaram a quantidade de ILA produzido pela *Pseudomonas putida* A, utilizando várias concentrações de triptofano, e foram detectados 2.6–34.0 µg/mL. Segundo Szkop e Bielawski, (2013) o acúmulo de altas concentrações de ILA indica que, o triptofano é metabolizado eficientemente por transaminação, mas não resulta em IPyA, e não é mais convertido em AIA. Essa observação concorda com as nossas descobertas, as bactérias que mais produziram ILA (*P. pnomenusa* AS3 e *Burkholderia* sp. CB8) não produziram AIA por CLAE.

Tabela 4. Produção bacteriana de auxinas no meio líquido PEG suplementado com L- triptofano (100 µg mL⁻¹) quantificado colorimetricamente (QC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). AIA, ácido indol-3-acético; IPyA, ácido indol-3-pirúvico;ILA,Indol-3-lático acid; IAAlD, indol-3-acetaldeído.

Produção de compostos indólicos					
Isolado	QC	HPLC			
		AIA	ILA	IPyA	IAAlD
µg mL ⁻¹					
<i>Pseudomonas sp</i> AS1	14,94	10,14	nd		nd
<i>Pseudomonas sp</i> AS2	8,78	nd	d*		1,76
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	3,29	nd	1,47		0,57
<i>Burkholderia sp.</i> CB8	3,01	nd	2,93		0,82
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	16,38	d*	d*		1,51
<i>Burkholderia sp</i> MB5	3,11	nd	d*		0,30
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	2,98	d*	d*	d*	*d
<i>Rhizobium sp</i> MS4	10,68	nd	d*		2,37
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	12,67	nd	d*		0,83

d*compostos indólicos detectados, porém não passíveis de quantificação.

nd compostos não detectados

Nas bactérias, alguns intermediários da biossíntese do AIA podem ser convertidos em compostos de armazenamento, por exemplo, a redução do indol-3-piruvato e indol-3-acetaldeído em ácido indol-3-lático (ILA). A função fisiológica desses compostos é desconhecida. O ILA é inativo como fito-hormônio, mas pode competir com o AIA pelos sítios de ligações de auxinas em plantas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Foi observada a produção do composto indólico indol-3-acetaldeído IAAlD em todos os isolados com exceção da *Pseudomonas sp.* AS1. Foram detectadas quantidades de IAAlD entre 0,30-2,37 µg/mL. Fernandes et al., (2011) detectaram de 0,16-0,45 µg/ mL de IAAd em bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter* e *Bacillus*. A biossíntese do AIA pela via do indol-3-pirúvico (IPyA) e

indol-3-acetaldeído (AIAd) é predominante em plantas superiores e é observada tanto em bactérias patogênicas quanto em não patogênicas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

3.3. Teste de desenvolvimento em planta

Na Figura 2, Tabela 1A do apêndice estão apresentados os parâmetros biométricos do feijão guandu após 15 dias de desenvolvimento na solução de (HOAGLAND; ARNON, 1950) completa. Na figura 2.A pode ser observado que o número de folhas no feijão guandu após inocular a bactérias *Pseudomonas* sp. AS1 foi maior, comparando as demais bactérias inoculadas e o tratamento controle sem inocular bactéria. Esse resultado pode estar relacionado à grande quantidade de AIA produzida por essa bactéria, um parâmetro importante para o feijão guandu tendo em vista que as folhas são órgãos fotossintetizantes que capturam e utilizam a energia luminosa para as reações químicas vitais à planta (BONFIM-SILVA et al., 2011). Entretanto, após inocular a bactéria *Burkholderia* sp. MB5 o número de folhas foi menor do que o controle sem inocular a bactéria. Uma possível explicação pode ser que há uma competição entre a planta e a bactéria pelos nutrientes do substrato.

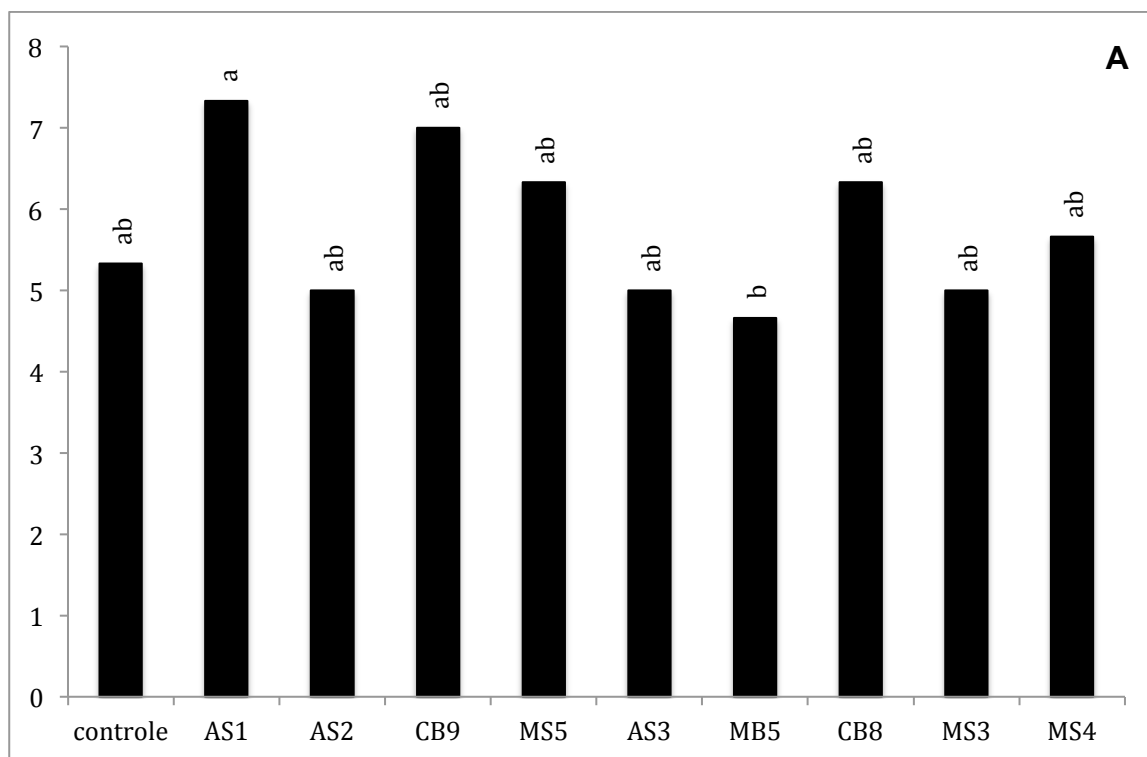


Figura 2A: Estatística dos parâmetros biométricos do feijão guandu após 15 dias de desenvolvimento na solução de Hogland completa na presença das bactérias ou não (controle), número de folhas do feijão guandu.

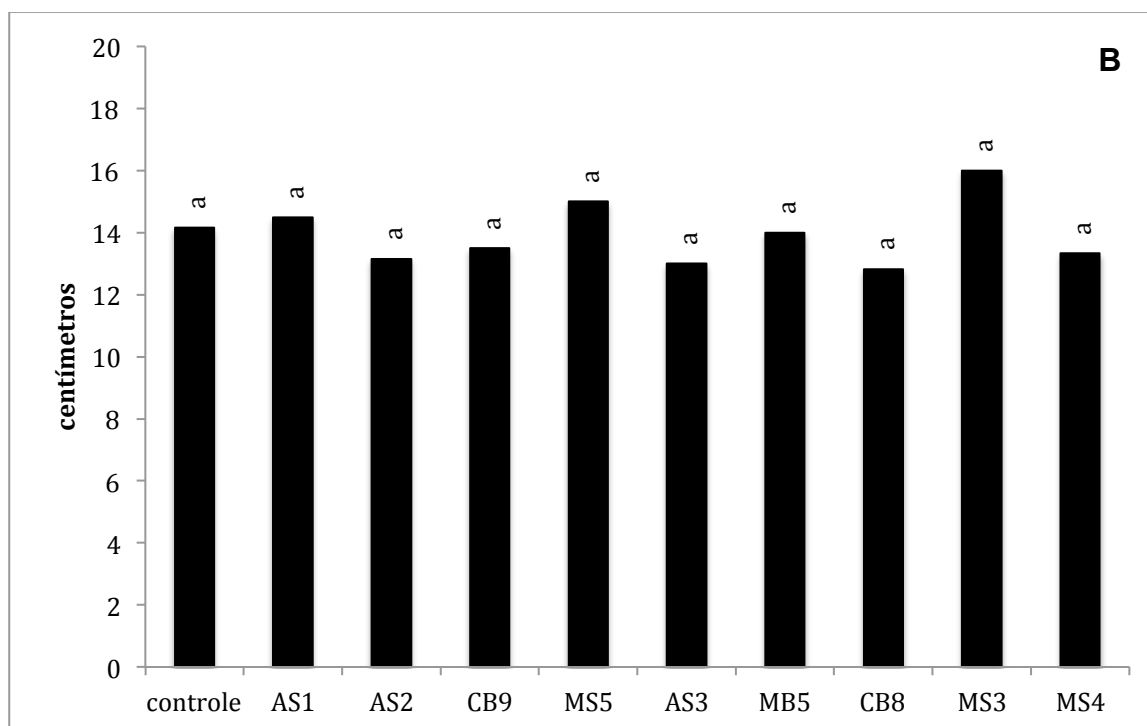


Figura 2B: Estatística dos parâmetros biométricos do feijão guandu após 15 dias de desenvolvimento na solução de Hogland completa na presença das bactérias ou não (controle), comprimento da parte aérea do feijão guandu.

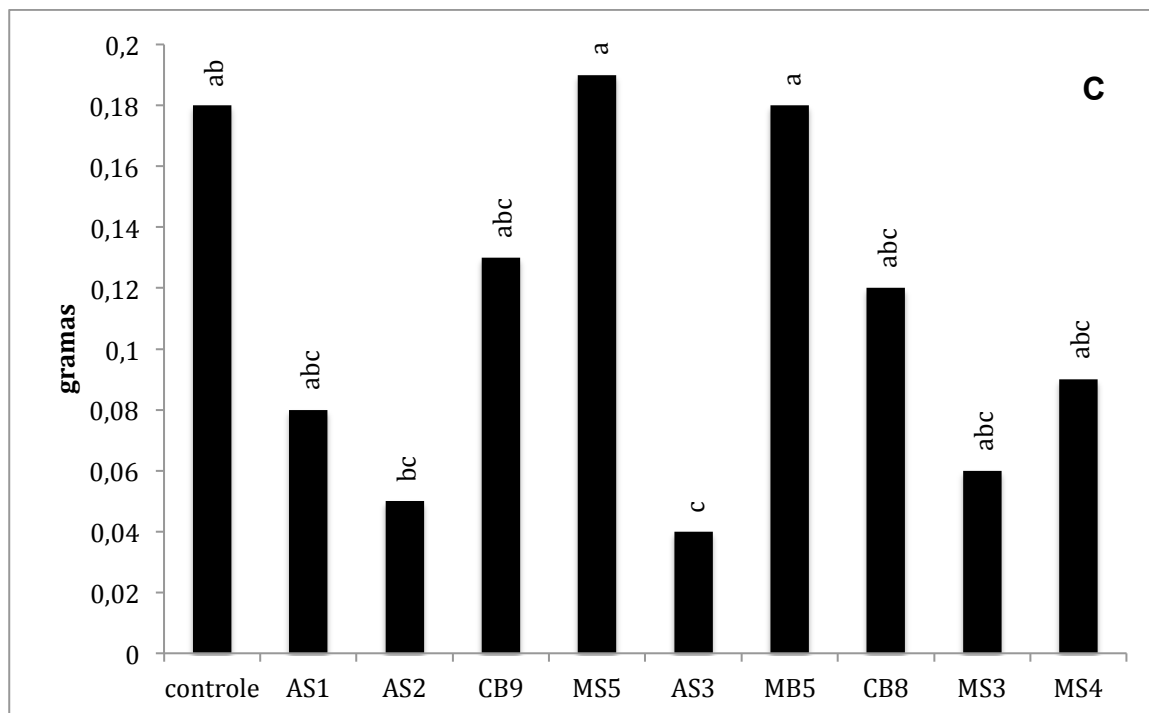


Figura 2C: Estatística dos parâmetros biométricos do feijão guandu após 15 dias de desenvolvimento na solução de Hogland completa na presença das bactérias ou não (controle), peso da matéria seca da parte aérea.

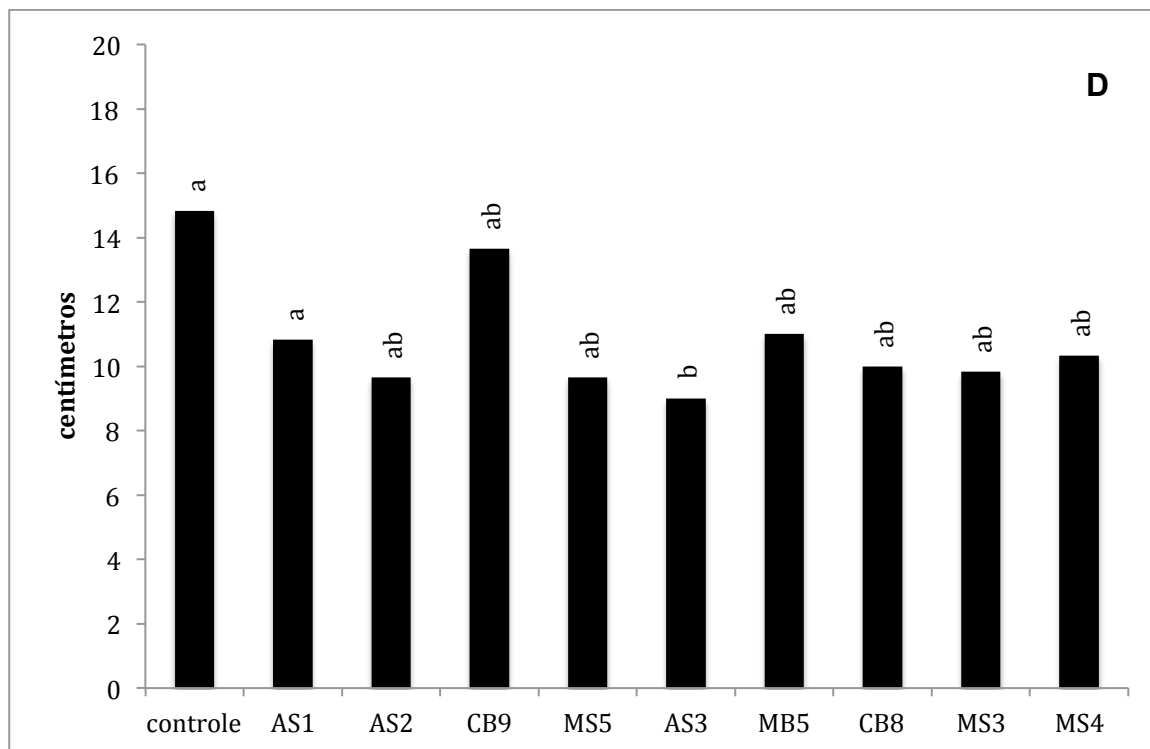


Figura 2D: Estatística dos parâmetros biométricos do feijão guandu após 15 dias de desenvolvimento na solução de Hogland completa na presença das bactérias ou não (controle), comprimento da raiz do feijão guandu.

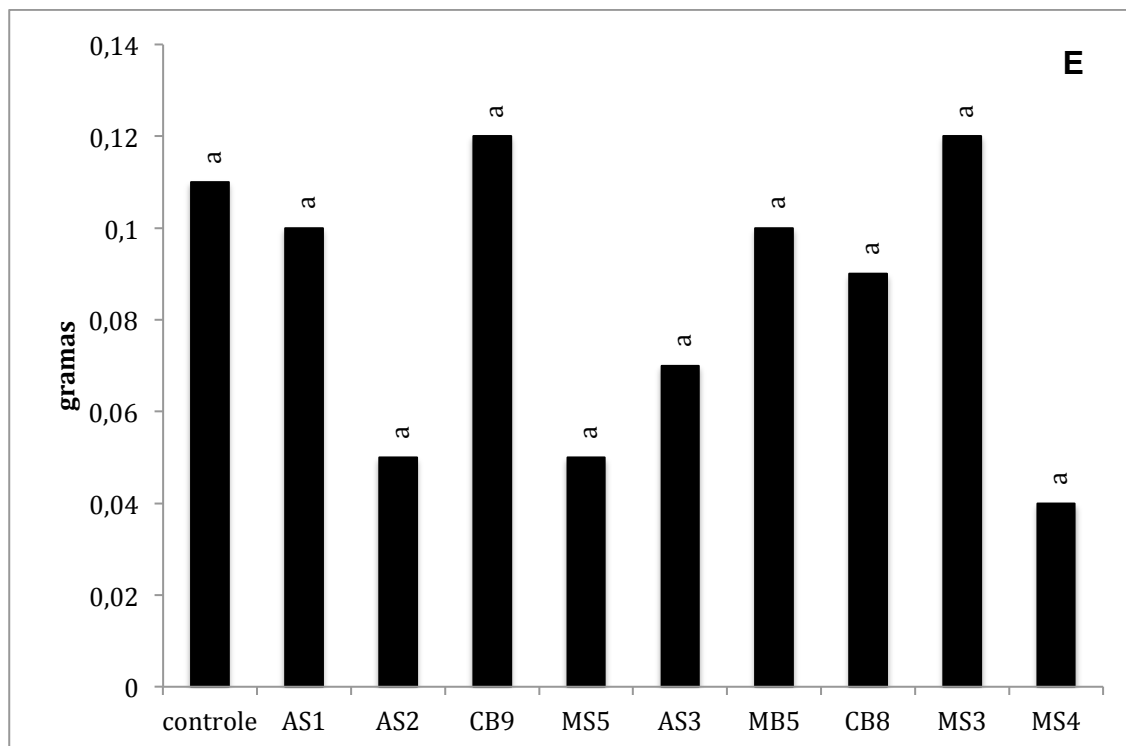


Figura 2E: Estatística dos parâmetros biométricos do feijão guandu após 15 dias de desenvolvimento na solução de Hogland completa na presença das bactérias ou não (controle), peso da matéria seca da raiz do feijão guandu.

Estatisticamente não houve diferença no comprimento da parte aérea do feijão guandu após inocular as bactérias solubilizadoras de fosfato (Figura 2B). Na Figura 2C estão apresentados os dados da matéria seca da parte aérea do feijão guandu, somente a planta que foi inoculada com a bactéria *P. pnomenusa* MS5 apresentou peso maior do que o controle sem inocular a bactéria. Sugerindo que esta planta apresentou parte aérea mais robusta.

Na Figura 2D estão apresentados os comprimentos da raiz do feijão guandu, pode ser observado que após inocular as bactérias solubilizadoras de fosfato, o tamanho da raiz diminuiu comparado ao controle sem a bactéria. Entretanto, na Figura 2E está apresentado o peso da matéria seca da raiz, estatisticamente não houve diferença entre as bactérias e o controle sem a bactéria.

No geral, inocular a bactéria no feijão guandu não afetou o desenvolvimento da planta quando estas estavam em condições nutricionalmente adequadas (meio nutritivo completo).

Para avaliar a eficiência das bactérias solubilizadoras de fosfato, os isolados bacterianos foram inoculados no feijão guandu, e se desenvolveram em dois substratos, a solução de (HOAGLAND; ARNON, 1950) completa e com fosfato insolúvel. Após 15 dias de cultivo, foram avaliados os parâmetros biométricos que são apresentados na Tabela 5 e Figura 3. Pôde-se observar que o número de folhas de feijão guandu cultivado com fosfato solúvel e insolúvel na presença de bactérias, não houve diferença e interação estatística. A média do comprimento da parte aérea do feijão guandu foi igual para as plantas cultivadas no substrato completo e com fósforo insolúvel na presença das bactérias, porém houve interação estatística (Figura 3A, Tabela 4A). A média do comprimento da raiz do feijão guandu foi igual para as planta que cresceram no substrato completo e com fósforo insolúvel na presença das bactérias, porém houve interação estatística entre os substratos (Figura 3B, tabela 3A). O peso da matéria seca da parte aérea foi maior nas plantas que se desenvolveram no substrato com fósforo insolúvel na presença das bactérias, e houve interação estatística (Figura 3C, Tabela 5A).

Como pode se observar, na interação estatística entres os dados do cultivo de feijão guandu com fósforo solúvel e insolúvel na presença de bactérias, houve um menor desenvolvimento da parte aérea das plantas no substrato com fósforo insolúvel inoculadas com as bactérias *D. jiangningensis* MS3 e *P. pnomenusa* MS5 (Figura 3A). As demais plantas apresentaram estatisticamente o mesmo comprimento de parte aérea quando comparadas ao substrato completo e com fósforo insolúvel. Esse resultado indicou que as bactérias podem ser utilizadas para melhorar o desenvolvimento do feijão guandu, ou outra cultura, em solo com pouco fosfato solúvel considerando-se a capacidade de solubilizar esse *composto in vitro*.

A interação entre o comprimento da raiz comparando os substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel estão apresentados na Figura 3 B. As plantas que foram inoculadas com as bactérias *Pseudomonas* sp. AS2, *P. pnomenusa* MS5, *Burkholderia* sp. MB5, *D. jiangningensis* MS3 e *Rhizobium* sp. MS4 apresentaram comprimento da raiz maior quando cultivadas em meio com fósforo insolúvel, comparando com a planta desenvolvida no meio completo. Isso pode ser interpretado como um comportamento exploratório, permitindo que essas raízes cresçam ao máximo até que elas encontrem maior eficiência na

disponibilidade de fósforo (FERREIRA et al., 2010). Por outro lado, a planta que foi inoculada com a bactérias *Burkholderia* sp. CB8 e se desenvolveu no substrato com fósforo insolúvel apresentou comprimento da raiz menor quando comparado a planta desenvolvida no substrato completo

Tabela 5: Estatística dos parâmetros biométricos do desenvolvimento do feijão guandu na solução de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato.

	Número folhas	Comprimento P aérea (cm)	Peso P aérea seca g/planta	Comprimento raiz (cm)	Peso raiz seca g/planta
Completo	5,81 a	13,92 a	0,10 b	10,44 a	0,08 a
Fosfato insolúvel	5,62 a	13,75 a	0,13 a	10,81 a	0,07 a
Teste F	10,35	0,54 ns	8,70**	2,01 ns	7,86**
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	6,83 a	14,08 a	0,14 ab	12,23 a	0,13 a
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	6,6 ab	13,91 a	0,10 bcd	9,58 a	0,10 ab
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	5,33 cd	14,41 a	0,12 abcd	10,75 a	0,10 ab
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	5,16 cd	13,83 a	0,06 d	11,25 a	0,05 bc
<i>Burkholderia</i> sp MB5	4,83 d	14,33 a	0,14 abc	11,66 a	0,08 bc
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	6,16 abc	14,00 a	0,19 a	11,66 a	0,06 bc
<i>Burkholderia</i> sp CB8	6,33 abc	13,58 a	0,13 abc	8,41 a	0,08 abc
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	4,66 d	13,50 a	0,07 cd	9,16 a	0,05 bc
<i>Rhizobium</i> sp MS4	5,50 bcd	12,91 a	0,08 bcd	10,91 a	0,03 c
Dms	1,23	3,08	0,06	4,50	0,05
CV	10,64	11,01	28,77	20,95	34,81
Test F	0,36 ns	0,38 ns	5,73*	0,59 ns	1,62 ns
Inter A x B	0,43 ns	4,37**	3,69*	3,43*	1,26 ns

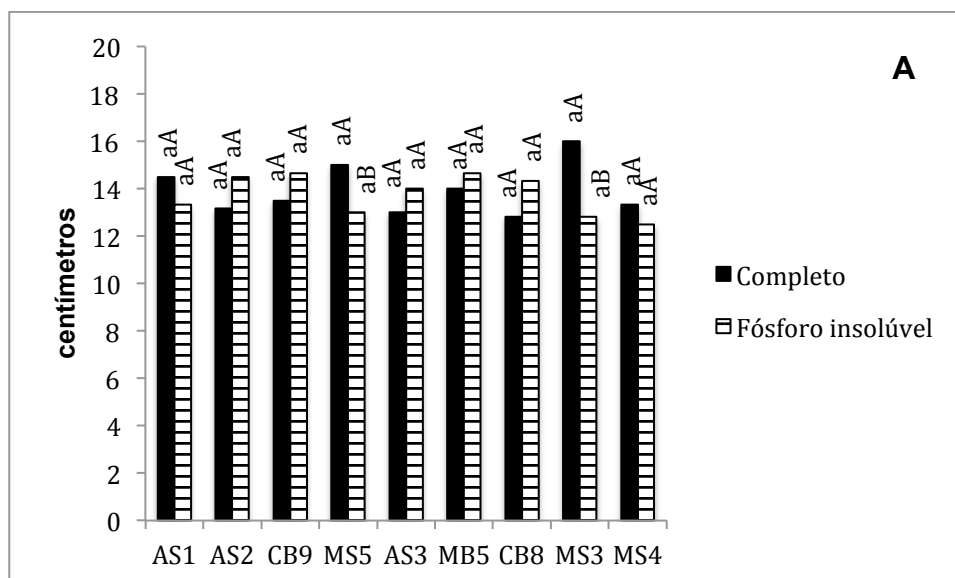


Figura 3A: Interação entre os substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel, comprimento da parte aérea do feijão guandu.

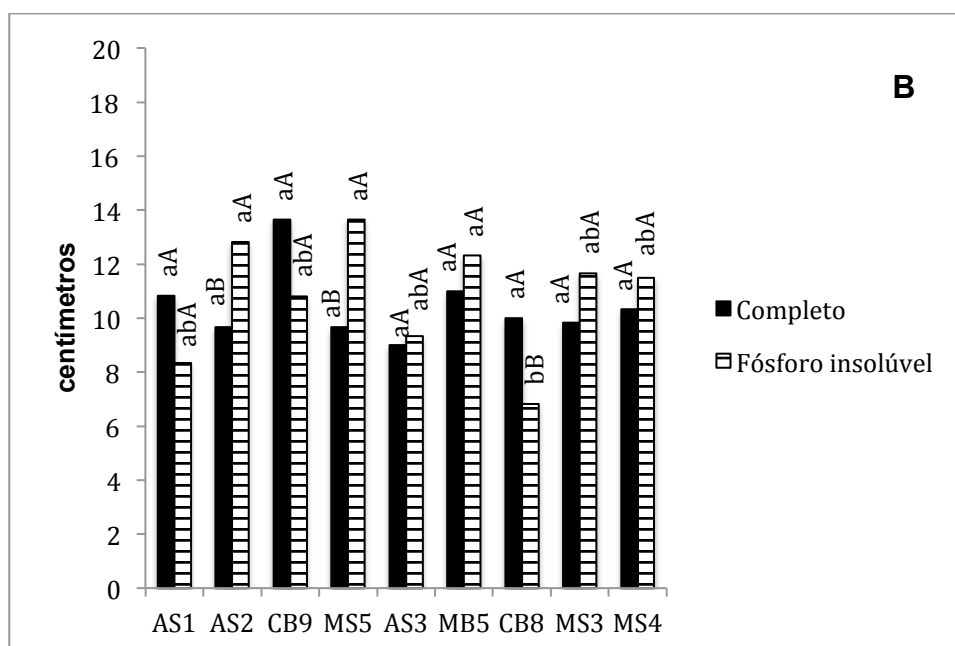


Figura 3B: Interação entre os substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel, comprimento da raiz do feijão guandu.

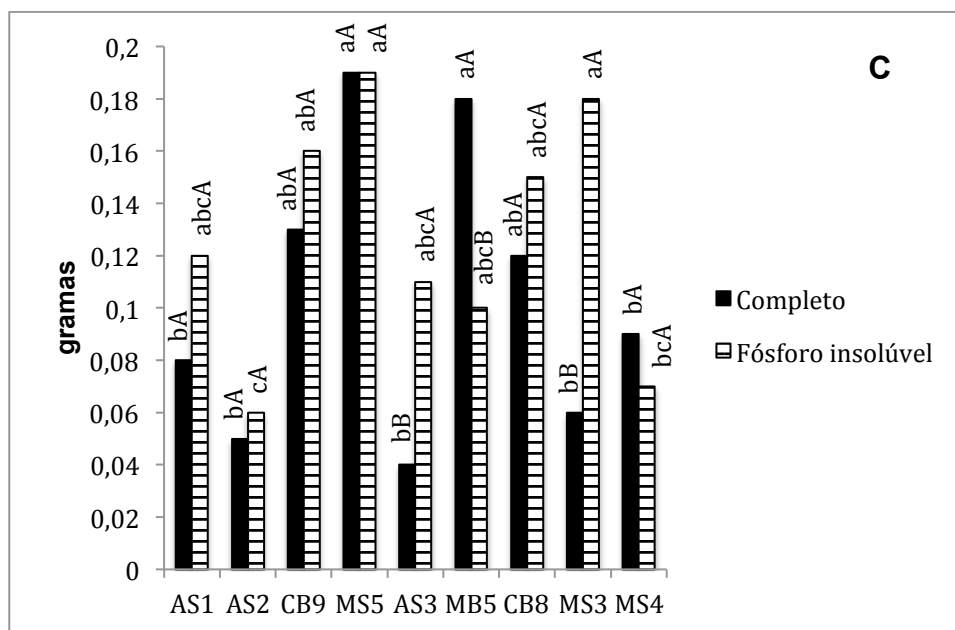


Figura 3C: Interação entre os substratos com as soluções de Hogland completa e com fósforo insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fósforo. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel, peso da matéria seca da parte aérea do feijão guandu.

O peso da matéria seca da parte aérea (Figura 3C) foi maior nas plantas que cresceram no substrato com fósforo insolúvel quando inoculadas as bactérias *P. pnomenusa* AS3 e *D. jiangningensis* MS3. Entretanto, a planta que foi inoculada com a bactéria MB5 obteve um peso da matéria seca da parte aérea menor no substrato com fósforo insolúvel. As demais plantas apresentaram o peso da matéria seca estatisticamente igual, nos dois substratos.

No geral, o desenvolvimento das plantas foram similares, destacando-se as sementes que foram inoculadas com as bactérias *P. pnomenusa* CB9, *Pseudomonas* sp. AS1 e *Burkholderia* sp. CB8. Tais bactérias quando inoculadas em sementes que foram cultivadas no substrato com fósforo insolúvel, promoveram melhora nos parâmetros biométricos quando comparadas às plantas cultivadas no substrato completo, com fósforo disponível, sugerindo que as bactérias exerceram um efeito importante na disponibilização do fósforo para as plantas.

Tabela 6: Macro e micro nutrientes do feijão guandu desenvolvidos nos substratos completo e com fósforo insolúvel (fosfato de cálcio) após a inocular as sementes com as bactérias solubilizadoras de fosfato.

Isolado	Tratamento	Macronutriente	Micronutriente			
		g/Kg de planta	mg/Kg de planta			
		P	Fe	Mn	Zn	Cu
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	Completo	6,98	52	85	22	26
	P insolúvel	7,48	76	72	25	5
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	Completo	6,15	87	95	19	6
	P insolúvel	7,30	107	80	35	10
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	Completo	7,13	110	66	19	4
	P insolúvel	4,52	77	66	26	5
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	Completo	6,34	84	76	19	8
	P insolúvel	7,46	74	69	31	10
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	Completo	7,67	88	81	29	9
	P insolúvel	6,81	81	75	30	6
<i>Burkholderia</i> sp CB8	Completo	6,32	64	83	22	12
	P insolúvel	1,61	68	54	26	10
<i>Burkholderia</i> sp MB5	Completo	6,66	79	80	22	7
	P insolúvel	3,88	153	125	41	12
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	Completo	6,98	105	126	32	12
	P insolúvel	5,26	62	56	21	2
<i>Rhizobium</i> sp MS4	Completo	6,19	99	113	27	8
	P insolúvel	3,16	74	58	24	6

Na Tabela 6 são apresentados os valores de macro e micro nutrientes. Segundo Malavolta (2006) a quantidade adequada de fósforo no feijoeiro é de 4-6 g/Kg, portanto pelos resultados apresentados podemos observar que a deficiência de fósforo é observada somente nas plantas que foram cultivadas no substrato com fosfato de cálcio e inoculadas com as bactérias *Burkholderia* sp. CB8 (1,61 g/Kg), *Burkholderia* sp. MB5 (3,88 g/Kg) e *Rhizobium* sp. MS4 (3,16 g/Kg).

Observou-se que todas as plantas estão com níveis adequados de manganês, que segundo Malavolta (2006) é de 50-400 mg/Kg de planta no feijoeiro. O manganês desempenha as atividades metabólicas de ordens diretas ou indiretas, com capacidade para ativar enzimas responsáveis pelo controle de processos de oxidação-redução, como a produção de clorofilas. Baixas concentrações desse micronutriente causam perda das folhas devido ao aparecimento de pequenas

manchas nas folhas e clorose, e o desenvolvimento estrutural da planta é normalmente comprometido (DA SILVA LOBATO et al., 2016).

O feijoeiro que foi desenvolvido no substrato com fósforo insolúvel e inoculado com as bactérias *Pseudomonas* sp. AS2 e *Burkholderia* sp. MB5; e no substrato completo e inoculado com as bactérias *Pandoraea pnomenusa* AS3 e *Dyella jiangningensis* MS3 apresentaram teores adequados de ferro. As demais plantas apresentaram deficiência desse elemento. O nível de ferro adequado no feijoeiro é de 100-300 mg/Kg de planta (MALAVOLTA, 2006). O ferro é um micronutriente essencial, utilizado na fotossíntese, divisão celular, fixação do nitrogênio, formação e morfologia das plantas. O excesso desse elemento afeta as folhas, e o crescimento é fortemente reduzido, a deficiência induz clorose (DA SILVA LOBATO et al., 2016).

Considerando-se que o teor de zinco adequado para o feijoeiro é de 35-100 mg/Kg de planta (MALAVOLTA, 2006). Somente as plantas inoculadas com os isolados bacterianos *Pseudomonas* sp. AS2 e *Burkholderia* sp. MB5 com o substrato com fosfato de cálcio (35 mg/Kg) apresentaram nível adequado de zinco. As demais plantas apresentam deficiência (19-30 mg/Kg). O zinco é um dos micronutrientes essenciais e necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas. É um componente importante para várias enzimas vitais, um estabilizador natural para proteínas. Porém quando está presente em altas concentrações pode ser tóxico a planta (GARG; KAUR, 2013).

Somente as plantas inoculadas no substrato completo com a *P. pnomenusa* AS3 e *D. jiangningensis* MS3 no substrato com fósforo insolúvel apresentaram deficiência de cobre. O teor de cobre adequado no feijoeiro é de 5-15 mg/Kg de planta (MALAVOLTA, 2006). A atividade do cobre está relacionada aos processos fotossintéticos e de respiração, fixação e distribuição do nitrogênio. Quando a planta não absorve as quantidades necessárias de cobre para o seu desenvolvimento, pode apresentar características negativas como mudanças de cor e estrutura da folha (DA SILVA LOBATO et al., 2016).

Cavalcante et al. (2012) cultivaram o feijão guandu anão como adubo verde e quantificaram o teor de micronutrientes na parte aérea seca. Foi observado nessas plantas 88,7 mg de ferro, 70,5 mg de manganês, 25,2 mg/Kg de zinco, e 3 g de

fósforo a cada Kg de planta da parte aérea do feijão guandu anão. Em nosso trabalho as plantas inoculadas com as bactérias *Burkholderia* sp. MB5 e *Rhizobium* sp. MS4 que se desenvolveram no substrato com fosfato insolúvel, e apresentaram parâmetros biométricos inferiores ao das plantas cultivadas no substrato completo, apresentando ainda deficiência de fósforo. A inoculação da *Burkholderia* sp. CB8 em sementes que se desenvolveram no substrato com fosfato de cálcio aumentou os parâmetros biométricos da planta, porém esta apresentou deficiência de fósforo. Destacaram-se a inoculação das bactérias *P. pnomenusa* CB9 e *Pseudomonas* sp. AS1, pois as plantas originárias desses tratamentos apresentaram parâmetros biométricos superiores ao das plantas cultivadas no substrato completo além dos níveis adequados de fósforo.

4. Conclusão

Neste estudo a partir de consórcios degradadores da biomassa, foram isoladas 9 bactérias solubilizadoras de fosfato. Seleccionadas pelo critério de formação de halo em meio de cultivo sólido contendo fósforo insolúvel. A formação de halo não é o critério apropriado para a seleção de eficientes isolados produtores de fosfato. Dentre os 9 isolados solubilizadores de fosfato somente 5 microorganismos produzem ácidos orgânicos, sugerindo que esse possa ser um mecanismo de solubilização dos fosfato. Os demais organismos devem utilizar um outro mecanismos para solubilizar fosfato.

Todos os isolados são produtores de compostos indolícos. Destacando-se o isolado *Pseudomonas* sp. (AS1) que produziu a maior quantidade de ácido indol-3-acético (AIA) e o isolado *Dyella jiangningensis* MS3, o único que produziu o composto indolílico ácido indol-3-píruvico (IPya) que estimula a proliferação de raízes e crescimento.

Apesar de todos os isolados solubilizarem fósforo em meio de cultivo líquido, somente as plantas que tiveram suas sementes inoculadas com as bactérias *Pandoraea pnomenusa* CB9 e *Pseudomonas* sp. AS1 apresentaram parâmetros biométricos superiores aos das plantas cultivadas no substrato completo e apresentaram níveis de fósforo adequado. Esses isolados se mostram promissores na sua utilização como inoculantes, tal efeito deve ser comprovado em testes em

vasos e no campo e com outras espécies vegetais. Além disso, antes de seu uso no ambiente uma avaliação da capacidade patogênica desses isolados deve ser realizado, apesar de que eles tenham sido isolados de solo e portanto existem naturalmente nesse habitat.

5. Referências bibliográficas

ANZUAY, M. S.; FROLA, O.; ANGELINI, J. G.; LUDUEÑA, L. M.; FABRA, A.; TAURIAN, T. Genetic Diversity of Phosphate-Solubilizing Peanut (*Arachis Hypogaea* L.) Associated Bacteria and Mechanisms Involved in This Ability. **Symbiosis**, v. 60, n. 3, p. 143–154, 2013.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. Improvement of Phosphate Solubilization and Medicago Plant Yield by an Indole-3-Acetic Acid-Overproducing Strain of *Sinorhizobium Meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4626–4632, 2010.

BONFIM-SILVA, E. M.; JOSÉ, T.; SILVA, A.; AVELINO, C. E.; GONÇALVES, J. M.; THOMAS, M.; PEREIRA, J. RESUMO Dentre Os Cultivares de Leguminosa Forrageira No Brasil Encontra-Se a Java, Lançada Em 2004, Obtida Por Meio Do Cruzamento Artificial de Duas Cultivares de. v. 7, p. 1–10, 2011.

CARRENO-LOPEZ, R.; CAMPOS-REALES, N.; ELMERICH, C.; BACA, B. E. Physiological Evidence for Differently Regulated Tryptophan-Dependent Pathways for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Azospirillum Brasilense*. **Molecular and General Genetics**, v. 264, n. 4, p. 521–530, 2000.

CAVALCANTE, V. S.; SANTOS, V. R.; NETO, S.; DOS SANTOS, M. A. L.; DOS SANTOS, C. G.; COSTA, L. C. Biomassa E Extração de Nutrientes Por Plantas de Cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 16, n. 5, 2012.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W.; YOUNG, C. C. Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. v. 34, p. 33–41, 2006.

DA SILVA LOBATO, A. K.; LIMA, E. J. A.; LOBATO, E. M. S. G.; MACIEL, G. M.; MARQUES, D. J. Tolerance of Plants to Toxicity Induced by Micronutrients. 2016.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 35, p. 729-737, 2011.

FERREIRA, A. S.; LEITÃO, J. H.; SILVA, I. N.; PINHEIROS, P. F.; SOUSA, S. A.; RAMOS, C. G.; MOREIRA, L. M. Distribution of Cepacian Biosynthesis Genes among Environmental and Clinical *Burkholderia* Strains and Role of Cepacian Exopolysaccharide in Resistance to Stress Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 441–450, 2010.

FUNGARO, M. H. P.; MACCHERONI JR, W.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. Melhoramento Genético Para Produção de Enzimas Aplicadas À Indústria de Alimentos. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 426–453, 2002.

GARG, N.; KAUR, H. Response of Antioxidant Enzymes, Phytochelatins and Glutathione Production towards Cd and Zn Stresses in *Cajanus Cajan (L.) Millsp.* Genotypes Colonized by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 199, n. 2, p. 118–133, 2013.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 793–796, 1995.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

IMADA, E. L.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; HUNGRIA, M.; RODRIGUES, E. P. Indole-3-Acetic Acid Production via the Indole-3-Pyruvate Pathway by Plant Growth Promoter *Rhizobium Tropicum* CIAT 899 Is Strongly Inhibited by Ammonium. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 3, p. 283–292, 2017.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L. V.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; AZAROVA, T.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophan in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 3, p. 250–256, 2006.

KHAN, K. S.; JOERGENSEN, R. G. Changes in Microbial Biomass and P Fractions in Biogenic Household Waste Compost Amended with Inorganic P Fertilizers. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 303–309, 2009.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of Phosphate-Solubilizing Microorganisms in Sustainable Agriculture—a Review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 1, p. 29–43, 2007.

KORASICK, D. A.; ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Auxin Biosynthesis and Storage Forms. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 9, p. 2541–2555, 2013.

KRAVCHENKO, L. V.; AZAROVA, T. S.; MAKAROVA, N. M.; TIKHONOVICH, I. A. The Effect of Tryptophan Present in Plant Root Exudates on the Phytostimulating Activity of Rhizobacteria. **Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 156–158, 2004.

KUMAR, K.; MADHURI, K.; MURUGAN, V.; SAKTHIVEL, K.; ANANTHARAJ, A.; SINGH, A. K.; GAUTAM, R. K.; ROY, S. D. Growth Enhancement in Vegetable Crops by Multifunctional Resident Plant Growth Promoting Rhizobacteria under Tropical Island Ecosystem. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 25, p. 2436–2448, 2014.

KUMAR, P. R.; RAM, M. R. Production of Indole Acetic Acid by Rhizobium Isolates from *Vigna Trilobata* (L) Verdc. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 27, p. 5536–5541, 2012.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. Vande; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-Acetic Acid: A Reciprocal Signalling Molecule in Bacteria–plant Interactions. **Evolution**, v. 54, p. 59, 2000.

LIN, J.-E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G.-J.; WANG, H. Y. Correlations among Several Screening Methods Used for Identifying Wood-Decay Fungi That Can Degrade Toxic Chemicals. **Biotechnology Techniques**, v. 5, n. 4, p. 275–280, 1991.

LIU, F.-P.; LIU, H.-Q.; ZHOU, H.-L.; DONG, Z.-G.; BAI, X.-H.; BAI, P.; QIAO, J.-J. Isolation and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Betel Nut (Areca Catechu) and Their Effects on Plant Growth and Phosphorus Mobilization in Tropical Soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 6, p. 927–937, 2014.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. [s.l.] Agronômica Ceres, 2006.

NAUTIYAL, C. S. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARA, C. T. Phosphate Solubilizing Microorganisms Isolated from Rhizosphere of Maize Cultivated in an Oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782–1787, 2009.

PATEL, D. K.; MURAWALA, P.; ARCHANA, G.; NARESH KUMAR, G. Repression of Mineral Phosphate Solubilizing Phenotype in the Presence of Weak Organic Acids in Plant Growth Promoting Fluorescent Pseudomonads. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3055–3061, Feb. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050746>>. Acesso em: 27 oct. 2014.

PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D. Activity, Distribution and Function of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 395–415, 2013.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989–996, 2011.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4, p. 319–339, 1999.

SACCO, L.P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos**. 2013. 47 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SHAHID, M.; HAMEED, S.; TARIQ, M.; ZAFAR, M.; ALI, A.; AHMAD, N. Characterization of Mineral Phosphate-Solubilizing Bacteria for Enhanced Sunflower Growth and Yield-Attributing Traits. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1525–1536, 2015.

SILVA, F. A. S. de; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão Do Programa Computacional Assistat Para O Sistema Operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71–78, 2002.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-Acetic Acid in Microbial and Microorganism-Plant Signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 2007.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A Manual of Sea Water Analysis**. [s.l.] Queen's Printer, 1965.

SZKOP, M.; BIELAWSKI, W. A Simple Method for Simultaneous RP-HPLC Determination of Indolic Compounds Related to Bacterial Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 3, p. 683–691, 2013.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in Action: Signalling, Transport and the Control of Plant Growth and Development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 2006.

TEWARI, S. K.; DAS, B.; MEHROTRA, S. Cultivation of Medicinal Plants—tool for Rural Development. **Journal Rural Technology**, v. 3, p. 147–150, 2004.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; KLIMOVA, S. Y.; SHESTAKOV, A. I.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Orchid-Associated Bacteria Produce Indole-3-Acetic Acid, Promote Seed Germination, and Increase Their Microbial Yield in Response to Exogenous Auxin. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 6, p. 655–664, 2007.

VIJILA, K. Estimation of IAA Production in Nitrogen Fixing Microorganisms. **Practical manual-microbial interaction in soil. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore**, p. 38–39, 2000.

YU, X.; LIU, X.; ZHU, T. H.; LIU, G. H.; MAO, C. Isolation and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Walnut and Their Effect on Growth and Phosphorus Mobilization. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 4, p. 437–446, 24 Feb. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00374-011-0548-2>>.

ZENG, Q.; WU, X.; WEN, X. Effects of Soluble Phosphate on Phosphate-Solubilizing Characteristics and Expression of Gcd Gene in *Pseudomonas Frederiksbergensis* JW-SD2. **Current microbiology**, v. 72, n. 2, p. 198–206, 2016.

APÊNDICE

1A: Valores médios obtidos para número de folhas, comprimento aéreo, peso da matéria seca da parte aérea, comprimento da raiz, e peso da raiz, peso da matéria seca da raiz de feijão guandu, cultivado em meios contendo solução de Hogland completa, após 15 dias de cultivo.

	Número folhas	Comprimento aérea	Peso aérea	Peso matéria seca parte aérea	Comprimento raiz	Peso raiz	Peso matéria seca da raiz
Sem bactéria	5,33ab	14,16a	0,39a	0,18a	14,83a	0,12a	0,11a
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	7,33a	14,50	0,25abc	0,08ab	10,83ab	0,11a	0,10a
<i>Dyella</i> <i>jiangningensis</i> MS3	5,00b	16,00a	0,32a	0,06ab	9,83b	0,15a	0,12a
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	5,00b	13,16a	0,17c	0,05b	9,66b	0,08a	0,05a
<i>Burkholderia</i> sp MB5	4,66b	14,00a	0,35a	0,18a	11,00ab	0,10a	0,10a
<i>Burkholderia</i> sp CB8	6,33ab	12,83a	0,33a	0,12ab	10,00ab	0,13a	0,09a
<i>Pandoraea</i> <i>pnomenusa</i> AS3	5,00b	13,00a	0,18bc	0,04b	9,00b	0,10a	0,07a
<i>Rhizobium</i> sp MS4	5,66ab	13,33a	0,11c	0,09ab	10,33ab	0,09a	0,04a
<i>Pandoraea</i> <i>pnomenusa</i> MS5	6,33ab	15,00a	0,31ab	0,19a	9,66b	0,07a	0,05a
DMS	2,13	3,48	0,14	0,12	4,96	0,07	0,09
CV	13,24	8,69	18,10	39,13	16,38	25,73	39,76
Test F	4,11**	2,29 ns	11,10**	5,48**	2,93*	2,24ns	2,31 ns

2A: Valores médios obtidos para número de folhas, comprimento aéreo, peso da matéria seca da parte aérea, comprimento da raiz, e peso da raiz, peso da matéria seca da raiz de feijão guandu, cultivado em meios contendo solução de Hogland completa e fósforo insolúvel, após 15 dias de cultivo.

	Número folhas	Comprimento aérea	Peso aérea	Peso matéria aérea seca	Comprimento raiz	Peso raiz	Peso matéria raiz seca
Completo	5,81a	13,92a	0,26a	0,10b	10,44a	0,10a	0,08a
Fósforo insolúvel	5,62a	13,75a	0,24b	0,13a	10,81a	0,10a	0,07a
Teste F	10,35	0,54ns	32,36**	8,70**	2,01ns	6,63**	7,86**
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	6,83a	14,08a	0,33ab	0,14ab	12,23a	0,15a	0,13a
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	6,6ab	13,91a	0,27b	0,10bcd	9,58a	0,11abcd	0,10ab
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	5,33cd	14,41a	0,27b	0,12abcd	10,75a	0,11abc	0,10ab
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	5,16cd	13,83a	0,18c	0,06d	11,25a	0,09bcd	0,05bc
<i>Burkholderia</i> sp MB5	4,83d	14,33a	0,26b	0,14abc	11,66a	0,09bcd	0,08bc
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	6,16abc	14,00a	0,31ab	0,19a	11,66a	0,10abcd	0,06bc
<i>Burkholderia</i> sp CB8	6,33abc	13,58a	0,36a	0,13abc	8,41a	0,14ab	0,08abc
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	4,66d	13,50a	0,16c	0,07cd	9,16a	0,08cd	0,05bc
<i>Rhizobium</i> sp MS4	5,50bcd	12,91a	0,11c	0,08bcd	10,91a	0,06d	0,03c
DMS	1,23	3,08	0,07	0,06	4,50	0,05	0,05
CV	10,64	11,01	14,02	28,77	20,95	24,75	34,81
Test F	0,36ns	0,38ns	5,78*	5,73*	0,59ns	0,30ns	1,62ns
Inter A x B	0,43ns	4,37**	4,76**	3,69*	3,43*	3,64*	1,26ns

3A: Interação entre o comprimento da raiz do feijão guandu, cultivado no substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel.

	Completo	Fósforo insolúvel
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	13,66 aA	10,80 abA
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	10,83 aA	8,33 abA
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	9,83 aA	11,66 abA
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	9,66 aB	12,83 aA
<i>Burkholderia</i> sp MB5	11,00 aA	12,33 aA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	9,66 aB	13,66 aA
<i>Burkholderia</i> sp CB8	10,00 aA	6,83 bB
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	9,00 aA	9,33 abA
<i>Rhizobium</i> sp MS4	10,33 aA	11,50 abA

4A: Interação entre o comprimento da parte aérea do feijão guandu, cultivado no substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel.

	Completo	Fósforo insolúvel
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	13,50 aA	14,66 aA
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	14,50 aA	13,33 aA
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	16,00 aA	12,83 aB
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	13,16 aA	14,50 aA
<i>Burkholderia</i> sp MB5	14,00 aA	14,66 aA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	15,00 aA	13,00 aB
<i>Burkholderia</i> sp CB8	12,83 aA	14,33 aA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	13,00 aA	14,00 aA
<i>Rhizobium</i> sp MS4	13,33 aA	12,50 aA

5A: Interação entre o peso da matéria seca da parte aérea do feijão guandu, cultivado no substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel.

	Completo	Fósforo insolúvel
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	0,13 abA	0,16 abA
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	0,08 bA	0,12 abcA
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	0,06 bB	0,18 aA
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	0,05 bA	0,06 cA
<i>Burkholderia</i> sp MB5	0,18 aA	0,10 abcB
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	0,19 aA	0,19 aA
<i>Burkholderia</i> sp CB8	0,12 abA	0,15 abcA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	0,04 bB	0,11 abcA
<i>Rhizobium</i> sp MS4	0,09 bA	0,07 bcA

6A: Interação entre o peso da raiz do feijão guandu, cultivado no substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel.

	Completo	Fósforo insolúvel
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	0,14 abA	0,16 aA
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	0,11 abA	0,12 abcA
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	0,15 aA	0,08 bcdB
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	0,08 abA	0,10 abcA
<i>Burkholderia</i> sp MB5	0,10 abA	0,09 bcdA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	0,07 bB	0,13 abcA
<i>Burkholderia</i> sp CB8	0,13 abA	0,15 abA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	0,10 abA	0,06 cdA
<i>Rhizobium</i> sp MS4	0,09 abA	0,03 dB

7A: Interação entre o peso da parte aérea da raiz do feijão guandu, cultivado no substratos com as soluções de Hogland completa e com fosfato insolúvel, após inocular o feijão guandu com as bactérias solubilizadoras de fosfato. As letras minúsculas comparam o controle e as letras maiúsculas comparam os substratos com a solução de Hogland completa e com fósforo insolúvel.

	Completo	Fósforo insolúvel
<i>Pandoraea pnomenusa</i> CB9	0,34 aA	0,33 aA
<i>Pseudomonas</i> sp AS1	0,25 abA	0,28 abcA
<i>Dyella jiangningensis</i> MS3	0,32 aA	0,23 bcdB
<i>Pseudomonas</i> sp AS2	0,17 bcA	0,19 cdeA
<i>Burkholderia</i> sp MB5	0,35 aA	0,18 deB
<i>Pandoraea pnomenusa</i> MS5	0,31 aA	0,31 abA
<i>Burkholderia</i> sp CB8	0,33 aA	0,38 aA
<i>Pandoraea pnomenusa</i> AS3	0,18 bcA	0,14 deA
<i>Rhizobium</i> sp MS4	0,11 cA	0,12 eA

CAPÍTULO 5 – Considerações finais

A pesquisa realizada com os isolados bacterianos provenientes dos consórcios microbianos degradadores da biomassa, mostrou que as bactérias isoladas possuem potencial para ser aplicadas em processos industriais e ambientais. Foram isoladas 2 bactérias produtoras de exopolissacarídeos, e através do sequenciamento do 16S rDNA foram classificadas como *Pandoraea pnomenusa* (AS3 e MS5), esses isolados produziram grandes quantidades de EPS. O exopolissacarídeo produzido pela espécie *Pandoraea pnomenusa* MS5 demonstrou capacidade de inibir a produção de biofilme da bactéria patogênica *Burkholderia cepacia*, utilizando pequenas quantidades de EPS (0,25 e 0,5 mg/mL). O EPS produzido pelas duas bactérias demonstraram grande potencial biotecnológico como emulsificante de óleos e hidrocarbonetos, principalmente no que se refere a emulsificação de glicerol, óleo de girasol e amendoim. De acordo com pesquisas em literatura não há trabalhos envolvendo o uso EPS de espécies do gênero *Pandoraea*, desta forma o trabalho aqui apresentado é o primeiro que caracteriza e apresenta aplicações para o EPS do gênero *Pandoraea*.

Os testes de produção de enzimas extracelulares demonstraram que 4 isolados bacterianos produziram enzimas proteolítica extracelular. Estes isolados foram classificados como *Pseudomonas* sp. (AS2), *Pandoraea pnomenusa* (CB9 e MS5) e *Burkholderia* sp. (MB5). Todos os isolados apresentaram grande atividade de protease alcalina em pH 7, 8 e 9. Destacando-se a *Pseudomonas* sp. (AS2) que apresentou a maior atividade proteolítica e foi em pH 8. Este estudo demonstra que esses isolados tem potencial para ser aplicados em indústria de tratamento de couro, alimentícia e farmacêutica, além de também poderem ser úteis em processos envolvidos na descontaminação de águas poluídas.

Isolados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Pandoraea*, *Burkholderia*, *Dyella* e *Rhizobium* mostraram capacidade de promover a disponibilização de fosfato de uma forma insolúvel para uma forma solúvel e que pode ser utilizada pelos vegetais. Os testes em meio de cultivo sólido fosfato de cálcio insolúvel demonstraram que os isolados foram capazes de formar halo de solubilização. Estes isolados também solubilizaram fosfato de cálcio em meio de cultivo líquido. Todos os

isolados foram produtores de auxinas, destacando-se o isolado *Pseudomonas* sp. (AS1) que produziu a maior quantidade de ácido indol-3-acético (AIA). O isolado de *Dyella jiangningensis* MS3 foi o único que produziu o composto indólico ácido indol-3-píruvico (IPya) que estimula a proliferação de raízes e crescimento. Quando foi avaliada a eficiência dos isolados no desenvolvimento de plantas destacaram-se os isolados *Pandoraea pnomenusa* CB9 e *Pseudomonas* sp. AS1, as plantas inoculadas com essas bactérias e cultivadas em meio com fosfato insolúvel apresentaram parâmetros biométricos superiores aos das plantas cultivadas no substrato completo contendo fosfato solúvel e apresentaram níveis de fósforo adequado em seus tecidos. Estes isolados demonstraram potencial para o desenvolvimento de trabalhos futuros o qual podem ser utilizados como inoculantes capazes de auxiliar o fornecimento de fósforo em solos com formas insolúveis desse elemento.

Finalizando, podemos concluir que a obtenção de isolados obtidos do consórcio bacteriano apresentaram características importantes que indicam a possibilidade de aplicação deles ou de moléculas por eles sintetizadas, em diversos processos. Essas aplicações, modernas e sustentáveis, se enquadram de maneira eficiente dentro da chamada *White biotechnology*, onde os biocatalisadores (metabólitos, enzimas e micro-organismos) são os principais instrumentos da biotecnologia aplicada nas áreas produtivas.