

Graziela Miranda de Queiroz

**Isolamento e Caracterização de Bactérias
Produtoras de Polissacarídeos obtidas de
amostras da Rizosfera de Plantas**



1910001015



GRAZIELLA MIRANDA DE QUEIROZ

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
POLISSACARÍDEOS OBTIDAS DE
AMOSTRAS DA RIZOSFERA DE PLANTAS**

GRAZIELLA MIRANDA DE QUEIROZ

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
POLISSACARÍDEOS OBTIDAS DE AMOSTRAS
DA RIZOSFERA DE PLANTAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São
José do Rio Preto, para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz



TJ015/01

São José do Rio Preto – SP

2001



577.124.5

Q3i

Biossíntese dos carboidratos e dos polissacarídeos

Assunto CAPES:

2.08.02.00-5 - Bioquímica dos microorganismos

Queiroz, Graziella Miranda de.

Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polissacarídeos obtidas de amostras da rizosfera de plantas / Graziella Miranda de

Queiroz. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2001

116 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz.

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

1. Bactérias – Isolamento e caracterização. 2. Bactérias da rizosfera. 3. Polissacarídeos microbianos - Produção. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.124.5

GRAZIELLA MIRANDA DE QUEIROZ

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
POLISSACARÍDEOS OBTIDAS DE AMOSTRAS
DA RIZOSFERA DE PLANTAS**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz (Orientador)

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto, 10 de setembro de 2001.



DADOS CURRICULARES
GRAZIELLA MIRANDA DE QUEIROZ

NASCIMENTO 08.07.1976 – Barra do Graças/MT

FILIAÇÃO Wanderlei Pimenta de Queiroz
Elizabeth Miranda de Queiroz

1994/1998 Curso de Graduação – Medicina Veterinária
Universidade Federal de Goiás – UFG

1999/2001 Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, nível de Mestrado, no Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas – UNESP



À minha mamãe Elizabeth,

a quem eu amo muito.

Aos meus irmãos, Morgana e Júnior

pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de estar aqui, por me levantar nos difíceis momentos e estar sempre comigo.

À FAPESP pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho e pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz pela orientação no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos transmitidos ao longo deste período, que muito colaboraram para o meu crescimento profissional e pessoal. Em especial, ao Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann pelo auxílio em algumas dúvidas.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, em especial à Tânia, pela amizade e ajuda técnica no laboratório.

Às minhas amigas Ângela Patrícia Santana e Gabriela Teixeira Borges, que mesmo de longe me deram muito apoio nos momentos difíceis.

Às minhas amigas Patricia e Juliana pela convivência agradável e pela troca de experiência, e aos colegas da pós-graduação pela amizade e companheirismo dedicados durante o caminhar do curso, em especial: Alessandra, Alexandre, Ana Lúcia, Augusto, Luísa, Maria do Rosário e Sílvia (Mulher).

Às minhas amigas da graduação Ellen, Manuella e Natália pelas companhias agradáveis no laboratório e eventos culturais.



SUMÁRIO

LISTA DAS FIGURAS.....	ix
LISTA DAS TABELAS.....	x
RESUMO.....	01
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	03
2. OBJETIVOS.....	08
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	09
3.1. HIDROCOLÓIDES.....	09
3.2. POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS.....	13
3.3. BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS E APLICAÇÕES.....	17
3.4. SELEÇÃO DE PROVÁVEIS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOPOLÍMEROS.....	21
3.5. O AMBIENTE DO SOLO E DA RIZOSFERA.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS.....	28
4.1.1. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS.....	28
4.1.2. OBTENÇÃO DAS CULTURAS PURAS.....	29
4.1.3. MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS MICRORGANISMOS....	29
4.1.4. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	30
4.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PELOS MICRORGANISMOS.....	30
4.2.1. MEIO BASE.....	30
4.2.2. DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE DO CALDO DE FERMENTAÇÃO.....	31
4.2.3. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR..	33
4.3. PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO.....	33
4.3.1. MICRORGANISMOS.....	33
4.3.2. MEIOS DE PRODUÇÃO.....	34
4.3.3. PREPARO DO INÓCULO.....	34
4.3.4. PRODUÇÃO.....	35



SUMÁRIO

(continuação)

4.3.5.	SEPARAÇÃO.....	35
4.3.6.	DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	36
4.3.7.	DETERMINAÇÃO DO AÇÚCAR RESIDUAL NO CALDO FERMENTADO.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1.	ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	38
5.2.	SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS.....	46
5.3.	PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO.....	51
5.4.	SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO.....	51
5.5.	EFEITO DA TEMPERATURA E DO PH SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO.....	60
6.	CONCLUSÕES.....	66
	SUGESTÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES.....	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
	ANEXO I.....	75
	ANEXO II.....	85
	ANEXO III.....	89
	ANEXO IV.....	100
	ANEXO V.....	109
	ABSTRACT.....	116

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1 – Determinação da viscosidade do caldo fermentado pelas culturas selecionadas, durante fermentação a 30°C e 200 rpm, por 96 horas.....	49
Figura 2 – Determinação do crescimento celular das culturas selecionadas, realizada a cada 2 horas, em espectrofotômetro (520 nm), durante a fermentação a 30°C e 200 rpm.....	50
Figura 3 – Produção de polissacarídeo pelas culturas selecionadas utilizando diferentes concentrações de fonte de carbono em 50 mL de meio de cultivo e incubadas a 30°C e 200 rpm por 72 horas.....	54
Figura 4 – Variação do pH final do caldo de fermentação das culturas 10D, 13D e 10F em diferentes concentrações da fonte de carbono, após 72 horas de incubação a 30°C e 200 rpm.....	59
Figura 5 – Influência da temperatura na produção de polissacarídeos pelas diferentes culturas incubadas por 72 horas a 200 rpm.....	61
Figura 6 – Influência do pH sobre a produção de polissacarídeos pelas culturas selecionadas, inoculadas em 50 mL de meio de cultivo e incubadas a 200 rpm e temperaturas ideais de produção.....	64
Figura 7 – Curva padrão da glicose pelo método do DNS.....	87
Figura 8 – Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das culturas selecionadas, em 24, 48, 72 e 96 horas de incubação a 30°C e 200 rpm.....	102
Figura 9 – Representação da curva de crescimento celular das culturas selecionadas, pela leitura da densidade óptica (520 nm) em espectrofotômetro, durante tempo de incubação de até 48 horas, a 30°C e 200 rpm.....	110



LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 –	Classificação das gomas industriais.....	11
Tabela 2 –	Biopolímeros produzidos por microrganismos.....	14
Tabela 3 –	Classificação taxonômica (família, nome científico e vulgar e idade aproximada) das plantas em que foram coletadas as amostras da rizosfera para o isolamento das bactérias e o número de linhagens isoladas de cada amostra.....	40
Tabela 4 –	Porcentagem de semelhança (conforme as características observadas) entre os gêneros das bactérias Gram positivas isoladas e o <i>BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology</i> (1994).....	45
Tabela 5 –	Porcentagem de semelhança (de acordo com os testes bioquímicos realizados) entre os gêneros das bactérias Gram negativas isoladas e o <i>BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology</i> (1994).....	46
Tabela 6 –	Produção de polissacarídeo pela <i>Pseudomonas</i> 10D, em 50 mL de meio com diferentes concentrações de fonte de carbono, a 30°C e 200 rpm por 72 horas.....	53
Tabela 7 –	Produção de polissacarídeo pela <i>Pseudomonas</i> 13D, em 50 mL de meio com diferentes concentrações de fonte de carbono, a 30°C e 200 rpm por 72 horas.....	55
Tabela 8 –	Produção de polissacarídeo pela <i>Pseudomonas</i> 10F, em 50 mL de meio com diferentes concentrações de fonte de carbono, a 30°C e 200 rpm por 72 horas.....	55
Tabela 9 –	Produção de polissacarídeo pelas culturas selecionadas, em 50 mL de meio com 1,0% da fonte de carbono, incubadas a 200 rpm por 72 horas e diferentes temperaturas.....	63
Tabela 10 –	Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de <i>Dieffenbachia amoena</i> Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode), semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.....	90
Tabela 11 –	Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul (Embaúba) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.....	92



LISTA DAS TABELAS

(continuação)

Tabela 12 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de <i>Tabebuia ochracea</i> (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.....	93
Tabela 13 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de <i>Tabebuia roseo-alba</i> (Ridl.) Sand. (Ipê branco) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.....	94
Tabela 14 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de <i>Delonix regia</i> (Flamboyant) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.....	95
Tabela 15 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. (Negumim) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.....	95
Tabela 16 – Características bioquímicas e determinação da motilidade das bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras da rizosfera, com 24 horas de crescimento a 30°C, semeadas em PCA.....	97
Tabela 17 – Utilização dos carboidratos com produção de ácido pelas bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras da rizosfera.....	98
Tabela 18 – Atividade enzimática das culturas isoladas e selecionadas das diferentes amostras da rizosfera, com 24 horas de crescimento a 30°C em PCA.....	99
Tabela 19 – Determinação do tempo de escoamento do caldo fermentado, inoculado com as culturas isoladas e selecionadas de amostras da rizosfera, incubadas a 30°C e 200 rpm, durante 24, 48, 72 e 96 horas.....	101



QUEIROZ, G. M. *Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polissacarídeos obtidas de amostras da rizosfera de plantas*. São José do Rio Preto, 2001. 116p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Muitas bactérias são conhecidas por produzir exopolissacarídeos que podem ser excretados no meio de crescimento ou permanecerem aderidos à parede celular bacteriana convertendo-se, assim, em um exopolissacarídeo capsular. Os polissacarídeos de origem microbiana apresentam várias vantagens em relação aos hidrocolóides derivados de algas e plantas. Dentre eles, os mais difundidos são as gomas xantana e gelana, cujo uso em alimentos foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Este trabalho teve como objetivos o isolamento e a identificação de microrganismos produtores de polissacarídeos, a otimização dos parâmetros de produção em função da fonte de carbono e o efeito do pH e da temperatura sobre a produção. Foram coletadas seis amostras da rizosfera de plantas da Reserva Ecológica do Noroeste Paulista. Destas seis amostras foram isoladas 122 bactérias que desenvolveram colônias brilhantes e gomosas, possíveis produtoras de polissacarídeos. Uma nova seleção baseada no rápido crescimento foi feita selecionando 38 bactérias que foram, então, submetidas aos testes bioquímicos para sua caracterização. Essas bactérias foram agrupadas nos seguintes gêneros: *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Terrabacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. A seguir, essas culturas foram submetidas à fermentação para a determinação da viscosidade e do crescimento celular, por meio das quais três culturas, denominadas 10D, 13D e 10F, pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, puderam ser selecionadas para a produção dos polissacarídeos. Estudos com essas três culturas foram realizados para a



determinação dos parâmetros ótimos de produção do polissacarídeo em função da fonte de carbono adicionada, glicose ou sacarose, nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% (p/v). A influência da variação da temperatura de incubação de 25, 30 e 35°C e, também, da variação do pH inicial (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0) do meio de cultivo na produção do polissacarídeo pelas culturas foram estudadas. Os resultados obtidos indicaram que tanto a glicose quanto a sacarose foram bons substratos para a produção de polissacarídeo e a concentração que proporciona um melhor rendimento é a de 1,0% do açúcar. A temperatura que mais estimulou a produção do polissacarídeo foi 25°C para as culturas 13D e 10F e 30°C para a cultura 10D. O meio de fermentação com pH inicial 7,0 favoreceu a melhor produção dos polissacarídeos pelas culturas.

Palavras-chave: Isolamento, caracterização, bactérias, rizosfera, polissacarídeo.



1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A moderna indústria alimentícia cada vez mais utiliza-se do processamento de alimentos, que é a transformação da matéria-prima “in natura” até a obtenção de um produto acabado, visando, com isso, não só melhorar a qualidade, bem como dispor de variedades e agregar valor ao produto, ao invés de simplesmente preservar a matéria-prima obtida no campo.

Diferentes técnicas de manipulação têm sido desenvolvidas, muitas vezes lançando mão da curiosidade e da criatividade para desenvolver produtos novos, apenas com a adição de ingredientes, também novos, e às vezes, recém descobertos manipulados para tal finalidade. Como exemplo, têm-se os polissacarídeos solúveis em água e que se destacam por terem a capacidade de formar com a mesma soluções viscosas, provocando um espessamento e, algumas vezes, um efeito gelificante, sendo denominados hidrocolóides ou gomas, como são comumente conhecidos. A característica principal desses hidrocolóides, sob o ponto de vista tecnológico, é a capacidade de modificar ou determinar a estrutura de um alimento.

Os hidrocolóides têm muitas propriedades funcionais. Uma básica, e que é comum a todas as gomas, é a capacidade espessante. A segunda maior propriedade, e que poucos possuem, é a capacidade de formar gel. As outras propriedades funcionais secundárias, no entanto, muito importantes para aplicações específicas em alimentos, são as propriedades emulsificante,



estabilizante, prevenção da sinérese e inibição da cristalização, sendo, muitas vezes, as principais responsáveis pela textura dos alimentos processados.

Os polissacarídeos podem ser classificados como de origem vegetal, marinha e microbiana. As gomas de origem vegetal podem ser obtidas de exsudatos de árvores, cereais, sementes, frutas cítricas e derivados de celulose. As de origem marinha são obtidas de algas e as de origem microbiana são obtidas por fermentação.

Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por uma grande variedade de microrganismos são gomas solúveis em água, as quais apresentam propriedades físicas novas e únicas. Devido à sua diversidade de estrutura e propriedades físicas, os EPS microbianos encontram uma grande variedade de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, química, entre outras.

A utilização de polissacarídeos microbianos (biopolímeros) tende a incrementar-se de maneira considerável na indústria alimentícia. Por isso, eles têm sido os mais estudados nos últimos anos, devido também a algumas vantagens de sua obtenção em relação às outras gomas, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Além disso, as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura.



Dentre os polissacarídeos microbianos mais utilizados em alimentos, a goma xantana é a que tem maior importância, representando 90% do volume total de vendas. O maior fornecedor desse polímero é a Companhia Kelco, localizada nos EUA. No entanto, a concorrência torna-se cada dia mais severa com o aparecimento no mercado de novas indústrias produtoras de novas gomas com novas propriedades.

A grande aceitação da goma xantana pelas indústrias alimentícias ocorreu por ter sido a primeira goma de origem microbiana aprovada para uso em alimentos pela Food and Drug Administration (FDA) em 1969. Somente em 1992, um segundo biopolímero, a gelana, também produzida pela Companhia Kelco, obteve aprovação pelo mesmo órgão, tornando-se uma alternativa para o mercado.

Atualmente, várias outras gomas produzidas por diferentes microrganismos estão sendo utilizadas em alimentos, mesmo sem a aprovação da FDA, sendo elas: curdlana, welana, pululana, elsinana, levana, etc.

Existe, no entanto, um enorme potencial para a descoberta e desenvolvimento de novos biopolímeros produzidos a partir de microrganismos presentes na natureza. O Brasil, em particular, devido à sua enorme biodiversidade, pode ser uma fonte importante de bactérias e fungos produtores de polissacarídeos ainda desconhecidos, que poderiam ser isolados a partir de amostras do solo e de plantas nativas.



Um aspecto de extrema importância em relação aos hidrocolóides de origem microbiana é a necessidade de um rígido controle das condições de fermentação, uma vez que diferentes parâmetros de produção levam à obtenção de produtos de características distintas. Assim, é fundamental que qualquer estudo dirigido ao desenvolvimento de tecnologias para produção de biopolímeros seja acompanhado pela caracterização do material produzido.

O desenvolvimento e a otimização da biotecnologia nacional para obtenção de hidrocolóides são de grande importância econômica para o Brasil, uma vez que os insumos básicos para sua produção (açúcar) e purificação (álcool) têm baixo custo relativo e grande disponibilidade no mercado, tornando o produto competitivo e possibilitando a substituição de importações. O uso de microrganismos modificados geneticamente sob condições de fermentação controladas, também pode resultar na produção de novos polissacarídeos com propriedades superiores às já conhecidas.

✧ A Reserva Ecológica do Noroeste Paulista, localizada na cidade de São José do Rio Preto - SP, tem como responsável por sua administração científica o Câmpus da UNESP, localizado na mesma cidade. Essa reserva é constituída por duas áreas de matas remanescentes (mata nativa) totalizando 170 ha. Possui matas, riachos, várias nascentes de águas límpidas e uma represa. Essa grande diversidade de ambientes abriga uma flora variada com uma importante fauna associada, constituindo-se, assim, num dos únicos refúgios para os animais típicos da região.



Atualmente, nessa reserva vêm sendo desenvolvidos vários e importantes projetos de pesquisa, visando a obtenção de dados que possam, no futuro, contribuir para o melhor conhecimento de diversos aspectos dos ecossistemas envolvidos.

* Neste estudo, fez-se o isolamento, a seleção e a caracterização de bactérias produtoras de polissacarídeos a partir de amostras da rizosfera de plantas da Reserva Ecológica do Noroeste Paulista, obtendo linhagens que apresentaram um bom potencial para uso industrial.

O projeto é extensão de um trabalho já em andamento com isolamento, seleção e caracterização de bactérias obtidas de amostras do solo e vem somar-se a tantos outros, também em desenvolvimento, buscando explorar de forma racional os recursos naturais existentes no local e possibilitando a descoberta de novas linhagens bacterianas produtoras de polissacarídeos com potencial para utilização industrial.



2. OBJETIVOS

- Isolar, selecionar e caracterizar microrganismos produtores de biopolímeros com potencial para uso industrial, a partir de amostras da rizosfera de plantas.
- Determinar o efeito da adição de diferentes concentrações de glicose e sacarose na produção de polissacarídeos microbianos, a partir de um meio de cultivo quimicamente definido.
- Determinar o efeito da variação de diferentes parâmetros da fermentação (temperatura e pH) na produção dos polissacarídeos.



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. HIDROCOLÓIDES

Dentre as inúmeras macromoléculas, isto é, polímeros de cadeias longas e peso molecular elevado, de origem natural ou microbiana, algumas possuem a propriedade de dissolver-se ou dispersar-se facilmente na água para dar lugar a um aumento considerável da viscosidade e, às vezes, um efeito gelificante. Elas são consideradas ferramentas indispensáveis na formulação de produtos alimentícios. Esses espessantes e gelificantes alimentares são denominados gomas hidrossolúveis ou hidrocolóides (LINDEN & LORIENT, 1996; DE VUYST & DEGEEST, 1999).

A denominação “goma industrial” é dada aos polissacarídeos hidrossolúveis, sejam naturais, modificados ou sintetizados por microrganismos. As gomas industriais possuem uma característica importante que é a capacidade de modificar o comportamento reológico da água e de sistemas aquosos. Essa e outras propriedades, além de terem uma boa disponibilidade, não serem tóxicas e, usualmente, baixo custo de produção, fazem com que atualmente os polissacarídeos hidrossolúveis sejam consumidos em quantidades elevadas pela indústria alimentícia (LOPES *et al.*, 1991; WHISTLER, 1993).



Os hidrocolóides possuem uma grande variedade de estruturas químicas, peso molecular, composição, solubilidade e outras características que lhes conferem várias propriedades funcionais (BeMILLER, 1988). Essas propriedades funcionais em alimentos são dependentes da estrutura do biopolímero (DE VUYST & DEGEEST, 1999). Segundo Pasquel (1999), na indústria de processamento de alimentos, bem como em outras aplicações industriais das gomas, aproveitam-se as propriedades físicas, especialmente a viscosidade e a estrutura coloidal das mesmas.

As gomas são geralmente classificadas como polissacarídeos e agrupadas de acordo com a sua origem em vegetal, marinha, microbiana e derivados da celulose, que são em sua maior parte de natureza glicídica. Existem também as de natureza protéica que são de origem animal, sendo a gelatina a principal representante (LINDEN & LORIENT, 1996).

Na Tabela 1, observam-se os hidrocolóides classificados em diferentes grupos, segundo sua fonte e o método utilizado para sua obtenção (LOPES *et al.*, 1991).

A vasta maioria de polissacarídeos usados pela indústria alimentícia para manipular a textura dos alimentos são extratos de plantas superiores e algas marinhas (MORRIS, 1993).



Tabela 1 – Classificação das gomas industriais.

TIPO	ORIGEM	GOMA
Natural (extração e/ou purificação)	Exsudatos vegetais (terrestre)	Arábica
		Caraia
	Sementes	Goma de alcatira
		Guar
		Goma de alfarroba
		Goma de tamarindo
	Polpa de frutos	Pectina
	Algas	Ágar
		Carragena
		Alginato
Modificada	Celulose	Carboximetilcelulose
		Hidroxietilcelulose
	Amido	Xantano de amilose
		Dextrina
		Hidroxietilamido
	Subprodutos animais	Derivados da quitina (hidrossolúveis)
Biossintética	Produtos microbianos	Dextrana
		Xantana
		Gelana

Fonte: LOPES *et al.*, 1991.

O uso de hidrocolóides na indústria de alimentos baseia-se, principalmente, no aproveitamento de suas propriedades funcionais, relacionadas à capacidade de espessar, manter partículas em suspensão, controlar a cristalização, estabilizar emulsões, reter água, lubrificar e formar filme (GLICKSMAN, 1982; MARGARITIS & PACE, 1985); são os responsáveis pela textura (corpo, viscosidade e consistência) dos alimentos processados (IGOE, 1982; SOUZA, 1984). Alguns hidrocolóides provocam uma imobilização extrema da água, fazendo com que o sistema adote características de um sólido capaz de reter sua forma, convertendo-se em um gel (SZCZCESNIAK, 1986).

As propriedades funcionais de uma goma freqüentemente podem ser modificadas por interações com outras gomas, que podem modificar a sua reologia, solubilidade, reatividade e características gelificantes, aumentando a sua utilidade em inúmeras aplicações (IGOE, 1982). Também, podem ser modificadas quimicamente, como no caso da pectina e celulose, que visam a obtenção de hidrocolóides com propriedades gelificantes (PASQUEL, 1999).

✱De acordo com Kovacs & Kang (1977), os maiores problemas com relação à utilização de hidrocolóides extraídos de fontes naturais são a escassez, sazonalidade e possibilidade de esgotamento das mesmas. Com a expansão das indústrias alimentícias e o aumento da demanda comercial por esses ingredientes, as fontes naturais são cada vez mais exploradas, verificando-se a necessidade de buscar fontes alternativas de produção, de forma a suprir o mercado.

Além disso, novas técnicas de processamento de alimentos criam a necessidade de colóides com propriedades físicas não associadas com as dos polissacarídeos derivados de plantas (KOVACS & KANG, 1977). Portanto, os exopolissacarídeos microbianos mostram-se como uma fonte alternativa e que podem apresentar propriedades funcionais excelentes (MORRIS, 1995; DE VUYST & DEGEEST, 1999).



3.2. POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Vandamme *et al.* (1996) relatam que vários polissacarídeos microbianos usados pelas indústrias estão sendo produzidos via processo de fermentação e que, continuamente, novos exopolissacarídeos (EPS) ou biopolímeros de origem microbiana estão sendo descobertos e caracterizados, revelando propriedades físicas e químicas extraordinárias.

A produção biotecnológica via fermentação controlada proporciona uma fonte de novos polímeros microbianos, freqüentemente com estruturas, propriedades funcionais e aplicações únicas, e com uma perspectiva de custo e oferta estável, junto com função e estrutura reproduzíveis (MORRIS, 1993; VANDAMME *et al.*, 1996).

A maioria dos biopolímeros é produzida seguindo o processo de fermentação descontínua ("batch") utilizando melaço, amido hidrolisado ou diferentes açúcares como fonte de carbono (VANDAMME *et al.*, 1996). Kawai *et al.* (1992) ressaltam que a produção do polissacarídeo pela bactéria pode ser afetada por algumas condições de cultivo como: a composição do meio de cultura, temperatura de incubação, pH inicial e eficiência da aeração.

Vários microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras e microalgas, em geral, isolados de solo e plantas, produzem tais polissacarídeos ou análogos intracelularmente, extracelularmente ou como parte da camada da parede celular (polissacarídeo estrutural) (VANDAMME *et al.*, 1996). Alguns exemplos

de microrganismos produtores e seus respectivos biopolímeros são mostrados na Tabela 2.

†Tabela 2 – Biopolímeros produzidos por microrganismos.

	Microrganismo produtor	Polissacarídeo/Biopolímero
Bactérias	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	Alginato
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsana
	<i>Pseudomonas elodea</i> PS-60	Gelana
	<i>Xanthomonas campestris</i>	Xantana
	<i>Acetobacter xylinum</i>	Celulose
	<i>Rhizobium melioli</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i>	Curdiana
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrana
	<i>Bacillus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp.	Ciclodextrinas
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pululana
	<i>Sclerotium rolsii</i> , <i>S. glaucum</i>	Escleroglucana
Fungos	<i>Absidia coerulea</i> , <i>Mucor rouxii</i>	Quitosana

Fonte: VANDAMME *et al.*, 1996.

A função fisiológica dos polissacarídeos extracelulares nos microrganismos produtores é relacionada ao fator de virulência, à proteção da célula microbiana contra dessecação, ataque de vírus e fagocitose, antibióticos e compostos tóxicos (íons metálicos tóxicos, dióxido de enxofre, etanol), ação predadora de protozoários, adesão à superfícies sólidas, formação de biofilme, resistência à imunidade hospedeiro-específica e não-específica, e também, na



identificação celular (via ligação com a lecitina). Os polímeros produzidos intracelularmente servem para controlar a pressão osmótica. E eles são de fato biodegradáveis, não tóxicos e produzidos via fermentação, a partir de recursos renováveis (ROBERTS, 1996; VANDAMME *et al.*, 1996; DE VUYST & DEGEEST, 1999).

Alguns EPS formam cápsulas ao redor da célula, dependendo do sistema microbiano, e, portanto, tornam-se parte da parede celular, enquanto outros formam uma substância viscosa (muco), a qual é acumulada fora da parede e tem a capacidade de se difundir no meio durante a fermentação. Estes microrganismos, em particular, que produzem grande quantidade de muco polissacarídico, têm grande potencial para a comercialização, pelo fato de que estes EPS podem ser facilmente recuperados do caldo de fermentação (MARGARITIS & PACE, 1985).

Em bactérias patogênicas, tais como *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae*, o exopolissacarídeo capsular e os lipopolissacarídeos antígeno-O estão envolvidos na resposta imune (DE VUYST & DEGEEST, 1999). Eles também desenvolvem uma importante função como mediadores da interação planta-microrganismo. Muitas bactérias fitopatógenas produzem polissacarídeos capsulares, cuja expressão é essencial para a virulência. No entanto, a função dos polissacarídeos capsulares no processo de infecção da planta não está totalmente elucidado (ROBERTS, 1996).

A síntese dos exopolissacarídeos é claramente dividida em dois mecanismos distintos: o processo extracelular envolvido na formação da dextrana



e o processo intracelular, pelo qual a maioria é produzida. Não somente os mecanismos sintéticos são totalmente diferentes, mas os precursores requeridos também diferem (SUTHERLAND, 1993). Sendo assim, pode-se utilizar vários substratos alternativos de baixo custo para a produção de polissacarídeos microbianos, como nos estudos de Dlamini & Peiris (1997) e Nitschke *et al.* (1997) em que utilizaram o soro de leite, um subproduto da fabricação do queijo, para a produção de gelana e xantana, respectivamente.

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

Um aspecto relevante apontado por Slodki (1987), ressalta a necessidade de que a pesquisa e o desenvolvimento de novos microrganismos produtores de polissacarídeos sejam feitos de modo integrado com os estudos de produção e caracterização do material obtido, envolvendo grupos multidisciplinares, uma vez que, apesar da vasta quantidade de publicações sobre o assunto, ainda existe grande falta de informações, principalmente quanto ao processo de fermentação e às características do produto.



3.3. BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS E APLICAÇÕES

Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana é a mais estudada e utilizada, uma vez que foi o primeiro polissacarídeo produzido por fermentação a ser aprovado para uso em alimentos pela FDA em 1969 (PSZCZOLA, 1993).

A goma xantana comercial é um heteropolissacarídeo de alto peso molecular produzido em fermentação aeróbia por uma cultura pura da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizando xarope de glicose como fonte de carbono, derivados de amônia como fonte de nitrogênio, fosfato ácido de potássio e fatores de crescimento sob condições aeróbias a 28°C e agitação constante. Após a fermentação e separação das células, a goma é recuperada por precipitação com etanol e o precipitado obtido é lavado, prensado, secado e depois moído (COTTRELL *et al.*, 1980).

A aplicação industrial da goma xantana em produtos alimentícios é muito vasta, devido às propriedades e características mencionadas a seguir: produz alta viscosidade, mesmo quando usada em baixas concentrações; é estável ao calor, resistindo a altas temperaturas durante o processamento; tem excelente solubilidade e estabilidade em meio ácido; é altamente estável na presença de sais, principalmente cloreto de sódio; é eficiente como estabilizador de emulsões e de suspensões; é de natureza altamente pseudoplástica, ou seja, a viscosidade do sistema diminui sob cisalhamento e, cessando a ação da força, o



sistema volta à sua viscosidade inicial; atua como agente formador de gel quando em combinação com a goma da algarobeira, nos embutidos de carnes retém a umidade e evita a exsudação da gordura, também chamado de "encapsulamento branco" (SOUZA, 1984).

Segundo Morris (1995), existem relatos de aplicações da goma xantana como estabilizante de suplementos alimentares para gado e de substitutos do leite para bezerros; em herbicidas, fungicidas, pesticidas e fertilizantes para a agricultura e, devido à sua propriedade pseudoplástica, na preparação de pasta dental. A goma xantana também é largamente utilizada na indústria de cerâmicas, tintas e vernizes, extintores, explosivos, cosméticos, fotografias, detergentes, produtos farmacêuticos, tintas para impressão e, também, em operações de recuperação secundária e terciária de poços de petróleo (SANDVICK & MAERKER, 1977; MORRIS, 1995; VANDAMME *et al.*, 1996).

Outro biopolímero importante, e relativamente novo, é a goma gelana – polissacarídeo extracelular secretado pelo microrganismo *Pseudomonas elodea* (KANG *et al.*, 1982) – comercializada pela Companhia Kelco e, segundo Pszczola (1993), vem sendo apontado como um dos mais eficientes e multifuncionais hidrocolóides desenvolvidos até o momento para o uso em alimentos, cosméticos e outras aplicações industriais. A goma gelana foi o segundo polissacarídeo de origem microbiana a ser permitido para uso em alimentos pela FDA, em 1992 (PSZCZOLA, 1993).

A gelana foi descoberta em 1977, quando a bactéria produtora *Pseudomonas elodea* foi isolada de uma planta e identificada pela primeira vez



durante uma pesquisa sobre microrganismos sintetizadores de gomas isolados do meio ambiente. Ela tem sido usada como agente gelificante, texturizante, estabilizante e formador de filmes de revestimento, podendo substituir outros hidrocolóides ou ser utilizada em combinação com os mesmos (PSZCZOLA, 1993).

As principais aplicações da gelana incluem produtos de panificação e confeitaria, na forma de recheios ou coberturas, produtos lácteos, emulsões, sorvetes, geléias e sobremesas e, também, em rações para animais domésticos (PSZCZOLA, 1993). A ótima consistência e a grande transparência dos géis formados possibilitam a substituição do ágar em meios de cultura (KANG *et al.*, 1982).

A importância da dextrana na indústria de alimentos é menor. Ela é um biopolímero sintetizado pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* cultivada em presença de sacarose como fonte de carbono. A dextrana é, em geral, solúvel em água e utilizada como agente emulsificante e estabilizante, sendo seu maior uso em medicina humana como extensor do plasma sanguíneo e agente redutor do colesterol (LINDEN & LORIENT, 1996; VANDAMME *et al.*, 1996).

De modo semelhante à dextrana, as aplicações alimentares da curdlana são limitadas. Trata-se de um polissacarídeo neutro, insolúvel e que forma um gel resistente quando a suspensão aquosa é aquecida. É sintetizado por bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Alcaligenes* e *Rhizobium* e é utilizado como agente gelificante, filtro molecular e matriz para imobilização de enzimas (LINDEN & LORIENT, 1996; VANDAMME *et al.*, 1996).



De acordo com Vandamme *et al.* (1996), alguns homo e heteropolissacarídeos extracelulares bacterianos são fontes para obtenção de monossacarídeos raros e valiosos, como L-ramnose, L-fucose, D-manose, etc., os quais são difíceis de obter por outros métodos. Por exemplo, a síntese química ou a extração a partir de tecidos de plantas e animais é trabalhosa, cara, além de ter um suprimento limitado. Esses açúcares são aplicados na síntese de vitaminas, sabores e aromas artificiais, e outras substâncias em química fina em geral.

Dentre os polissacarídeos extracelulares obtidos de fungos, temos a pululana e a elsinana, que são homopolímeros utilizados como melhoradores de textura e como formadores de filme impermeável biodegradável. Além da sua aplicação em medicina, farmácia e cosméticos (VANDAMME *et al.*, 1996).

Vandamme *et al.* (1996) relatam que esses exemplos de biopolímeros microbianos representam a tendência do sucesso comercial dos mesmos, sendo apenas o começo, devido ao fato de que vários outros EPS microbianos e moléculas relacionadas aguardam por serem descobertos, além da caracterização e aplicação.

Um campo de pesquisa em rápida expansão concentra-se na produção e caracterização de EPS a partir de bactérias de grau alimentar, tais como bactérias ácido lácticas e ácido acéticas, que são capazes de produzir os EPS em quantidade suficientemente grande e são muito importantes para a indústria de alimentos. Isto pode ser uma grande vantagem em relação aos polímeros



produzidos por bactérias fitopatogênicas e que, geralmente, não são reconhecidas como seguras (DE VUYST & DEGEEST, 1999).

Muitos microrganismos de grau alimentar produzem EPS, em particular as bactérias ácido lácticas (LAB). Em muitos casos, os polissacarídeos liberados extracelularmente pelas LAB podem oferecer vantagens numa variedade de produtos alimentícios fermentados. A maioria das linhagens de LAB produtoras de EPS estudadas em maiores detalhes, foi isolada de produtos lácteos, folhas de chá fermentadas, carne, peixes, moluscos e vegetais fermentados (CERNING, 1990; DE VUYST & DEGEEST, 1999; SMITINONT *et al.*, 1999). Smitinont *et al.* (1999) acreditam que pode ser conveniente o uso de LAB produtoras de polissacarídeos em culturas “starter” utilizadas em produtos fermentados, ao invés da adição de polissacarídeos.

3.4. SELEÇÃO DE PROVÁVEIS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOPOLÍMEROS

Segundo Zilinskas (1993), os países em desenvolvimento apenas poderão beneficiar-se plenamente da biotecnologia em termos de desenvolvimento econômico e soluções técnicas, caso sejam capazes de aplicar os resultados de suas próprias pesquisas biotecnológicas. Assim, torna-se fundamental o aproveitamento das vantagens apresentadas por esses países, principalmente em relação as suas reservas biológicas.



Olembo (1995) salienta muito bem que a relação entre biodiversidade e biotecnologia é de dependência mútua. Biodiversidade é a base genética da qual a biotecnologia se vale para desenvolver processos e produtos de interesse econômico e/ou social. Enquanto que a biotecnologia auxilia na manutenção da própria biodiversidade, podendo também aumentá-la ainda mais por meio de poderosos processos, como os da engenharia genética.

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

Balandrin *et al.* (1985) e Bull *et al.* (1992) apresentam dados sobre o número estimado de espécies de plantas, animais, fungos e bactérias existentes e ainda não identificados. De acordo com esses autores, existem 40.000 espécies de bactérias, das quais apenas 4.760 foram identificadas, o que representa apenas 12% do total. Em relação aos fungos, o potencial é ainda maior, das 1.500.000 espécies estimadas, apenas 5% são conhecidas. Melo & Azevedo (1998) afirmam que assim como existe uma potencialidade grande para a exploração de plantas e animais, maior ainda é a potencialidade do uso de microrganismos. Isso demonstra o imenso potencial genético disponível para aplicações biotecnológicas.



Segundo Schneider (1993), o Brasil é detentor das mais expressivas parcelas da diversidade biológica ainda remanescente no planeta. Lovejoy (1992) afirma que a maioria das espécies se encontra nos países tropicais e que o Brasil sozinho deve abrigar 30% de todas as espécies da Terra, no entanto, a história dos recursos naturais tropicais mostra que a riqueza proporcionada por eles muito freqüentemente é transferida para os países desenvolvidos.

Atualmente, com as exigências destes países em relação à lei de proteção à propriedade intelectual, o panorama pode tornar-se ainda mais desfavorável, e uma proteção de patentes cada vez mais rígida poderá restringir, ainda mais, o já limitado acesso do país aos segredos da biotecnologia, beneficiando os exportadores de tecnologia e de produtos derivados, mais do que os detentores da riqueza genética do Terceiro Mundo (SCHNEIDER, 1993).

As estratégias para a utilização eficiente da diversidade genética disponível aos países em desenvolvimento incluem a seleção de espécies a partir de amostras de solo e plantas, empregando ferramentas biotecnológicas como técnicas de identificação de microrganismos e métodos controlados para seu cultivo (BURK *et al.*, 1993) e a conservação desses recursos genéticos garantirá às gerações futuras uma fonte para os mais diversos fins (KNORR, 1995).

Sabe-se, atualmente, que os microrganismos, como bactérias e fungos, além de responsáveis por importantes transformações metabólicas, controle biológico de doenças e pragas, fixação biológica do nitrogênio atmosférico, degradação de resíduos vegetais e outros produtos, inclusive tóxicos, são também um manancial de fármacos, corantes, enzimas e ácidos orgânicos,

bem como polissacarídeos, entre muitos outros produtos úteis e ainda inexplorados (MELO & AZEVEDO, 1998).

3.5. O AMBIENTE DO SOLO E DA RIZOSFERA

Segundo Pelczar Jr. *et al.* (1996), o solo é a região da crosta terrestre onde a geologia e a biologia se encontram. Ele é constituído por um grande número de seres vivos microscópicos representados por bactérias, fungos, algas, protozoários e vírus. Formas macroscópicas de vida também existem em abundância, como minhocas, nematódeos, acarídeos e insetos e o sistema radicular das plantas.

Os microrganismos são essenciais para vários processos bioquímicos e transformações que ocorrem no solo, convertendo plantas mortas e matéria animal em substâncias inorgânicas simples que nutrem outras plantas, que por sua vez, servem de alimento para os animais. Como um elo de ligação entre animais e plantas, eles desempenham um papel importante na manutenção da vida na Terra (PELCZAR JR. *et al.*, 1996).

Cardoso (1992) afirma que o solo pode ser encarado como um *habitat* microbiano por excelência, local de vida de inúmeras e variadas populações de todos os tipos de microrganismos e, mesmo, como um reservatório final da grande diversidade genética de quase todos eles.



Dentro de extensos programas de pesquisa e desenvolvimento de processos de triagem (“screening”) para a rápida seleção e obtenção de microrganismos úteis (produtores de antibióticos ou de enzimas para certos tipos de fermentadores ou degradadores de substâncias específicas, organismos antagônicos a patógenos ou pragas, etc.), recorre-se ao isolamento em massa de populações do solo, plantas, animais, resíduos da agricultura e industriais, seguido de testes para determinar as aptidões específicas de cada isolado para a característica desejada (CARDOSO, 1992; MELO & AZEVEDO, 1998).

De acordo com Pelczar Jr. *et al.* (1996), a contagem de microrganismos por meio da cultura em placas revela que as bactérias se apresentam como a maior parte da população microbiana do solo, tanto em quantidade quanto em variedade. É na rizosfera, região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato, onde encontra-se a maioria delas, sendo o número de microrganismos na raiz e à sua volta muito maior que no solo livre.

Os tipos de microrganismos na rizosfera, também, diferem do solo livre. O crescimento microbiano é estimulado por substâncias exsudadas das raízes e os produtos do seu metabolismo estimulam o crescimento das plantas. Dessa forma, uma troca de nutrientes ocorre entre o sistema radicular da planta e os microrganismos (PELCZAR JR. *et al.*, 1996).

Segundo Cardoso & Freitas (1992), o termo “rizosfera” foi usado pela primeira vez em 1904, por Hiltner, um pesquisador alemão, que definiu o mesmo como a região do solo sob influência das raízes. O solo rizosférico tem características bem diferentes daquelas do solo distante das raízes.



Na rizosfera há maior concentração de nutrientes orgânicos provindos das raízes que favorecem muito o crescimento de microrganismos, todavia em solos argilosos essa influência limita-se a cerca de 2 mm em torno das raízes, podendo ser mais abrangente em solos arenosos ou desérticos (CARDOSO & FREITAS, 1992).

Devido ao contínuo suprimento de compostos orgânicos pela exsudação de raízes e a ocorrência de células mortas e filamentos de raízes sobre a superfície da raiz, as bactérias se encontram em um ambiente adequado para o seu desenvolvimento. Sendo assim, elas podem influenciar o crescimento e a nutrição, e as condições de saúde das plantas (VANCURA, 1980). A rizosfera é um sistema complexo e ainda há uma grande parte a ser aprendida sobre as interações plantas-microrganismos (PELCZAR JR. *et al.*, 1996).

Lynch (1986) afirma que as bactérias ocorrem frequentemente como colônias distintas, com pelo menos 10^2 células por colônia na raiz. A análise do tamanho populacional é dependente de todas as bactérias que aderem à superfície da raiz e, na prática, a capacidade de adesão varia muito entre as espécies.

A proximidade maior das bactérias aos elementos condutores (xilema e floema) da planta significa que elas estão espacialmente bem localizadas para interromperem o suprimento da planta e para introduzirem fitotoxinas ou outros reguladores do crescimento vegetal (LYNCH, 1986).



Alguns gêneros importantes de bactérias presentes no solo, que se coram (G+) e não se coram (G-) pelo corante de Gram, são *Arthrobacter* (bastonetes/cocos, G+), *Azotobacter* (bastonetes ou células leveduriformes, G- , que formam cistos), *Bacillus* (bastonetes G+, esporulados), *Clostridium* (bastonetes G+, anaeróbios obrigatórios), *Micrococcus* (cocos flexíveis, G+), *Nitrosomonas* (bastonetes G-), *Pseudomonas* (bastonetes G-, os quais freqüentemente produzem pigmentos fluorescentes) e *Rhizobium* (bastonetes G- , que formam nódulos em leguminosas) (LYNCH, 1986). Os gêneros que mais se destacam na rizosfera são *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Agrobacterium* (CARDOSO & FREITAS, 1992).

Segundo Freire (1995), os estudos de microbiologia do solo no país, de acordo com referências, iniciaram-se no Instituto Agrônomo de Campinas com a criação, em 1909, do Laboratório Agrícola. As aplicações da mesma formaram uma área muito abrangente, sendo uma delas, a busca de microrganismos com genes específicos para a produção de polissacarídeos, e tendem a ampliar-se, especialmente na área ambiental.

Com relação à produção de alimentos, é importante salientar que, sob o ponto de vista da indústria, o maior interesse em novos produtos resultantes de aplicações biotecnológicas encontra-se na área de ingredientes e aditivos, e não em novos alimentos (KNORR, 1995). Logo, a produção de polissacarídeos a partir de microrganismos para serem usados como aditivos em produtos processados vem exatamente ao encontro dessa expectativa.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

4.1.1. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

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

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

colônias gomosas e brilhantes, eram selecionadas e novamente semeadas em placas de Petri contendo PCA para a purificação da cultura.

4.1.2. OBTENÇÃO DAS CULTURAS PURAS

O método utilizado para obtenção de culturas puras foi o de esgotamento em estrias em placa de Petri contendo PCA, como descrito por Muro & Luchi (1989). Para a avaliação da pureza da cultura, foram feitos esfregaços em lâminas de microscópio e, a seguir, eles foram corados pelo método de Gram. Desta forma, puderam ser observadas as características microscópicas das bactérias isoladas. A descrição da técnica de coloração de Gram e de esporos está detalhada no Anexo IA.

4.1.3. MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

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



mineral em um outro tubo de ensaio contendo PCA inclinado (culturas de estoque) e mantidas sob refrigeração.

4.1.4. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

As bactérias foram identificadas por suas características morfológicas de acordo com o *BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology* (1994). A identificação foi feita, também, conforme as respostas individuais obtidas para os testes morfológicos e bioquímicos (COWAN *et al.*, 1974) e com base na chave de Skerman, que propõe uma série de perguntas que podem ser respondidas de modo afirmativo ou negativo, após a determinação das características do microrganismo. Seguindo esta sequência de perguntas, pode-se chegar à identidade genérica da bactéria. A descrição dos testes bioquímicos utilizados encontra-se detalhada no Anexo IB.

4.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO PELOS MICRORGANISMOS

4.2.1. MEIO BASE

O meio base para a produção dos biopolímeros é um meio de cultivo quimicamente definido, e consiste de uma fonte de nitrogênio e sais



minerais, como proposto por Souw & Demain (1979), com algumas modificações.

O meio é composto por (g/L):

KH_2PO_4	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
Ácido Cítrico	2,0
H_3BO_3	0,006
ZnO	0,006
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0024
CaCO_3	0,02

O meio foi preparado, ajustado o pH para 7,0 com NaOH 10N, distribuído em frascos Erlenmeyer de 250 mL e, em seguida, esterilizado a 121°C por 15 minutos.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE DO CALDO DE FERMENTAÇÃO

As culturas identificadas foram submetidas, também, à determinação da viscosidade do caldo de fermentação, por meio da qual pode-se medir a resistência dos fluidos ao escoamento. Para isso, elas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio base com 2,0% (p/v) de glicose como fonte de carbono e incubadas em uma incubadora refrigerada



orbital rotatória (“shaker”) modelo MA 830 (Marconi), a 30°C e 200 rpm por 24, 48, 72 e 96 horas. As medidas foram realizadas nestes tempos de incubação. Com o auxílio de um cronômetro, foi marcado o tempo em que 4 mL do caldo de fermentação demoraram para fluir através de um tubo capilar de 0,6 cm de diâmetro e 14 cm de comprimento, à temperatura de 25°C.

O viscosímetro capilar mede o tempo necessário para que um dado volume de líquido escoar através do tubo capilar, onde a vazão em volume de um líquido através de um tubo capilar de raio r e comprimento L , em virtude de uma pressão P , é dada pela lei de Poiseuille (VAN HOLDE, 1975):

$$\frac{V}{t} = \frac{\pi P r^4}{8 \mu L}, \quad (1)$$

onde: V = volume (cm³),

P = pressão (Pa),

r = raio do tubo (cm),

t = tempo de escoamento (s),

μ = viscosidade (Pa.s),

L = comprimento do tubo (cm).



4.2.3. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

Após a caracterização das culturas produtoras de colônias gomosas e brilhantes, foi determinada sua curva de crescimento celular utilizando-se de um método espectrofotométrico (Cintra 5 UV-Visível Duplo Feixe, GBC Scientific Equipment Pty. Ltd.). Para isso, elas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio base acrescido de 2,0% (p/v) de glicose como fonte de carbono. A seguir, esses frascos foram incubados em uma incubadora refrigerada orbital rotatória (“shaker”), à temperatura de 30°C e 200 rpm, durante 24-48 horas, procedendo-se, então, às leituras da densidade óptica a 520 nm.

4.3. PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO

4.3.1. MICRORGANISMOS

Para a produção dos biopolímeros, foram utilizadas as culturas isoladas, selecionadas e caracterizadas nas etapas anteriores. Esses microrganismos foram inoculados nos meios de produção com diferentes fontes de carbono e condições de fermentação e incubados em “shaker” rotatório.



4.3.2. MEIOS DE PRODUÇÃO

Os meios de produção foram obtidos pela adição de soluções esterilizadas das fontes de carbono ao meio base previamente esterilizado, de modo a fornecer as concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% (p/v) de cada fonte de carbono. Foram testadas glicose e sacarose, comumente indicadas na literatura como sendo as mais apropriadas.

4.3.3. PREPARO DO INÓCULO

A cultura foi semeada por esgotamento em tubos de ensaio contendo PCA inclinado, que foram incubados por 24 horas a 30°C. Após a incubação, foi feita a suspensão da cultura pela adição de 10 mL de água destilada estéril e o auxílio da alça de platina. Essa suspensão de células foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 40 mL do meio base com 2,0% (p/v) de glicose e, em seguida, foi incubada em “shaker” rotatório, à temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm durante 48 horas. O caldo resultante desta fermentação foi centrifugado (Centrifugeur GR20.22, Jouan S.A.) a 12.000 rpm



por 30 minutos à temperatura de 15°C para a separação das células que foram utilizadas como inóculo para a produção do biopolímero, enquanto o sobrenadante foi descartado.

4.3.4. PRODUÇÃO

As células obtidas na etapa anterior foram suspensas em água destilada estéril e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL das diferentes formulações dos meios de produção, de modo a fornecer uma densidade óptica de 0,3 a 650 nm, medida em espectrofotômetro. A seguir, estes frascos Erlenmeyer foram incubados em um “shaker” rotatório a 30°C, durante 72 horas, com uma agitação de 200 rpm. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

4.3.5. SEPARAÇÃO

O caldo fermentado resultante foi submetido à centrifugação (12.000 rpm / 30 min., a 15°C) para a remoção das células e o sobrenadante límpido foi depositado em um Béquer de 250 mL, o qual foi usado para a precipitação do biopolímero. O biopolímero foi separado desse caldo por precipitação com três volumes de etanol. O sobrenadante resultante dessa



precipitação foi descartado e o polissacarídeo foi ressuspendido com água destilada estéril e, novamente, precipitado com três volumes de etanol. A seguir, este sobrenadante foi evaporado em estufa à vácuo (modelo MA 030, Marconi), à temperatura de 45°C, e o precipitado obtido foi secado até atingir peso constante. Finalmente, foi calculado o rendimento (gramas do polissacarídeo por gramas da fonte de carbono consumida).

4.3.6. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

A determinação do crescimento celular foi feita através do peso seco das células obtidas por meio da centrifugação (12.000 rpm / 30 min., a 15°C) na etapa anterior. As células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e, em seguida, transferidas para uma placa de Petri, procedendo-se, também, à secagem em estufa à vácuo, a 45°C, até peso constante. Essa determinação do crescimento celular por peso seco foi correlacionada com a curva de crescimento celular pela leitura da densidade óptica a 520 nm medida em um espectrofotômetro. Foram realizadas leituras a cada 2 horas de incubação durante 24-48 horas.



4.3.7. DETERMINAÇÃO DO AÇÚCAR RESIDUAL NO CALDO FERMENTADO

Após a centrifugação do caldo fermentado e obtenção do sobrenadante, retirou-se uma alíquota de 1 mL desse para a determinação quantitativa do açúcar residual utilizando-se de um método químico. As amostras de sacarose tiveram que sofrer hidrólise para depois fazer a determinação do açúcar redutor residual. O método do Ácido 3,5-Dinitrossalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), é um método para a análise de açúcares redutores, cujo fundamento é espectrofotométrico. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro a 540 nm. O método está detalhado no Anexo II.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Muitos são os microrganismos que correm o risco de se extinguirem sem que a ciência sequer saiba da existência, do papel exercido na natureza e do potencial biotecnológico que pode ser desenvolvido com sua utilização.

Infelizmente quando se menciona a manutenção das espécies, raramente os microrganismos são lembrados, talvez por seu tamanho diminuto, esquece-se que a extinção deles está ocorrendo possivelmente de maneira mais acentuada do que plantas e animais superiores (MELO & AZEVEDO, 1998).

O isolamento e a identificação de diferentes microrganismos não é meramente uma matéria de curiosidade científica, pois conhecer qual microrganismo está presente é a primeira etapa da realização da análise microbiológica. As técnicas laboratoriais utilizadas não são só para caracterizar e classificar, mas também, para detectar novos microrganismos e estudar a diversidade microbiana. Elas variam desde uma microscopia, relativamente simples até a análise do material genético encontrado na célula por técnicas de eletroforese para isozimas, hibridizações DNA-DNA, técnicas de análise direta do DNA conhecidas por siglas como RFLP, PCR, RAPD, além do uso de



eletroforese em campo pulsado para separar e determinar tamanho e número de cromossomos microbianos (MELO & AZEVEDO, 1998). Diferentes informações são usadas para caracterizar os microrganismos, sendo elas: características morfológicas, nutricionais, metabólicas, antigênicas, patogênicas e genéticas.

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

Dentre as colorações utilizadas para o estudo das células bacterianas, destaca-se a de Gram, que é um dos procedimentos mais importantes e utilizados para caracterizar as bactérias. As bactérias foram divididas em dois grandes grupos em função de sua capacidade de reter (Gram positivas) ou perder (Gram negativas) o corante primário (cristal violeta) da coloração de Gram, após a descoloração com álcool (HAJDENWURCEL, 1998).

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



Neste trabalho, foram coletadas seis amostras da rizosfera de plantas para o isolamento dos microrganismos, sendo denominadas de amostras A, B, C, D, E e F, cujos nome científico e vulgar, família (LORENZI, 1992; LORENZI & SOUZA, 1995) e idade aproximada destas plantas estão listados na Tabela 3. Essas plantas fazem parte da flora da Reserva Ecológica localizada em São José do Rio Preto - SP.

Tabela 3 – Classificação taxonômica (família, nome científico e vulgar e idade aproximada) das plantas em que foram coletadas as amostras da rizosfera para o isolamento das bactérias e o número de linhagens isoladas de cada amostra.

Amostra	Família	Nome científico	Nome vulgar	Idade aproximada (anos)	Número de linhagens isoladas
A	Araceae	<i>Dieffenbachia amoena</i> Hort. ex Gent.	Comigo-ninguém-pode	2	41
B	Cecropiaceae	<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	Embaúba	7	8
C	Bignoneaceae	<i>Tabebuia ochracea</i> (Cham.) Stanfl.	Ipê amarelo	22	13
D	Bignoneaceae	<i>Tabebuia roseo-alba</i> (Ridl.) Sand.	Ipê branco	10	15
E	Fabaceae	<i>Delonix regia</i>	Flamboyant	25	19
F	Monimiaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Negumun	5	26

Utilizando-se a técnica de diluição decimal seriada em tubos de ensaio contendo água destilada estéril e a semeadura em superfície em placas de Petri contendo o meio PCA, foram isoladas 122 bactérias possíveis de serem produtoras de biopolímeros, sendo que aproximadamente 82% são bastonetes

Gram positivos, 13% bastonetes Gram negativos e o restante cocos. Nessa mesma Tabela 3, pode-se observar, também, a quantidade de linhagens isoladas da rizosfera de cada planta.

A partir de culturas jovens (com menos de 24 horas de crescimento), foram feitos esfregaços em lâminas e submetidos à coloração de Gram para a avaliação da cultura pura e das características morfotintoriais das bactérias, como mostram as Tabelas 10 a 15 do Anexo III.

As características de crescimento das colônias que puderam ser observadas são referentes à: forma (circular, irregular, ondulada, filamentosa), tamanho/aspecto (puntiforme com menos de 1mm de diâmetro, superior a 1mm de diâmetro), coloração (conforme a cor do pigmento), opacidade (transparente, translúcida, opaca), elevação (plana, convexa), superfície (lisa, rugosa, mucóide, brilhante, seca) e consistência (viscosa, granulosa) e, também, estão apresentadas nas Tabelas 10 a 15 (Anexo III).

Destas culturas isoladas, foram selecionadas 38 bactérias com rápido crescimento em meio sólido e formadoras de colônias brilhantes e viscosas para a realização dos testes bioquímicos descritos no Anexo I. Foram utilizadas culturas com até 24 horas de crescimento à temperatura de 30°C, semeadas em tubos de ensaio contendo PCA inclinado, para os testes bioquímicos, sendo eles: TSIA (Ágar Tríplice Açúcar Ferro), LIA (Ágar Lisina Ferro), citrato, nitrato, indol e o teste da motilidade, cujos resultados são mostrados na Tabela 16 do Anexo III.

Para a utilização de carboidratos com produção de ácido e gás foi utilizado um meio líquido a base de peptona, com um indicador de pH



(vermelho de fenol) e o carboidrato, em um tubo de ensaio contendo um tubo de Durhan invertido para a captação do gás. Os carboidratos utilizados foram: glicose, sacarose, maltose, lactose e manitol. Os resultados são observados na Tabela 17 (Anexo III), sendo que nenhuma das culturas isoladas produziu gás.

Para a avaliação do perfil enzimático das culturas selecionadas, foram realizadas as provas da catalase, oxidase, gelatinase, amilase, lecitinase e protease. A Tabela 18 localizada no Anexo III, mostra os resultados destes testes bioquímicos.

Os testes bioquímicos mencionados acima são de rotina para o início da caracterização de um microrganismo desconhecido, e posterior identificação por meio de testes mais específicos. No entanto, dentre os diversos testes, foram escolhidos aqueles em que, a partir dos resultados obtidos, as culturas selecionadas no experimento poderiam ser agrupadas em porcentagem de similaridade dentro de um determinado gênero de microrganismos catalogados no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (COWAN *et al.*, 1974).

Após a análise dos resultados, em conjunto com a localização em que foram coletadas as amostras, e segundo a literatura (ALEXANDER & WILEY, 1961; LYNCH, 1986), as culturas selecionadas podem pertencer aos gêneros seguintes:

- ♦ *Arthrobacter* – suas células têm a forma de bastonete e são Gram positivas. A maioria é móvel. Não produzem esporos e produzem pouco ou nenhum ácido e nenhum gás a partir de glicose e outros carboidratos. Aeróbio



com metabolismo oxidativo. Catalase positiva e a temperatura ótima de crescimento é em torno de 25 a 30°C. Largamente distribuído no meio ambiente, principalmente no solo.

♦ *Bacillus* – células em forma de bastonetes retos, Gram positivas. São móveis e produzem esporos. Aeróbio ou anaeróbio facultativo. Comumente catalase e oxidase positivas. Utilizam a glicose, maltose e sacarose com produção de ácido, sem produção de gás. Hidrolisam a gelatina e o amido. Utilizam o citrato e reduzem o nitrato. Não hidrolisam a lecitina. Encontrados em vários *habitats*.

♦ *Terrabacter* – são bastonetes Gram positivos, não possuem motilidade e não esporulam. Aeróbio. Não produz ácido em meio contendo glicose ou outros carboidratos. São catalase, oxidase e gelatinase positivos. Utilizam o citrato, e sua temperatura ótima de crescimento situa-se entre 25 e 30°C. Encontrado no solo.

♦ *Agrobacterium* – as células possuem a forma de bastonetes e são Gram negativas. São aeróbias e possuem motilidade. Crescem bem entre 25 e 28°C e não esporulam. São catalase, urease e amilase positivas. A oxidase pode ser positiva ou negativa. Não hidrolisam o amido e a celulose. Produzem ácido a partir da glicose.

♦ *Pseudomonas* – são bastonetes, Gram negativos, não produtores de esporos. São aeróbios, catalase e gelatinase positivos. A maioria das espécies são móveis. Podem ser oxidase e lecitinase positivas ou negativas. Não



hidrolisam o amido e reduzem o nitrato. Têm bom crescimento à temperatura entre 25 e 30°C. Não produzem indol a partir do triptofano. São largamente distribuídos na natureza.

♦ *Xanthomonas* – são bastonetes Gram negativos aeróbios.

Possuem motilidade. Não produzem esporos. Não reduzem o nitrato. São catalase positiva e oxidase negativa ou fracamente positiva. Produzem pequena quantidade de ácido a partir de carboidratos. Crescem bem à 25-30°C. São patógenos de plantas ou ocorrem em associação.

Com base nos resultados obtidos e o exposto acima, as culturas isoladas e selecionadas foram agrupadas nestes gêneros. A porcentagem de similaridade indica a possibilidade delas pertencerem com maior ou menor probabilidade a um determinado gênero, como mostram as Tabelas 4 e 5. Entretanto, futuramente serão necessários testes mais específicos para sua melhor identificação, podendo se chegar à espécie.

O Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (COWAN *et al.*, 1974) menciona que estes gêneros são bons produtores de polissacarídeos extracelulares. Alguns possuem espécies muito estudadas e conhecidas pela excelente capacidade de produzir biopolímeros com grande potencial de uso nos diversos segmentos das indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e petrolífera. Logo, as bactérias selecionadas neste trabalho têm grande probabilidade de serem boas produtoras de biopolímeros ainda desconhecidos.

Tabela 4 – Porcentagem de semelhança (conforme as características observadas) entre os gêneros das bactérias Gram positivas isoladas e o BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (1994).

Cultura*	<i>Arthrobacter</i> (%)	<i>Bacillus</i> (%)	<i>Terrabacter</i> (%)
19A	81,8	00,0	91,6
1B	00,0	73,7	00,0
2B	76,9	00,0	91,6
3B	00,0	73,7	00,0
4B	00,0	68,4	00,0
5B	00,0	84,2	00,0
8B	00,0	52,6	00,0
1C	61,5	00,0	66,6
2C	61,5	00,0	66,6
3C	53,8	00,0	75,0
5C	00,0	52,6	00,0
10C	76,9	00,0	91,6
1D	76,2	00,0	66,6
11D	76,2	00,0	66,6
1E	00,0	52,6	00,0
4E	00,0	84,2	00,0
5E	00,0	84,2	00,0
6E	00,0	52,6	00,0
9E	00,0	89,4	00,0
10E	00,0	52,6	00,0
15E	00,0	57,9	00,0
17E	76,2	00,0	66,6
18E	00,0	84,2	00,0
1F	00,0	84,2	00,0
4F	69,2	00,0	83,3
7F	00,0	52,6	00,0
13F	00,0	84,2	00,0
16F	00,0	52,6	00,0
20F	84,6	00,0	91,6
21F	00,0	78,9	00,0
22F	00,0	78,9	00,0
24F	00,0	84,2	00,0

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); B, *Cecropia pachystachya* Trécul (Embaúba); C, *Tabebuia ochracea* (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo); D, *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco); E, *Delonix regia* (Flamboyant); F, *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumin).

Tabela 5 – Porcentagem de semelhança (de acordo com os testes bioquímicos realizados) entre os gêneros das bactérias Gram negativas isoladas e o **BERGEY’S Manual of Determinative Bacteriology** (1994).

Cultura*	<i>Agrobacterium</i> (%)	<i>Pseudomonas</i> (%)	<i>Xanthomonas</i> (%)
24A	61,5	93,0	70,0
39A	84,6	74,6	83,3
10D	84,6	93,0	75,0
12D	69,2	73,3	83,3
13D	76,9	80,0	66,6
10F	76,9	86,6	66,6

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); D, *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco); F, *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumin).

5.2. SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOPOLÍMEROS

As 38 culturas selecionadas para os testes bioquímicos foram submetidas à fermentação em meio base contendo 2,0% (p/v) de glicose como fonte de carbono, 30°C e 200 rpm. A partir daí, foi feita a determinação da viscosidade (mede a resistência dos fluidos ao escoamento) do caldo de fermentação realizada nos seguintes tempos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas (Anexo IV) e a determinação do crescimento celular pela medida da densidade óptica a 520 nm em intervalos de tempo de 2 em 2 horas durante o período de 12 horas de fermentação e novamente com 24 horas (Anexo V).



A escolha desta fonte de carbono nesta concentração foi baseada na literatura pertinente. Williams & Wimpenny (1977); Souw & Demain (1979); Kang *et al.* (1982); Kawai *et al.* (1992) estudaram o efeito de diferentes concentrações de glicose na produção do biopolímero e obtiveram bons resultados na concentração de 2,0% da mesma.

A determinação da viscosidade foi realizada em viscosímetro capilar, conforme metodologia descrita no item 4.2.2. Van Holde (1975) afirma que os viscosímetros capilares são bem adequados para a determinação da viscosidade do caldo de fermentação pois, embora não forneçam facilmente os valores de viscosidade absoluta, podem oferecer uma comparação muito acurada da viscosidade da solução e do solvente.

Segundo Van Holde (1975), as medições podem ser feitas com muita precisão, mas deve-se salientar que é necessário um bom controle da temperatura, pois a viscosidade depende muito da mesma.

Com o auxílio de um cronômetro pode-se medir esse tempo de escoamento do caldo fermentado pelo capilar de vidro e obter os valores em segundos. A Tabela 19 do Anexo IV mostra os resultados obtidos das medidas da viscosidade do caldo fermentado. Essas foram realizadas com 24, 48, 72 e 96 horas de incubação, a fim de observar o menor tempo de incubação necessário para que o caldo de fermentação atingisse a viscosidade máxima, que pode ser representada pela máxima produção de polissacarídeo.



Em seguida, esses dados foram substituídos na eq. (1) da lei de Poiseuille (VAN HOLDE, 1975), descrita em Materiais e Métodos no item 4.2.2., para se calcular a viscosidade. Os resultados estão representados graficamente na Figura 8 do Anexo IV.

Nessa mesma Figura 8, pode-se observar que cada bactéria estudada apresentou um comportamento característico. Em geral, observa-se que elas atingiram a máxima viscosidade do caldo fermentado em 72 horas de incubação e que, em um tempo de incubação de 96 horas, a viscosidade da maioria diminuiu.

Foram selecionadas três culturas para a produção de biopolímero, identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (culturas 10D, 13D e 10F), por apresentarem viscosidade máxima no tempo de 72 horas de fermentação, sendo que a cultura 13D, já apresentava uma boa viscosidade em 48 horas, como mostra a Figura 1. Nota-se, nessa Figura 1 que, após 72 horas de incubação, houve um ligeiro declínio da viscosidade dos caldos fermentados.

As culturas selecionadas *Pseudomonas* 10D e 13D foram isoladas da rizosfera da *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand, conhecida como ipê branco e a *Pseudomonas* 10F, da *Siparuna guianensis* Aubl., comumente conhecida por negumin.

Existem trabalhos (WILLIAMS & WIMPENNY, 1977; KANG *et al.*, 1982) nos quais foram isoladas bactérias de ambientes variados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, e que, quando cultivadas em meio



enriquecido de sais minerais e uma fonte de carbono, produziram polissacarídeos com ótimas propriedades funcionais.

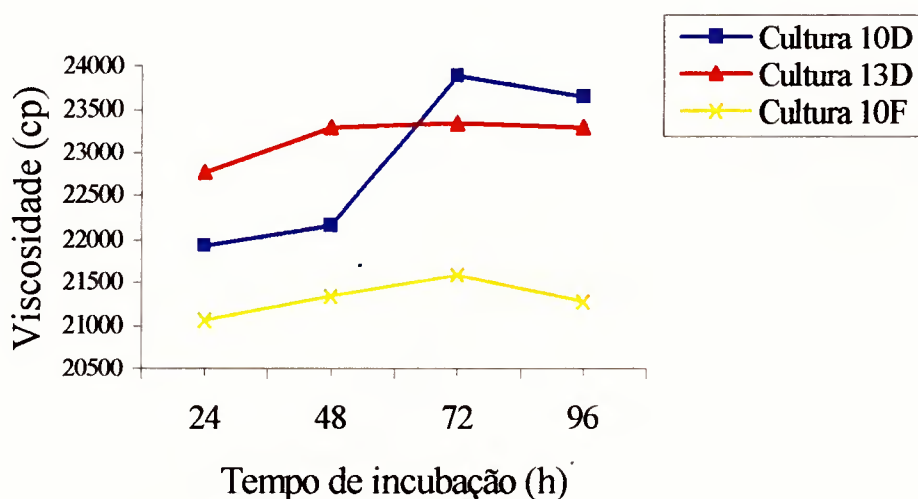


Figura 1 – Determinação da viscosidade do caldo fermentado pelas culturas selecionadas, durante fermentação a 30°C e 200 rpm, por 96 horas.

A curva de crescimento celular foi monitorada para as 38 culturas selecionadas e identificadas, para que se pudesse ter uma idéia do menor tempo necessário para um bom crescimento das células, estimando o tempo de duração do cultivo para aquela cultura. Os dados obtidos estão representados na Figura 9 (Anexo V).

A partir dessa Figura 9, foi construída a Figura 2, onde estão representadas as curvas da cinética de crescimento celular para as culturas selecionadas. Observa-se que as culturas selecionadas apresentaram um crescimento celular muito bom em 10 horas de incubação.

A partir da análise desse gráfico, foi possível estimar que a cultura se adaptou bem ao meio de fermentação, utilizando dos seus constituintes para sustentar o crescimento e, conseqüentemente, a produção do polissacarídeo.

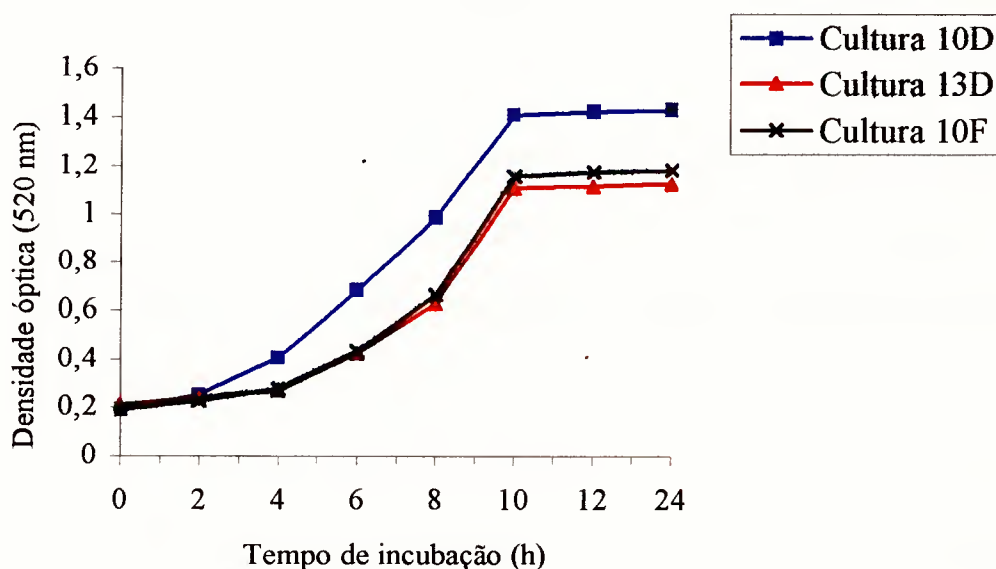


Figura 2 – Determinação do crescimento celular das culturas selecionadas, realizada a cada 2 horas, em espectrofotômetro (520 nm), durante a fermentação a 30°C e 200 rpm.

O critério de seleção das culturas produtoras de biopolímeros foi baseado na interpretação dos dados obtidos por essas duas determinações. Com a máxima viscosidade alcançada em menor tempo de incubação e um rápido crescimento celular, pode-se sugerir que elas produziram maior quantidade de polissacarídeo em um menor tempo de incubação.

5.3. PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO

As três culturas selecionadas na etapa anterior foram submetidas à determinação dos parâmetros ótimos de produção do polissacarídeo e características de crescimento em função da fonte de carbono adicionada, temperatura e pH.

Para a produção do polissacarídeo, as culturas foram inoculadas em meio sintético (SOUW & DEMAIN, 1979) com algumas modificações, composto de alguns sais minerais e uma fonte de nitrogênio, acrescido da fonte de carbono, conforme descrição da metodologia no item 4.3.4.

A partir do caldo fermentado foram feitas as determinações do pH final, açúcares residuais, peso celular seco e produção de polissacarídeo para as culturas selecionadas.

5.4. SELEÇÃO DA FONTE DE CARBONO

A utilização de bactérias como fonte de polissacarídeos industriais tem sido estimulada pela própria diversidade biológica destes organismos, seu rápido crescimento e reprodução, e sua versatilidade nutricional (LOPES & ANDRADE, 1995). Logo, para a produção de polissacarídeos microbianos pode-se utilizar de vários substratos, uma vez que os microrganismos



têm essa capacidade de, a partir dos mais diferentes substratos, sustentar o seu crescimento.

Contudo, os polissacarídeos bacterianos utilizados nos diversos setores industriais são produzidos sob condições controladas de fermentação utilizando-se de açúcares como glicose e sacarose. A utilização de glicose e sacarose, bem como outros açúcares (frutose, lactose, xilose, galactose, etc.), como fonte de carbono para a produção de biopolímeros, vem sendo estudada ao longo do tempo por vários autores (CATLEY, 1971; WILLIAMS & WIMPENNY, 1977; SOUW & DEMAINE, 1979; KANG *et al.*, 1982; VERMANI *et al.*, 1995; GANDHI *et al.*, 1997).

Williams & Wimpenny (1977) estudaram a produção de polissacarídeo por *Pseudomonas* NCIB 11264, em meio contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 1,0% (p/v), e obtiveram os maiores rendimentos do polissacarídeo com a utilização das hexoses: glicose e lactose, embora os dissacarídeos: sacarose, maltose e lactose, também, foram um bom substrato para o crescimento e produção do polissacarídeo.

Gandhi *et al.* (1997) observaram que a fonte de carbono influencia tanto o crescimento, quanto a produção do polissacarídeo, destacando que determinada fonte de carbono pode suportar um bom crescimento sem uma produção significativa de polissacarídeo.

Inicialmente foi feita a seleção da fonte de carbono, testando a glicose e a sacarose nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% (p/v). Para isso,



as culturas foram inoculadas no meio utilizado como base acrescido destas diferentes concentrações de açúcar e, em seguida, incubadas como descrito em Materiais e Métodos. Decorrido o tempo de fermentação, o caldo fermentado pela cultura foi submetido às análises mencionadas no item anterior.

Na Tabela 6, observa-se que a melhor produção em peso seco do polissacarídeo pela cultura 10D foi com a sacarose a 3,0%, acompanhado pelo maior crescimento celular. Já a glicose na mesma concentração foi a menos satisfatória para a produção do polissacarídeo.

Tabela 6 – Produção de polissacarídeo pela *Pseudomonas* 10D, em 50 mL de meio com diferentes concentrações de fonte de carbono, a 30°C e 200 rpm por 72 horas.

Glicose (%)	Peso celular seco (g)	Peso polissacarídeo seco (g)	Concentração final de açúcar (mg/mL)
1,0	0,26	0,34	0,029
2,0	0,36	0,39	0,044
3,0	0,22	0,16	0,103
4,0	0,21	0,17	2,179
5,0	0,23	0,18	7,952
Sacarose (%)			
1,0	0,27	0,37	0,071
2,0	0,40	0,46	0,720
3,0	0,42	0,52	3,826
4,0	0,34	0,29	11,643
5,0	0,25	0,21	14,443

Podemos observar que, à medida que aumenta a concentração da fonte de carbono, a produção e, conseqüentemente, o rendimento diminuem. Isso foi observado para todas as bactérias estudadas como mostram as Tabelas 6, 7 e 8 e a Figura 3.

Gandhi *et al.* (1997) trabalharam com a produção de polissacarídeo por *Bacillus megaterium* e obtiveram melhores rendimentos com 30 g/L de sacarose. Vários autores também conseguiram uma boa produção em baixas concentrações da fonte de carbono.

Na Figura 3, observa-se que o melhor rendimento do polissacarídeo produzido pela cultura 10D foi na concentração de 1,0% de sacarose, seguido da glicose na mesma concentração.

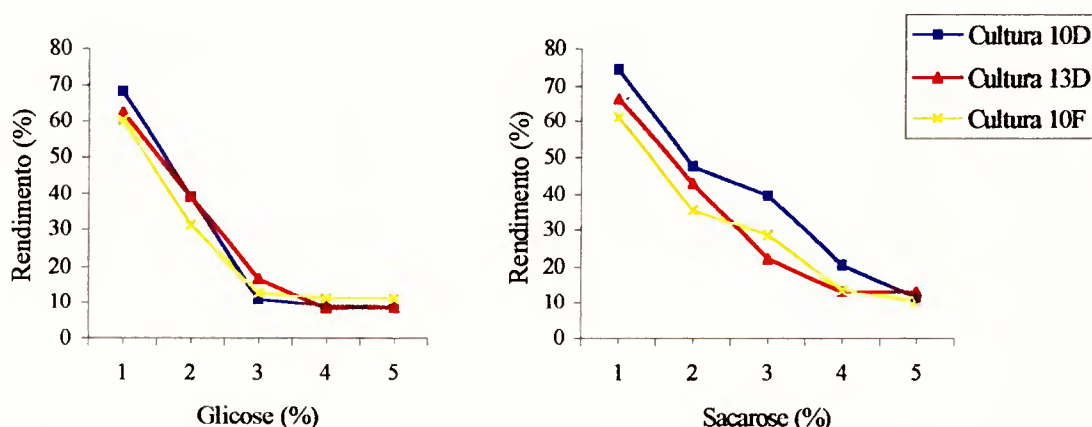


Figura 3 – Produção de polissacarídeo pelas culturas selecionadas utilizando diferentes concentrações de fonte de carbono em 50 mL de meio de cultivo e incubadas a 30°C e 200 rpm por 72 horas.

As culturas 13D e 10F tiveram melhor produção em peso seco do polissacarídeo na concentração de 2,0% de sacarose, e a cultura 10F manteve essa mesma produção em 3,0%, como observado nas Tabelas 7 e 8. Entretanto, os melhores rendimentos dos polissacarídeos produzidos pelas culturas 13D e 10F

foram obtidos nas concentrações de sacarose 1,0%, seguida, da glicose na mesma concentração, como observado, também, para a cultura 10D.

Tabela 7 – Produção de polissacarídeo pela *Pseudomonas* 13D, em 50 mL de meio com diferentes concentrações de fonte de carbono, a 30°C e 200 rpm por 72 horas.

Glicose (%)	Peso celular seco (g)	Peso polissacarídeo seco (g)	Concentração final de açúcar (mg/mL)
1,0	0,28	0,31	0,032
2,0	0,41	0,39	0,068
3,0	0,18	0,25	0,089
4,0	0,14	0,16	1,350
5,0	0,13	0,18	6,940
Sacarose (%)			
1,0	0,31	0,33	0,064
2,0	0,42	0,42	0,501
3,0	0,47	0,32	1,310
4,0	0,29	0,20	9,871
5,0	0,19	0,23	15,663

Tabela 8 – Produção de polissacarídeo pela *Pseudomonas* 10F, em 50 mL de meio com diferentes concentrações de fonte de carbono, a 30°C e 200 rpm por 72 horas.

Glicose (%)	Peso celular seco (g)	Peso polissacarídeo seco (g)	Concentração final de açúcar (mg/mL)
1,0	0,24	0,30	0,022
2,0	0,36	0,31	0,151
3,0	0,27	0,18	1,660
4,0	0,23	0,18	7,787
5,0	0,22	0,19	15,518
Sacarose (%)			
1,0	0,26	0,30	0,204
2,0	0,42	0,34	0,922
3,0	0,51	0,35	5,616
4,0	0,35	0,18	13,845
5,0	0,18	0,16	19,710

A glicose em concentrações elevadas não foi um bom substrato para o crescimento, bem como para a produção. As culturas 10D e 10F tiveram sua produção drasticamente afetada com concentrações de glicose acima de 2,0%. Já a cultura 13D, em concentrações acima de 2,0% de glicose, teve uma diminuição drástica no crescimento, o que também ocasionou uma diminuição da produção.

Os melhores rendimentos observados com relação ao polissacarídeo, no entanto, foram obtidos na concentração de 1,0% da fonte de carbono para todas as culturas testadas, como pode ser observado na Figura 3. Esse resultado está de acordo com Vermani *et al.* (1995) que trabalharam com a produção de polissacarídeo por *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 e obtiveram o melhor rendimento com 10 g/L de sacarose.

E, tanto a glicose como a sacarose foram bons substratos para a produção do polissacarídeo, pois apresentaram resultados semelhantes neste trabalho. Este comportamento foi semelhante ao encontrado por Souw & Demain (1979) quando trabalharam com *Xanthomonas campestris* para a produção de xantana testando diferentes fontes de carbono como substituto da glicose. Eles observaram que a sacarose era o melhor substrato para a produção da xantana, embora a produção tenha sido apenas levemente melhor quando comparada com a glicose usada como substrato.

Sendo assim, a sacarose pode ser utilizada ao invés da glicose, por apresentar vantagens sobre esta, como grande disponibilidade no mercado e



baixo custo, ocasionando uma diminuição no custo de produção do polissacarídeo bacteriano obtido via processo fermentativo.

O pH ótimo para o crescimento das bactérias e a produção de polissacarídeo varia de 6,0 a 7,5 (MARGARITIS & PACE, 1985). A Figura 4 indica a variação do pH final do caldo de fermentação com diferentes concentrações da fonte de carbono, partindo de um pH inicial 7,0.

Analisando essa Figura 4, juntamente com as Tabelas 6, 7 e 8, pode-se supor que houve uma influência do pH na diminuição do crescimento celular das culturas em presença da glicose, devido ao fato de que este teve uma queda acentuada de 7,0 para 3,0, a partir de 3,0% de concentração da glicose, que afetou a produção do polissacarídeo, principalmente nas concentrações mais elevadas.

Em geral, o aumento na concentração da fonte de carbono estimulou mais o crescimento celular que a produção de polissacarídeo propriamente dita, com exceção da cultura 13D em meio contendo glicose, que teve uma boa redução no crescimento celular.

Esta diminuição acentuada do pH pode ser devida aos metabólitos liberados durante o crescimento das bactérias, uma vez que, onde houve uma maior produção do polissacarídeo, o pH não teve essa queda acentuada, podendo supor que o polissacarídeo é neutro.

O meio de cultivo com adição de sacarose numa concentração elevada (5,0%) teve uma queda acentuada no pH que caiu de 7,0 para 3,0,



aproximadamente, levando a uma queda no crescimento celular e, conseqüentemente, na produção do polissacarídeo que, por sua vez, não foi suficiente para suportar o pH reduzido.

Com relação à concentração elevada (5,0%) de sacarose ocorreu o mesmo, uma queda acentuada no pH levou a uma diminuição do crescimento celular. No entanto, a diminuição do pH nas diferentes concentrações foi gradual, conforme foi aumentando a concentração da sacarose.



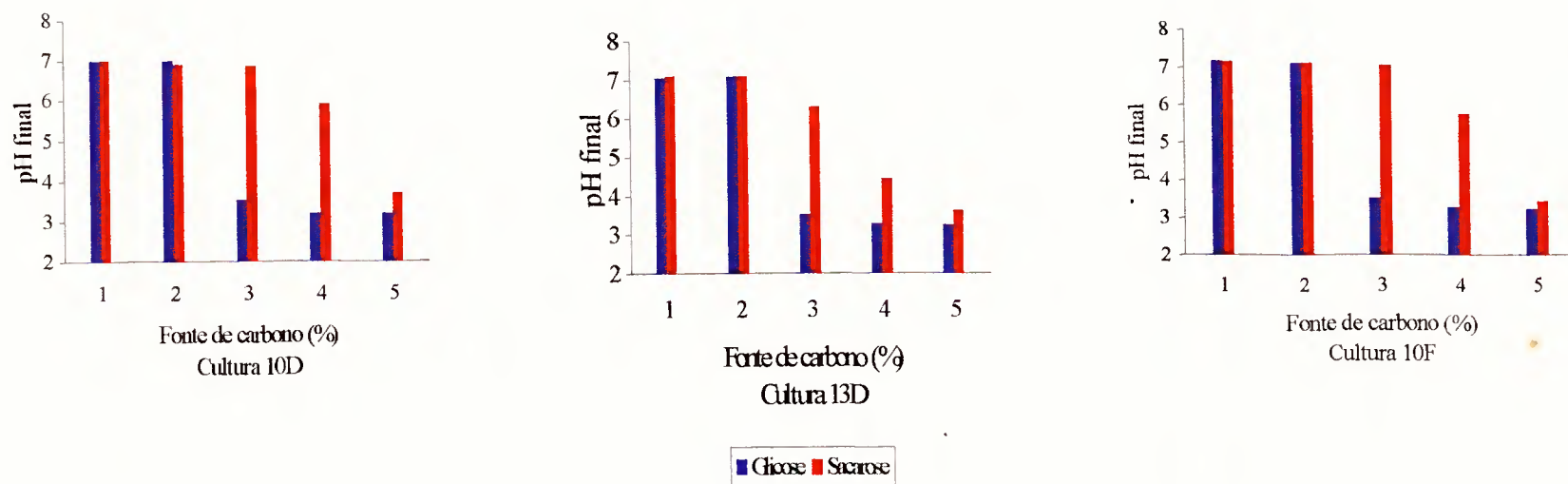


Figura 4 – Variação do pH final do caldo de fermentação das culturas 10D, 13D e 10F em diferentes concentrações da fonte de carbono, após 72 horas de incubação a 30°C e 200 rpm.

5.5. EFEITO DA TEMPERATURA E DO PH SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO

Após obter os melhores rendimentos dos polissacarídeos nas concentrações de 1,0% de glicose e sacarose, fez-se, então, o estudo da influência da temperatura e do pH, utilizando meio de cultivo com fonte de carbono nesta concentração obtida, para a produção do polissacarídeo.

As três culturas selecionadas são pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e, segundo Cowan *et al.* (1974), as linhagens que fazem parte deste gênero têm um bom crescimento entre as temperaturas de 25 e 30°C. Logo, as temperaturas testadas para a produção de polissacarídeo foram 25, 30 e 35°C, que estão dentro da faixa de crescimento das bactérias consideradas mesofílicas.

A temperatura é um fator importante para o crescimento e produção do biopolímero, sendo, muitas vezes, a temperatura ideal para o crescimento diferente da requerida para a produção do polissacarídeo, que, por sua vez, varia conforme a cultura utilizada. Um estudo anterior relata que a temperatura ótima para a produção de xantana, como medido pela viscosidade do caldo de cultura, foi de 28°C e para o crescimento 24 a 30°C (MORAINE & ROGOVIN apud MARGARITIS & PACE, 1985).

Em outro estudo conduzido por Vermani *et al.* (1995), sobre a produção de polissacarídeo por uma linhagem de *Azotobacter vinelandii* MTCC



2460, eles obtiveram uma temperatura ótima de crescimento de 25°C, enquanto que para a síntese do polissacarídeo foi de 30°C.

A Figura 5 mostra a influência da temperatura sobre o rendimento do polissacarídeo pelas diferentes culturas estudadas. Conforme aumentou a temperatura de 25 para 30°C, diminuiu o rendimento do polissacarídeo para as culturas 13D e 10F, tanto em meio contendo glicose como em sacarose. Já a cultura 10D apresentou um comportamento diferente, pois manteve constante a produção nestas temperaturas em meio contendo glicose, e em sacarose houve aumento considerável no rendimento do polissacarídeo.

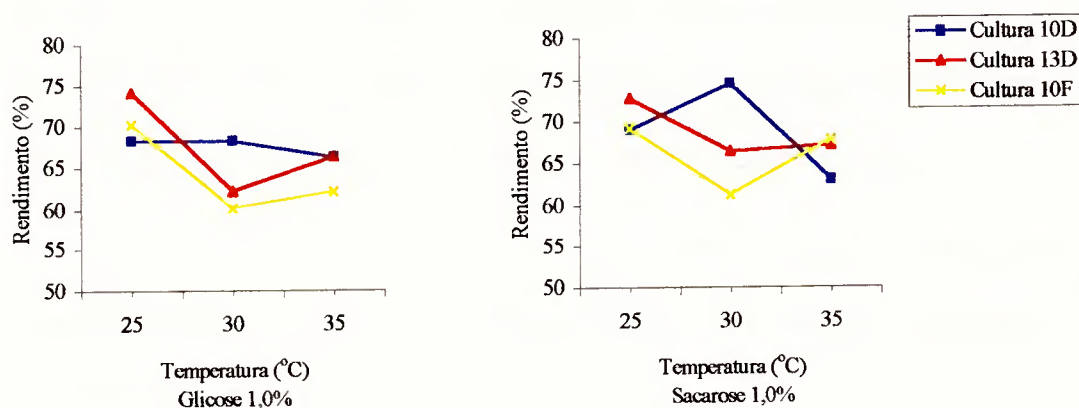


Figura 5 – Influência da temperatura na produção de polissacarídeos pelas diferentes culturas incubadas por 72 horas a 200 rpm.

À temperatura de 35°C, as culturas 13D e 10F apresentaram um ligeiro aumento no rendimento do polissacarídeo, mas inferior ao obtido na temperatura de 25°C. A cultura 10D, por sua vez, teve uma queda no rendimento do polissacarídeo na temperatura de 35°C, independente da fonte de carbono adicionada.

A Tabela 9 mostra a influência da temperatura de incubação sobre o crescimento celular e a produção de polissacarídeo seco. Com relação à produção de polissacarídeo, observa-se que a temperatura ótima de incubação foi de 25°C para as culturas 13D e 10F, enquanto que a cultura 10D teve uma melhor produção à temperatura de 30°C.

As culturas 10D e 13D tiveram um crescimento celular semelhante nas diferentes temperaturas. Às temperaturas de 25 e 30°C e em meio contendo glicose, o peso celular seco delas manteve-se constante e em meio contendo sacarose houve um ligeiro aumento. Já na temperatura de 35°C, ambas tiveram uma queda no crescimento, independente da fonte de carbono.

A cultura 10F teve o seu crescimento celular afetado pelas temperaturas acima de 25°C. Isto ocorreu tanto em meio com a glicose quanto com sacarose.



Tabela 9 – Produção de polissacarídeo pelas culturas selecionadas, em 50 mL de meio com 1,0% da fonte de carbono, incubadas a 200 rpm por 72 horas e diferentes temperaturas.

Cultura	Fonte de carbono (1,0%)	Peso celular seco (g)			Peso polissacarídeo seco (g)		
		25°C	30°C	35°C	25°C	30°C	35°C
10D	Glicose	0,26	0,26	0,21	0,34	0,34	0,33
	Sacarose	0,26	0,27	0,23	0,34	0,37	0,31
13D	Glicose	0,28	0,28	0,23	0,37	0,31	0,33
	Sacarose	0,28	0,31	0,24	0,36	0,33	0,33
10F	Glicose	0,25	0,24	0,20	0,35	0,30	0,31
	Sacarose	0,28	0,26	0,23	0,34	0,30	0,33

Foram selecionadas as temperaturas de 25°C, para as culturas 13D e 10F, e de 30°C, para a cultura 10D, como temperaturas ótimas para a produção de polissacarídeo.

Após as condições de cultivo, em função da concentração da fonte de carbono e da temperatura terem sido otimizadas, foi feita a investigação do efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de polissacarídeo. As condições de pH inicial analisadas variaram de 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

O pH ótimo para a produção do polissacarídeo depende da espécie em particular com a qual se trabalha, mas é próximo da neutralidade para a maioria das bactérias (WILKINSON apud WILLIAMS & WIMPENNY, 1977). Margaritis & Pace (1985) afirmam, também, que o pH ótimo para o crescimento das bactérias e a produção de polissacarídeo varia de 6,0 a 7,5.



Como mostra a Figura 6, as culturas selecionadas tiveram melhores produções em pH que vai da neutralidade à alcalinidade. Todavia, os máximos rendimentos dos polissacarídeos foram observados em meio de cultivo com o pH inicial igual a 7,0.

Em geral, para todas as culturas, observa-se que à medida que o pH inicial do meio de cultivo diminuiu ou elevou de 7,0, o rendimento diminuiu. Sendo que, em condições de cultivo com o pH 5,0 e 6,0, o rendimento sofreu uma queda bem acentuada, comparada com o pH 8,0.

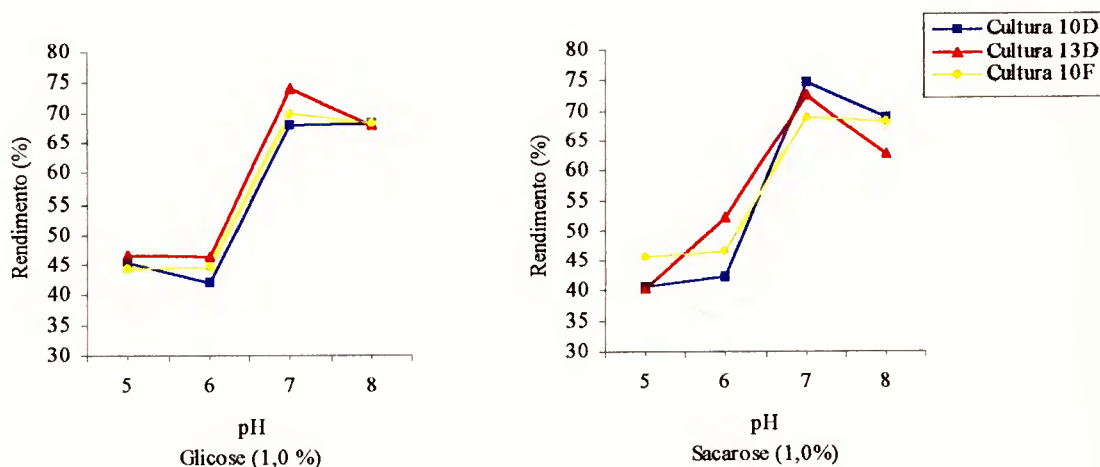


Figura 6 – Influência do pH sobre a produção de polissacarídeos pelas culturas selecionadas, inoculadas em 50 mL de meio de cultivo e incubadas a 200 rpm e temperaturas ideais de produção.

O pH do meio de cultivo parece ser um fator crítico de influência na produção do polissacarídeo, o qual deve ser controlado durante toda a fermentação (WILLIAMS & WIMPENNY, 1977). A captação do substrato pela bactéria é dependente do pH do meio de cultivo e, um controle adequado tanto na fermentação contínua como na descontínua é essencial para a síntese do polissacarídeo (SUTHERLAND apud VERMANI *et al.*, 1995).



6. CONCLUSÕES

A maioria das bactérias isoladas e selecionadas é bastonete Gram positivo esporulado e não esporulado, totalizando 82% das linhagens isoladas, sendo agrupadas nos gêneros *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Terrabacter*.

As bactérias Gram negativas isoladas e selecionadas contribuem com 13% dos isolados, e são bastonetes, não esporulados, agrupadas nos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*.

As três culturas selecionadas para a determinação das características de crescimento e produção do polissacarídeo em função da temperatura, pH e diferentes fontes de carbono são pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

A concentração da fonte de carbono que proporciona melhor rendimento do polissacarídeo é de 1,0% tanto para a glicose como para a sacarose e ambas apresentam um comportamento semelhante na produção do polissacarídeo, logo a glicose pode ser substituída pela sacarose.

As condições de cultivo que apresentam melhores rendimentos dos polissacarídeos produzidos são em meio de cultivo com concentração de 1,0% de glicose e sacarose e pH inicial 7,0. As temperaturas de incubação que proporcionam melhores rendimentos são 25°C para as culturas 13D e 10F e 30°C para a cultura 10D.



SUGESTÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES

Estudos básicos sobre a nutrição requerida pelas bactérias para uma melhor produção do polissacarídeo, podendo até chegar à formulação de um meio específico para tais microrganismos.

Estudos sobre a produção de polissacarídeo utilizando subprodutos das indústrias de alimentos, com o intuito de baratear o custo de produção e, também, um meio de utilizar esses subprodutos, diminuindo desta forma, a poluição ambiental.

Estudos sobre a composição química e a estrutura do polissacarídeo produzido, bem como análises para saber se realmente os diferentes parâmetros estudados interferiram na composição ou estrutura deles.

Estudo reológico dos biopolímeros produzidos neste trabalho, pois a maioria dos polissacarídeos com potencial para aplicações industriais depende das suas propriedades reológicas.

Estudo das aplicações dos polissacarídeos em diferentes condições de processamento, tais como: pH, temperatura, adição de componentes naturais ou adicionados aos alimentos, bem como a própria concentração do polissacarídeo.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M.; WILEY, J. Microbiology of the rhizosphere. In: _____. **Introduction to soil microbiology**. Tokio: Toppan, 1961. p. 442-459.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p. 1154-1160, June, 1985.

BeMILLER, J. N. Some challenges for gums and gum research. In: PHILIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and stabilizers for the food industry 4**. Oxford: IRL Press, 1988.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 219-252, 1992.

BURK, D. L.; BAROVSKY, K.; MONROY, G. H. Biodiversity and biotechnology. **Science**, v. 260, p. 1900-1901, June, 1993.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 33-39.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 41-57.



CATLEY, B. J. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 641-649, 1971.

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 87, p. 113-130, 1990.

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

COWAN, S. T.; HOLT, J. G.; LISTON, J.; MURRAY, R. G. E.; NIVEN, C. F.; RAVIN, A. W.; STAINER, R. Y. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974.

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

DLAMINI, A. M.; PEIRIS, P. S. Production of exopolysaccharide by *Pseudomonas* sp. ATCC 31461 (*Pseudomonas elodea*) using whey as fermentation substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 52-57, 1997.

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

FREIRE, J. R. J. O ensino de microbiologia do solo no Brasil. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Anais Microbiologia do solo: desafios para o séc. XXI**. Londrina: Embrapa, 1995. p. 272-278.



GANDHI, H. P.; RAY, R. M.; PATEL, R. M. Exopolymer production by *Bacillus* species. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 4, p. 323-327, Dec., 1997.

GLICKSMAN, M. Food applications of gums. In: LINNEBACK, D. R.; INGLET, G. E. **Food Carbohydrates**. Westport, Connecticut: AVI Publ., 1982. p. 270-295.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte, 1998. v. 1, 66 p.

IGOE, R. S. Hydrocolloid interactions useful in food system. **Food Technology**, v. 36, n. 4, p. 72-74, Apr., 1982.

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

KAWAI, H. *et al.* Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 6, p. 853-857, 1992.

KNORR, D. Improving food biotechnology resources and strategies in developing countries. **Food Technology**, v. 49, n. 1, p. 91-93, Jan., 1995.

KOVACS, P.; KANG, K. S. Xanthan gum. In: GRAHAM, H. D. **Food colloids**. Westport: AVI Publ., 1977. p. 500-521.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial**: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 309-334.



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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras** – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Plantarum, 1995. v. 1. 720 p.

LOVEJOY, T. Um lugar na História. **Revista Veja**, v. 25, n. 23, p. 100-101, jun., 1992.

LYNCH, J. M. **Biotecnologia do solo** – Fatores microbiológicos na produtividade agrícola. São Paulo: Manole, 1986. 209 p.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial polysaccharides. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology** – The principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 1005-1044.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORRIS, V. J. Fermentation-derived polysaccharides for use in foods. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 199-201, 1993.



MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. 341 p.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1989. 64 p.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P.; KNAUSS, C. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in a whey-based medium. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 3, p. 148-151, 1997.

OLEMBO, R. Biodiversity and its importance to the biotechnology industry. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, p. 1-6, 1995.

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

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2, p. 306-330.

PSZCZOLA, D. E. Gellan gum wins IFT's food technology industrial achievement award. **Food Technology**, v. 47, n. 9, p. 94-96, Sept., 1993.

ROBERTS, I. S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 50, p. 285-375, 1996.

SANDVICK, E. I.; MAERKER, J. M. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. In: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. **Extracellular microbial polysaccharides**. Washington, DC.: ACS, 1977. 242 p.



SCHNEIDER, J. E. Patentes ou biotecnologia: estímulo ou obstáculo à produção de conhecimentos e inovações ? **Ciência Hoje**, v. 15, n. 88, p. 35-40, mar., 1993.

SLODKI, M. E. New bacterial polysaccharides. In: STIVALA, S. S.; CRESCENZI, V.; DEA, I. C. M. **Industrial polysaccharides, the impact of biotechnology and advanced methodologies**. [S.l.]: Gordon and Breach Science Publ., 1987. p. 3.

SMITINONT, T. *et al.* Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 105-111, 1999.

SOUW, P.; DEMAİN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, June, 1979.

SOUZA, G. Utilização de goma xantana na indústria de alimentos. **Boletim do ITAL**, v. 21, n. 3, p. 277-290, jul./set., 1984.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of extracellular polysaccharides (exopolysaccharides). In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 69-85.

SZCZESNIAK, A. S. Rheological basis for the selection. In: PHILIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and stabilisers for the food industry 3**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 311 p.

VANCURA, V. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exsudates. **Folia Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 168-173, 1980.



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

VAN HOLDE, K. E. **Bioquímica física**. São Paulo: Edigard Blücher, 1975. p. 108-121.

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

WHISTLER, R. L. Introduction to industrial gums. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 1-19.

WILLIAMS, A. G.; WIMPENNY, J. W. T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in batch culture. **Journal of General Microbiology**, n. 102, p. 13-21, 1977.

ZILINSKAS, R. A. Bridging the gap between research and applications in the Third World. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 145-152, 1993.



ANEXO I

A – TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

Gram

A técnica de coloração de Gram é utilizada na diferenciação dos microrganismos em Gram positivos e negativos, podendo-se avaliar, também, a pureza da cultura em estudo. Deve-se fazer um esfregaço de uma cultura jovem, com 18 a 20 horas de incubação e submetê-lo aos reagentes: cristal violeta (corante primário), lugol (mordente, que fixa o corante no interior da célula), álcool (agente diferencial que remove o cristal violeta das bactérias Gram negativas) e safranina ou fucsina (corante de fundo que aumenta o contraste das bactérias descoradas pelo álcool com o meio). As bactérias Gram positivas coram-se de roxo e as negativas, de rosa como são observadas ao microscópio óptico.

Esporos

Os esporos são estruturas de resistência das células bacterianas e são formados em condições adversas ao crescimento, sendo que apenas alguns gêneros microbianos têm a habilidade de formar endosporos. Faz-se um esfregaço da cultura velha (48 h de incubação) e fixa-se no fogo. Em seguida, submete-se esse esfregaço aos seguintes reagentes: verde malaquita e safranina. Os esporos se coram de verde e as células vegetativas de rosa.



B – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

TESTES BIOQUÍMICOS

TSIA (Triple Sugar Iron Agar) ou Ágar tríplice açúcar ferro

Este teste é utilizado com dois propósitos: determinar a fermentação dos carboidratos e a produção de ácido sulfídrico (H_2S). O tubo de ensaio que contém o meio de cultura possui duas câmaras de reação: a porção inclinada (bisel), exposta em sua superfície ao oxigênio atmosférico é aeróbia; a porção inferior, denominada base é protegida do ar e é, relativamente, anaeróbia. Após inocular o microrganismo através de picada e estrias com o auxílio de uma agulha de platina de inoculação e incubá-lo por 18-24 horas a $30^{\circ}C$. A degradação aeróbia da glicose e dos compostos nitrogenados gera produtos alcalinos e manifesta-se pela cor vermelha no bisel e a base ácida, significa a produção de ácidos a partir da metabolização anaeróbia da glicose. Quando os carboidratos são fermentados, ocorre uma difusão de seus produtos ácidos, levando ao aparecimento da cor amarela em todo o meio de cultura. A produção de H_2S é evidenciada no meio de cultura, devido à sua reação com sais de metais formando sulfetos e que dá a coloração negra.



LIA (Lysine Iron Agar) ou Ágar lisina ferro

O teste do LIA é utilizado para a demonstração simultânea da lisina-descarboxilase (LD) e da produção de H_2S . Semeia-se o microrganismo através de picada e estrias sobre a superfície inclinada do meio de cultura. Incuba-se à temperatura de $30^{\circ}C$ por 24-48 horas. Todo o meio de cultura torna-se amarelo pela fermentação do açúcar e depois o bisel retorna a cor púrpura pela desaminação da peptona. Se a lisina é descarboxilada, a base do meio de cultura reverte-se a púrpura também, sendo a prova considerada positiva, com ou sem o H_2S . O teste negativo é observado pela cor amarela na base do meio de cultura, em função da fermentação da glicose.

Utilização do citrato

O teste do citrato determina a capacidade dos microrganismos utilizarem o citrato de sódio como única fonte de carbono para o seu metabolismo, uma vez que ele constitui um dos metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Os metabólitos decorrentes desta reação provocam a alcalinização do meio de cultura, que são detectados pelo indicador de pH (azul de bromotimol) presente no meio. O microrganismo é semeado em profundidade por picada e em uma única estria na superfície do tubo de ensaio contendo o ágar citrato e incubado a $30^{\circ}C$



por 24-48 horas. A prova positiva é representada pelo desenvolvimento da cor azul. Os microrganismos que não conseguem utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, não crescem no meio de cultura, e o mesmo permanece com a sua cor inalterada (verde).

Teste de redução do nitrato

Este teste é utilizado para determinar a habilidade que um microrganismo apresenta de reduzir o nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) ou a gás nitrogênio (N_2). Estas reações ocorrem normalmente sob condições anaeróbias, onde o microrganismo obtém o seu oxigênio do nitrato. Inocular o microrganismo no meio de cultura de nitrato com uma alça de platina carregada da cultura do microrganismo isolado. Incubar à temperatura de 30°C por 24-48 horas. Após o tempo de incubação adicionar ao tubo de ensaio dez gotas de uma mistura (v/v) dos reagentes α -naftilamina e ácido sulfanílico e agitar gentilmente. O aparecimento da coloração vermelha equivale a um teste positivo. O resultado negativo é representado pela ausência de coloração, e para confirmar que o nitrato foi ou não reduzido a compostos diferentes do nitrito, utiliza-se do teste de redução do zinco, que consiste em acrescentar ao tubo de ensaio uma pitada de zinco em pó. Agitar levemente e fazer a leitura entre 5 e 10 minutos. Se o meio de cultura ficar vermelho, o teste é considerado negativo, porém se permanecer com a cor inalterada, o teste é considerado positivo.



Indol

O indol é um dos produtos metabólicos da degradação do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptofano com a produção de indol, ácido pirúvico e amônia. Inocular o microrganismo em caldo contendo triptofano e incubar por 24 a 48 h, à temperatura de 30°C. Adicionar de três a cinco gotas do reagente de Kovac's no tubo de ensaio com o microrganismo teste e observar, imediatamente, se há o aparecimento de um anel vermelho na superfície de contato do tubo de ensaio indicando a presença de indol. A prova é, então considerada positiva. A prova negativa é caracterizada pela presença de um anel amarelo.

Demonstração da motilidade pelo cultivo

A motilidade pode ser observada semeando-se o microrganismo em meio de cultura semi-sólido. A cultura é inoculada com a agulha de platina no centro do meio de cultura até a metade do tubo de ensaio com o meio de motilidade, incuba-se a 30°C por 24 a 48 horas. Observar as zonas de crescimento difuso que parte da linha de inoculação, devido ao fato de os microrganismos providos de organelas de locomoção se moverem além desta. Os que não possuem motilidade crescem somente na linha de inoculação.



Fermentação de carboidratos

É utilizado para a determinação da fermentação de diferentes fontes de carbono como: glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose. Os carboidratos são fermentados pelas bactérias com formação de vários ácidos que vão se acumulando no meio de cultura de modo que o pH vai abaixando gradativamente. Em certos casos, a formação de ácido é acompanhada pela produção de gás que é coletado no tubo de Durhan. Pipeta-se 1,0 mL da cultura com 24 horas de crescimento em caldo nutriente e adiciona-se aos tubos de ensaio com o meio de cultura adicionado de 1% do carboidrato e um indicador de pH (vermelho de fenol). Incuba-se por 24-48 h a 30°C. A prova é considerada positiva pelo aparecimento da cor amarela no meio de cultura, cuja cor inicial era vermelha.

AValiação do perfil enzimático

Catalase

Teste utilizado para determinar a presença da enzima catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Utiliza-se uma cultura com 24 horas de crescimento, a partir da qual retira-se um pequeno inóculo com o auxílio da alça de platina e espalha-se em uma lâmina de



microscópio previamente limpa e seca. Em seguida, adiciona-se três a cinco gotas de água oxigenada a 3%. Observar a formação de bolhas de gás oxigênio, sendo o teste considerado positivo.

Oxidase

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

Hidrólise da gelatina

O teste da gelatina é utilizado para verificar a capacidade do microrganismo produzir enzimas proteolíticas extracelulares capazes de liquefazerem a gelatina. A cultura foi inoculada no meio de gelatina por picada. Incubou-se os tubos de ensaio à temperatura de 30°C por até 7 dias. Para proceder à leitura, eles foram levados à geladeira por 30 minutos para a solidificação do



meio de cultura. Caso o meio não solidifique, significa que foi liquefeita a gelatina e o teste é considerado positivo.

Hidrólise do amido

Esse teste é utilizado com a finalidade de verificar se o microrganismo possui ou não a enzima amilase, cuja função é hidrolisar o amido. O microrganismo a ser testado foi inoculado na placa de Petri por uma picada central e incubado a 30°C por 24-48 horas. Após esse período, adicionou-se o reagente de lugol, que dá uma coloração azul na presença de amido. Os microrganismos que estiverem circundados por uma zona clara ao redor da picada, é porque hidrolisaram o amido e possuem a enzima amilase, sendo a prova considerada positiva. Prova negativa se for observada uma zona azul ao redor da picada.

Hidrólise da lecitina

Esse teste é indicado para verificar a presença da lecitinase, utilizando um meio de cultura contendo gema de ovo. A bactéria foi inoculada por estrias superficiais no meio de cultura e, em seguida, incubada por 24-48 horas a 30°C. Os microrganismos que possuírem a enzima lecitinase irão degradar a



lecitina presente na gema de ovo em produtos insolúveis que se acumulam como um precipitado farinhoso ao redor das colônias (lecitinase positiva).

Hidrólise da caseína

A caseína pode ser hidrolisada pelas proteases dos microrganismos. Para o teste, o microrganismo foi inoculado por picada no centro de uma placa contendo meio de cultura com caseína e incubado à temperatura de 30°C por 24-48 horas. Os microrganismos capazes de produzir a enzima e hidrolisar a caseína produzem zonas claras ao redor do crescimento. Os microrganismos que não são capazes de hidrolisar a caseína podem não apresentar crescimento.



ANEXO II



REAGENTE DO MÉTODO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS) (MILLER, 1959)

- 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico,
- 19,8 g de NaOH,
- 1.416 mL de água destilada.

Dissolver a quente e adicionar:

- 7,6 g de fenol,
- 8,3 g de metabissulfito de sódio.

SOLUÇÃO DE TARTARATO DÚPLO DE SÓDIO E POTÁSSIO:



- 15,1 g (hidratado) ou 12,3 g (anidro) para 1 L da solução preparada acima.

MÉTODO DE REAÇÃO DO DNS (MILLER, 1959) com algumas modificações

- Em um tubo de ensaio colocar 1 mL da amostra e acrescentar 1 mL do reagente, para o branco utiliza-se 1 mL de água e 1 mL do reagente;
- agitar bem as amostras e incubá-las em ebulição por 10 minutos;
- paralisar a reação com banho de gelo;

- adicionar 10 mL de água destilada;
- agitar bem as amostras e fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco.

CURVA PADRÃO DE GLICOSE PELO MÉTODO DE REAÇÃO DO DNS

- Preparar em duplicata soluções de concentrações crescentes de glicose;
- retirar uma alíquota de 1 mL das soluções e preparar conforme o método descrito anteriormente;
- após a leitura, os dados obtidos foram plotados num gráfico da absorbância em função da concentração de glicose (mg/mL);
- foi feita a regressão linear da curva obtida, como observado na Figura 7.

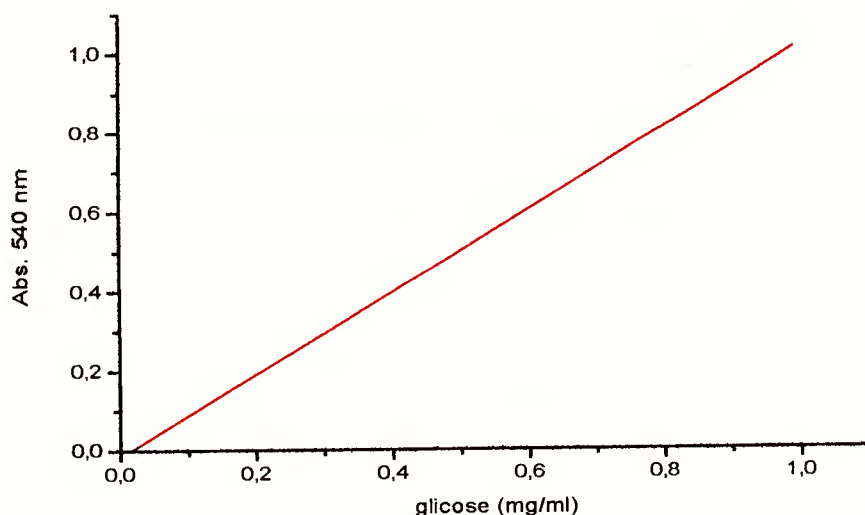


Figura 7 – Curva padrão da glicose pelo método do DNS.

Os valores de A e B obtidos foram, então, substituídos na equação da reta que segue:

$$Y = -0,01688 + 1,03657 \times X \quad \Rightarrow \quad X = \frac{0,01688 + Y}{1,03657} \quad (2)$$

onde: X = concentração do açúcar redutor (mg/mL);

Y = absorbância obtida da leitura das amostras.

HIDRÓLISE DA SACAROSE

- Colocar em um tubo de ensaio 2 mL da amostra a ser analisada e acrescentar 2 mL de HCl 2N, misturando bem;
- levar este tubo de ensaio ao banho-maria em ebulição por 5 minutos;
- em seguida, paralisar a reação imediatamente com um banho de gelo;
- a seguir, adicionar 2 mL de NaOH para neutralizar a reação.

Após a hidrólise, a amostra foi submetida ao método da reação do DNS.



ANEXO III

Tabela 10 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode), semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
1A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
2A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
3A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
4A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
5A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
6A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
7A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
8A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
9A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
10A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
11A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Amarela	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
12A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
13A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
14A	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
15A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
16A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
17A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
18A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
19A	Lisa, Brilhante	Opaca	Lilás	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
20A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
21A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
22A	Lisa, Brilhante	Opaca	Laranja	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
23A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
24A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
25A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
26A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete

Tabela 10 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode), semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

(continuação)

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
27A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
28A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
29A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
30A	Lisa, Brilhante	Transparente	Incolor	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
31A	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
32A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
33A	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
34A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
35A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	–	Bastonete
36A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
37A	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
38A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
39A	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
40A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
41A	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete

^a Pequena (< 1 mm); Média (> 1 e < 2 mm); Grande (> 2 mm)



Tabela 11 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Cecropia pachystachya* Trécul (Embaúba) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
1B	Enrugada, Butirosa	Translúcida	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
2B	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
3B	Enrugada, Butirosa	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa	+	Bastonete Esporulado
4B	Enrugada, Butirosa	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa	+	Bastonete Esporulado
5B	Enrugada, Butirosa	Translúcida	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
6B	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Coco
7B	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
8B	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado

^a Média (> 1 e < 2 mm); Grande (> 2 mm)



Tabela 12 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
1C	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete
2C	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete
3C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
4C	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete Esporulado
5C	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Gomosa	+	Bastonete Esporulado
6C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
7C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
8C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Amarela	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete
9C	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
10C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete
11C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
12C	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete
13C	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete

^a Pequena (< 1 mm); Média (> 1 e < 2 mm); Grande (> 2 mm)



Tabela 13 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
1D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
2D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
3D	Lisa, Brilhante	Transparente	Incolor	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
4D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
5D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
6D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
7D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
8D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
9D	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
10D	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Grande	Viscosa	–	Bastonete
11D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
12D	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	–	Bastonete
13D	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
14D	Lisa, Brilhante	Opaca	Laranja	Circular	Média	Viscosa	+	Coco
15D	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Coco

^a Pequena (< 1 mm); Média (> 1 e < 2 mm); Grande (> 2 mm)



Tabela 14 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Delonix regia* (Flamboyant) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
1E	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
2E	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
3E	Lisa, Brilhante	Transparente	Incolor	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
4E	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
5E	Butirosa*, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa*	+	Bastonete Esporulado
6E	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
7E	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa*	+	Bastonete Esporulado
8E	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Coco
9E	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
10E	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
11E	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
12E	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Média	Gomosa	+	Bastonete Esporulado
13E	Butirosa*, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Granulosa*	+	Bastonete Esporulado
14E	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Coco
15E	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete Esporulado
16E	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Coco
17E	Lisa, Brilhante	Opaca	Amarela	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
18E	Butirosa*, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa*	+	Bastonete Esporulado
19E	Butirosa*, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa*	+	Bastonete Esporulado

* Levemente

^a Média (> 1 e < 2 mm); Grande (> 2 mm)



Tabela 15 – Características morfológicas das colônias e morfotintoriais das culturas isoladas da rizosfera de *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumim) semeadas em PCA e incubadas a 30°C por 24 horas.

Cultura	Superfície	Opacidade	Cor	Forma	Tamanho ^a	Consistência	Coloração de Gram	Morfologia da célula
1F	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
2F	Butirosa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Grande	Granulosa	+	Esporulado Bastonete
3F	Lisa, Brilhante	Transparente	Incolor	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
4F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
5F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
6F	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
7F	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Esporulado Bastonete
8F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
9F	Butirosa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Quebradiça	+	Esporulado Bastonete
10F	Lisa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Média	Viscosa	–	Bastonete
11F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
12F	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Bastonete
13F	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Esporulado Bastonete
14F	Butirosa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa	+	Bastonete
15F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Pequena	Viscosa	+	Esporulado Bastonete
16F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
17F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	–	Esporulado Bastonete
18F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	–	Bastonete
19F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Branca	Circular	Pequena	Viscosa	–	Bastonete
20F	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Bastonete
21F	Butirosa, Brilhante	Opaca	Branca	Circular	Grande	Granulosa	+	Bastonete
22F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Média	Viscosa	+	Esporulado Bastonete
23F	Butirosa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Grande	Granulosa	+	Bastonete
24F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Amarela	Circular	Grande	Viscosa	+	Esporulado Bastonete
25F	Lisa, Brilhante	Translúcida	Creme	Circular	Pequena	Viscosa	+	Bastonete
26F	Lisa, Brilhante	Opaca	Creme	Circular	Grande	Viscosa	+	Esporulado Bastonete

^a Pequena (< 1 mm); Média (> 1 e < 2 mm); Grande (> 2 mm)



Tabela 16 – Características bioquímicas e determinação da motilidade das bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras* da rizosfera, com 24 horas de crescimento a 30°C, semeadas em PCA.

Cultura	TSIA	LIA	Citrato	Nitrato	Indol	Motilidade
19A	–	+	–	+	–	+
24A	–	+	–	+	–	–
39A	–	+	+	+	–	–
1B	b: Vermelho ba: Amarela	+	–	+	–	+
2B	–	+	–	+	–	–
3B	b: Vermelho ba: Amarela	+	–	+	–	+
4B	b: Vermelho ba: Amarela	+	–	+	–	–
5B	+	+	–	+	–	+
8B	–	+	–	+	–	+
1C	+	+	–	+	–	+
2C	+	+	–	+	–	+
3C	+	–	–	+	–	–
5C	+	–	–	+	+	–
10C	–	+	–	+	–	–
1D	b: Vermelho ba: Amarela	–	–	+	–	+
10D	–	+	+	+	–	+
11D	–	+	–	+	–	+
12D	–	+	+	+	–	–
13D	–	+	+	+	–	+
1E	– ^w	+	–	+	–	–
4E	+	+	–	+	–	+
5E	+	+	–	+	–	+
6E	– ^w	+	–	+	–	–
9E	+	+	+	+	–	+
10E	–	+	–	+	–	–
15E	–	+	–	+	–	–
17E	–	+	+	+	–	+
18E	b: Vermelho ba: Amarela	+	–	+	–	+
1F	+	+	+	–	–	+
4F	+	–	–	+	–	–
7F	– ^w	+	–	+	–	–
10F	–	+	+	+	–	–
13F	+	+	–	+	–	+
16F	–	+	–	+	–	–
20F	– ^w	+	–	+	–	–
21F	– ^w	+	–	+	–	–
22F	+	+	–	+	–	–
24F	+	+	–	+	–	+

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); B, *Cecropia pachystachya* Trécul (Embaúba); C, *Tabebuia ochracea* (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo); D, *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco); E, *Delonix regia* (Flamboyant); F, *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumin).

b Bisel.

ba Base.

^w Produziu H₂S.

Tabela 17 – Utilização dos carboidratos com produção de ácido pelas bactérias isoladas e selecionadas das diferentes amostras* da rizosfera.

Cultura	Glicose	Sacarose	Maltose	Lactose	Manitol
19A	–	–	–	–	–
24A	–	–	–	–	–
39A	–	–	–	–	–
1B	–	–	+	–	–
2B	–	–	–	–	–
3B	+	–	+	–	–
4B	+	–	–	–	–
5B	+	+	+	–	+
8B	–	–	–	–	–
1C	+	+	+	–	–
2C	+	+	+	–	–
3C	+	+	+	–	–
5C	+	–	–	–	–
10C	–	–	–	–	–
1D	+	–	+	–	–
10D	+	–	–	–	–
11D	+	–	+	–	–
12D	–	–	–	–	–
13D	+	–	+	–	–
1E	–	–	–	–	–
4E	+	+	+	+	+
5E	+	+	+	–	–
6E	–	–	–	–	–
9E	+	+	+	+	+
10E	–	–	–	–	–
15E	–	–	–	–	–
17E	+	–	+	–	–
18E	+	+	+	–	–
1F	+	+	+	+	+
4F	+	–	+	+	–
7F	–	–	–	–	–
10F	+	–	–	–	–
13F	+	+	+	+	+
16F	–	–	–	–	–
20F	–	–	–	–	–
21F	+	+	+	–	–
22F	+	+	+	–	–
24F	+	+	+	+	+

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); B, *Cecropia pachystachya* Trécul (Embaúba); C, *Tabebuia ochracea* (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo); D, *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco); E, *Delonix regia* (Flamboyant); F, *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumin).

Tabela 18 – Atividade enzimática das culturas isoladas e selecionadas das diferentes amostras* da rizosfera, com 24 horas de crescimento a 30°C em PCA.

Cultura	Catalase	Oxidase	Gelatinase	Amilase	Lecitinase	Protease
19A	+	-	-	-	+	-
24A	-	+/-	-	-	+	-
39A	-	+	-	-	-	-
1B	+	-	+	+	-	+
2B	+	-	-	-	-	-
3B	+	-	-	+	-	-
4B	+	-	+	+	+	+
5B	+	-	+	+	+	+
8B	+	-	-	-	+	-
1C	+	-	+	+	+	+
2C	+	-	+	+	-	+
3C	+	-	+	+	-	+
5C	+	+/-	-	+	+	-
10C	+	-	-	-	+	+
1D	+	-	-	-	+	+
10D	+	-	+	-	+	+
11D	+	-	-	-	+	+
12D	+	-	-	-	+	-
13D	+	+/-	-	+	+	+
1E	+	-	+	-	+	-
4E	+	-	+	+	+	+
5E	+	-	+	+	+	+
6E	+	-	+	-	+	-
9E	+	-	+	+	+	+
10E	+	-	+	-	+	-
15E	+	-	+	-	+	+
17E	+	-	-	-	+	+
18E	+	-	+	+	+	+
1F	+	-	+	+	+	+
4F	+	-	+	-	-	+
7F	+	-	+	-	+	-
10F	+	-	+	-	+	+
13F	+	-	+	+	+	+
16F	+	-	+	-	+	-
20F	+	-	+	+	+	+
21F	+	-	+	+	+	+
22F	+	-	+	+	+	+
24F	+	-	+	+	+	+

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); B, *Cecropia pachystachya* Trécul (Embaúba); C, *Tabebuia ochracea* (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo); D, *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco); E, *Delonix regia* (Flamboyant); F, *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumin).

ANEXO IV



Tabela 19 – Determinação do tempo de escoamento do caldo fermentado, inoculado com as culturas isoladas e selecionadas de amostras* da rizosfera, incubadas a 30°C e 200 rpm, durante 24, 48, 72 e 96 horas.

Cultura	Tempo de escoamento (segundos)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
19A	3 ₂₉	3 ₃₁	3 ₂₉	3 ₂₉
24A	3 ₂₇	3 ₅₁	3 ₈₇	3 ₈₁
39A	3 ₃₃	3 ₃₇	3 ₄₂	3 ₅₀
1B	3 ₃₆	3 ₃₂	3 ₃₀	3 ₃₃
2B	3 ₂₈	3 ₃₀	3 ₃₁	3 ₃₇
3B	3 ₃₁	3 ₄₀	3 ₅₃	3 ₄₇
4B	3 ₅₀	3 ₅₂	3 ₅₅	3 ₅₀
5B	3 ₅₇	3 ₅₅	3 ₆₁	3 ₅₆
8B	3 ₃₇	3 ₃₅	3 ₄₀	3 ₄₁
1C	3 ₁₈	3 ₂₀	3 ₂₅	3 ₂₅
2C	2 ₆₃	2 ₆₅	2 ₇₄	2 ₆₇
3C	3 ₈₂	3 ₈₀	3 ₈₃	3 ₈₀
5C	3 ₅₈	3 ₅₅	3 ₆₂	3 ₆₀
10C	3 ₇₇	3 ₇₅	3 ₈₀	3 ₈₃
1D	3 ₄₄	3 ₄₀	3 ₄₀	3 ₄₃
10D	3 ₄₉	3 ₅₁	3 ₆₉	3 ₆₇
11D	3 ₂₇	3 ₂₈	3 ₂₉	3 ₃₂
13D	3 ₅₈	3 ₆₃	3 ₆₄	3 ₆₃
1E	3 ₂₇	3 ₂₈	3 ₂₇	3 ₂₇
4E	3 ₃₈	3 ₃₅	3 ₃₇	3 ₃₃
5E	2 ₆₃	2 ₆₅	2 ₆₂	2 ₆₀
6E	3 ₃₅	3 ₃₇	3 ₄₀	3 ₃₅
9E	2 ₇₀	2 ₇₁	2 ₈₆	2 ₆₇
10E	3 ₃₃	3 ₃₃	3 ₃₄	3 ₃₀
15E	3 ₅₈	3 ₅₅	3 ₅₆	3 ₅₃
17E	3 ₄₅	3 ₅₀	3 ₅₁	3 ₄₈
18E	3 ₁₇	3 ₂₂	3 ₂₄	3 ₂₄
1F	3 ₈₀	3 ₈₅	3 ₈₃	3 ₈₁
4F	3 ₄₉	3 ₆₀	3 ₆₉	3 ₅₇
7F	3 ₅₉	3 ₅₃	3 ₅₈	3 ₅₃
10F	3 ₄₀	3 ₄₃	3 ₄₅	3 ₄₂
13F	3 ₃₃	3 ₃₆	3 ₃₆	3 ₃₅
16F	3 ₄₅	3 ₄₂	3 ₆₆	3 ₃₅
20F	3 ₆₀	3 ₆₆	3 ₇₇	3 ₅₅
21F	3 ₅₀	3 ₄₉	3 ₅₇	3 ₄₀
22F	3 ₈₇	3 ₈₅	3 ₉₄	3 ₈₃
24F	3 ₄₀	3 ₄₁	3 ₅₂	3 ₄₁

* Amostras: A, *Dieffenbachia amoena* Hort. ex Gent. (Comigo-ninguém-pode); B, *Cecropia pachystachya* Trécul (Embaúba); C, *Tabebuia ochracea* (Cham.) Stanfl. (Ipê amarelo); D, *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Ipê branco); E, *Delonix regia* (Flamboyant); F, *Siparuna guianensis* Aubl. (Negumin).



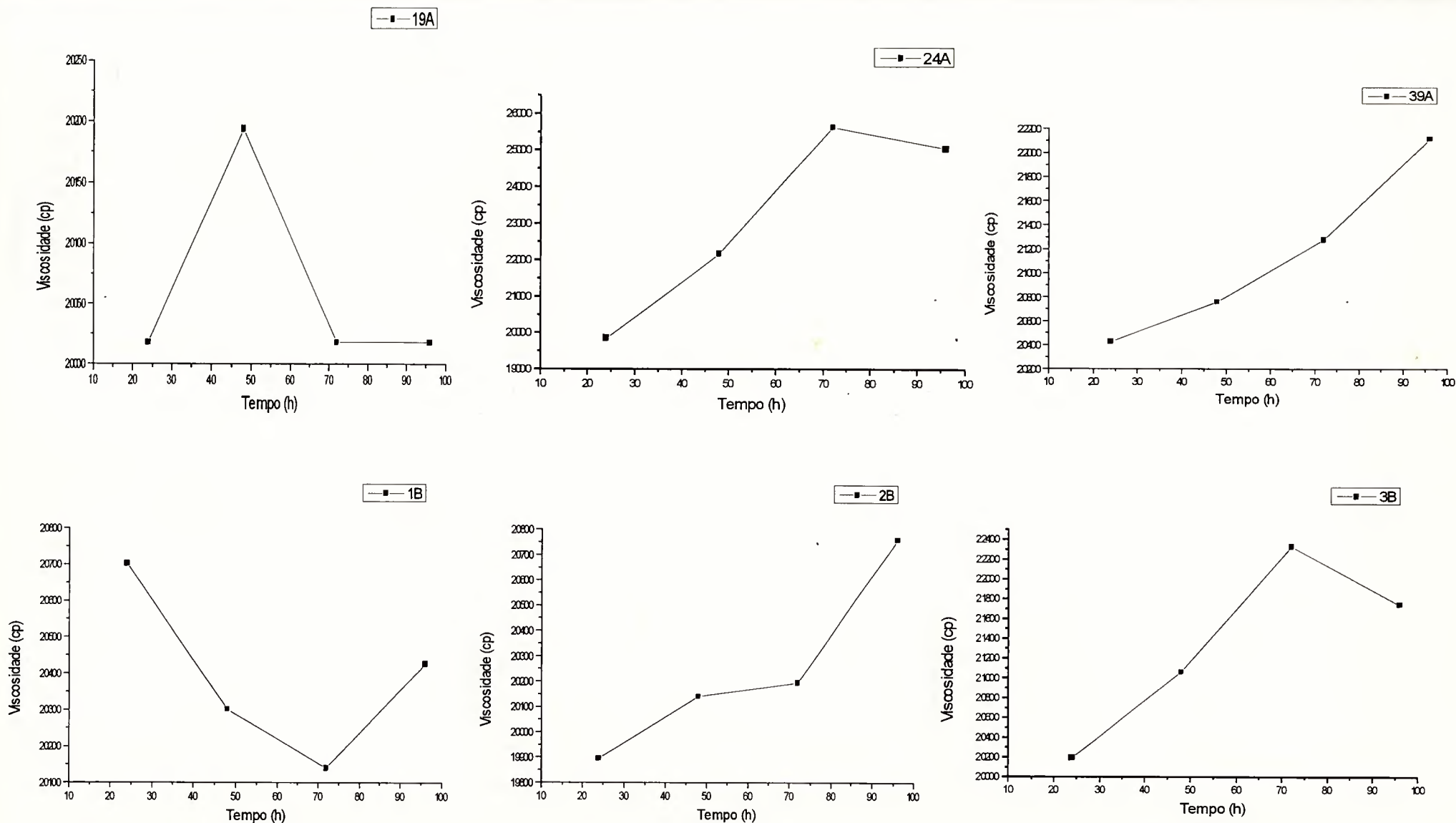


Figura 8 – Determinação da viscosidade do caldo de fermentação das culturas selecionadas, em 24, 48, 72 e 96 horas de incubação a 30°C e 200 rpm.

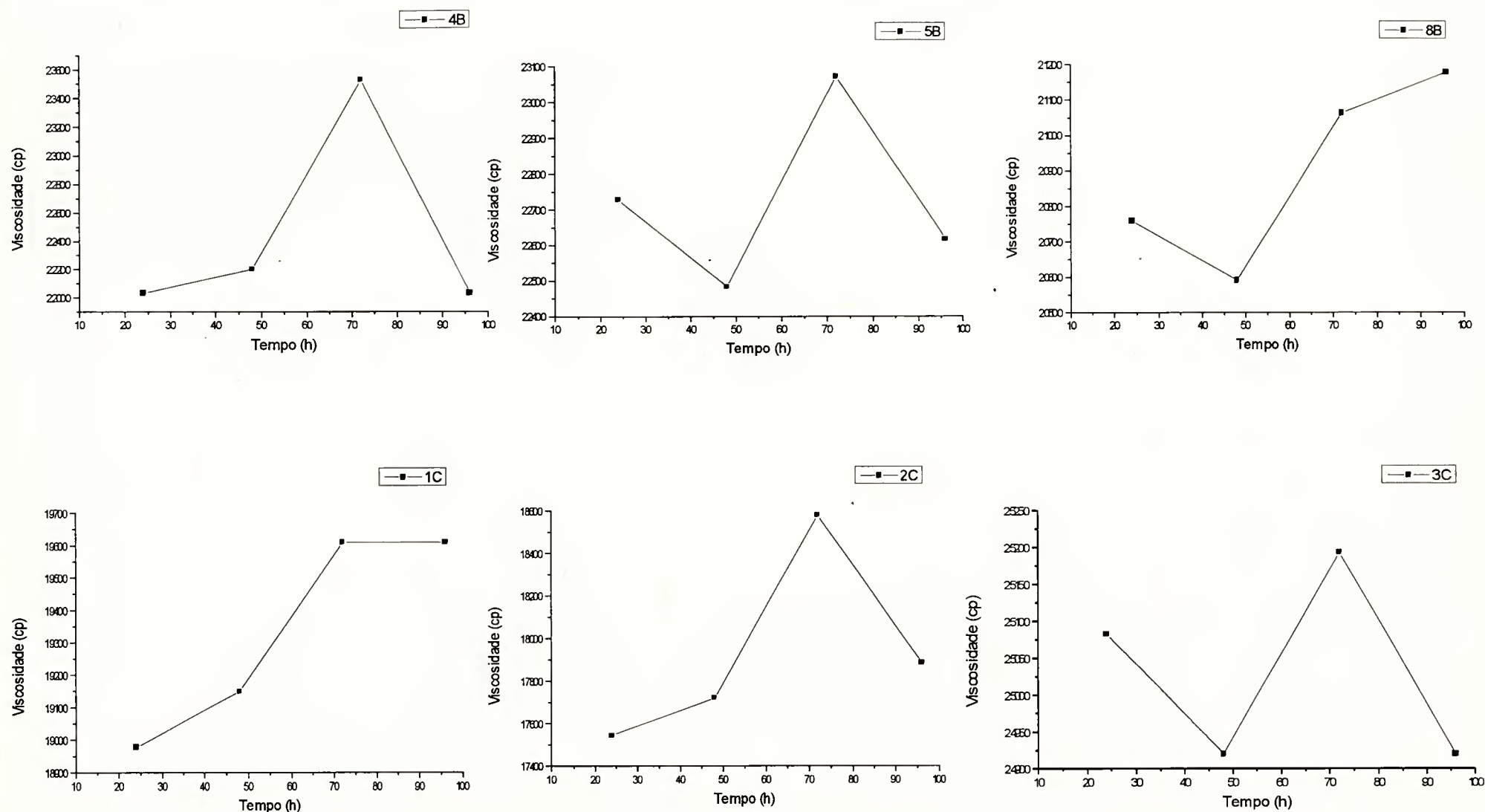


Figura 8 – (continuação).

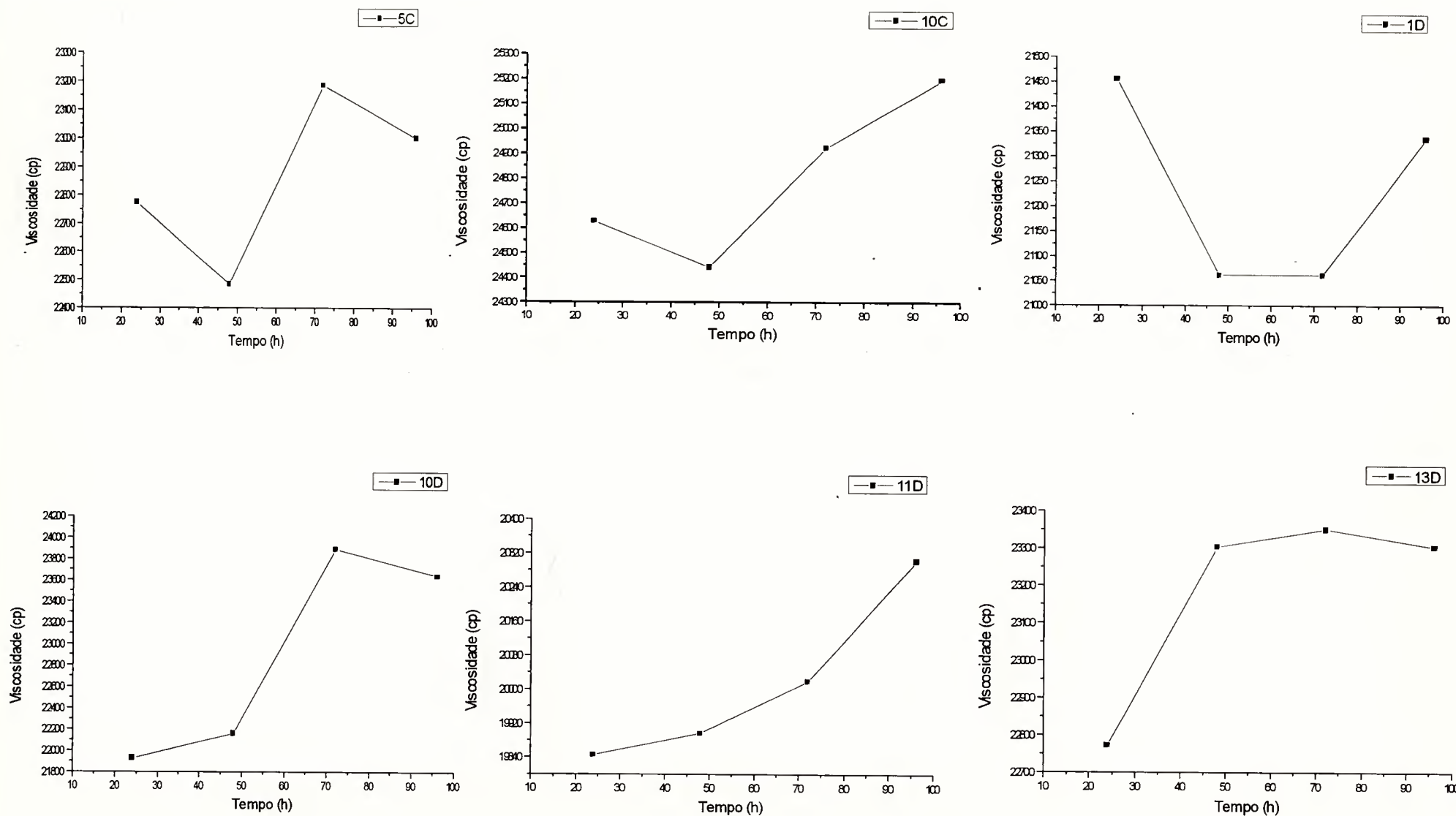


Figura 8 – (continuação).



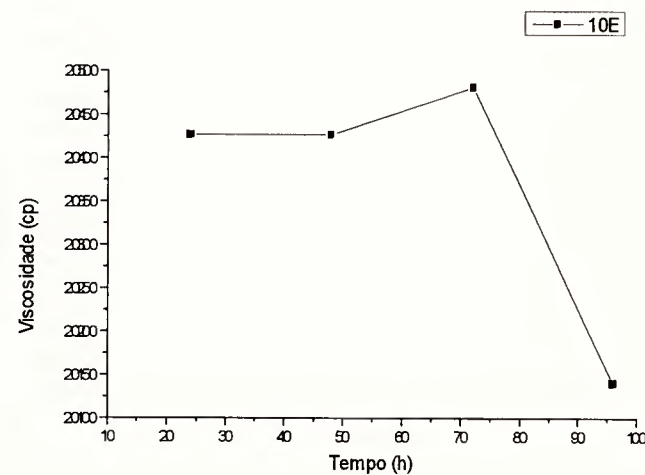
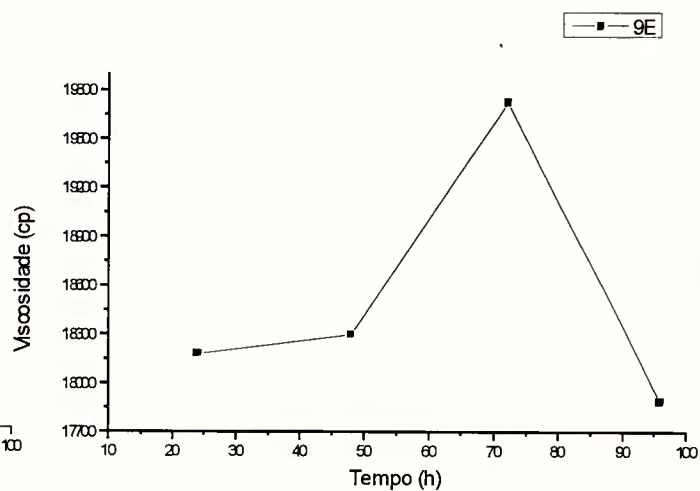
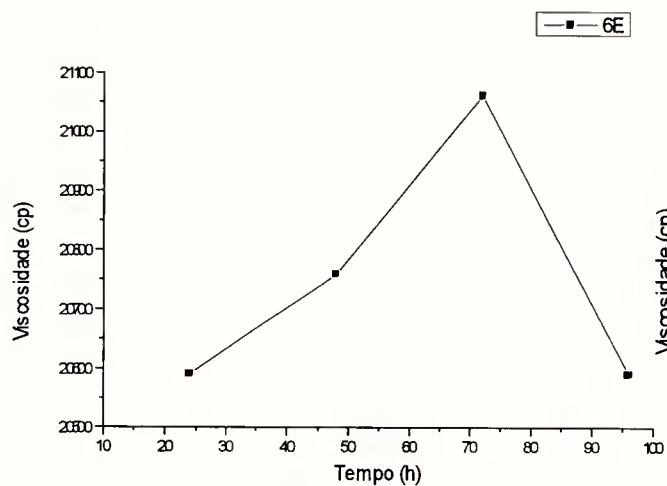
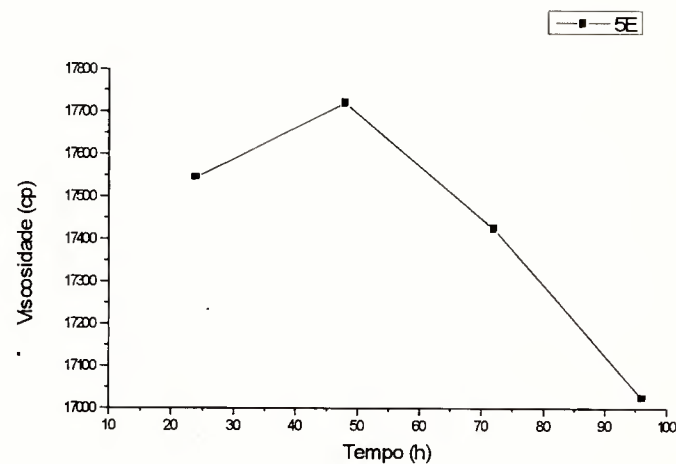
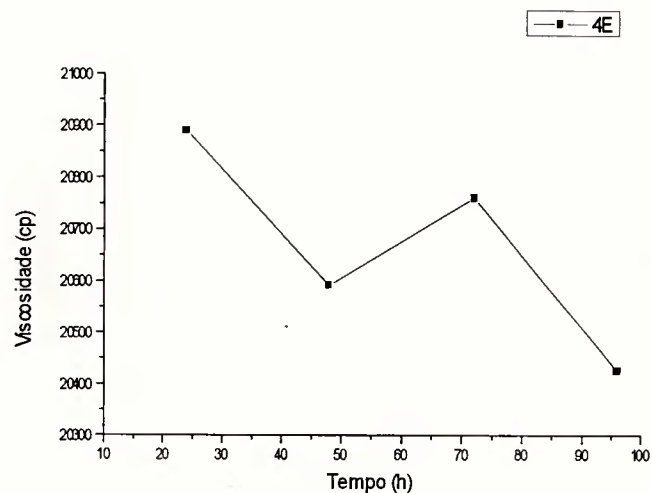
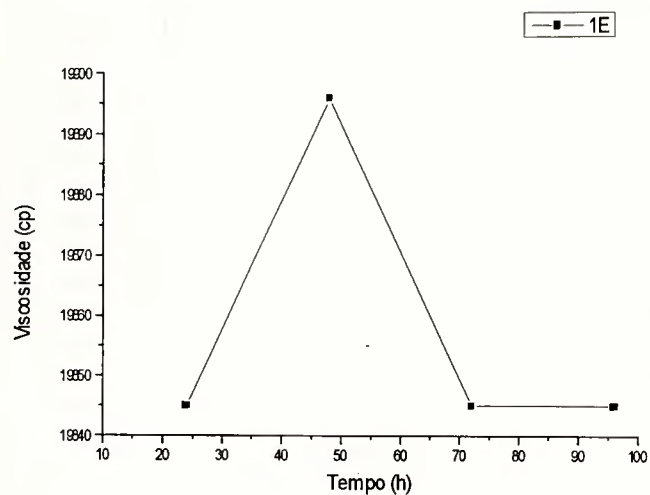


Figura 8 – (continuação).

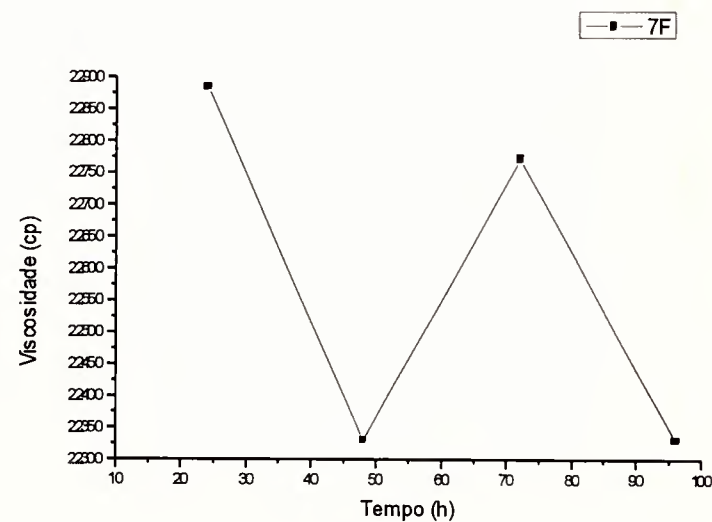
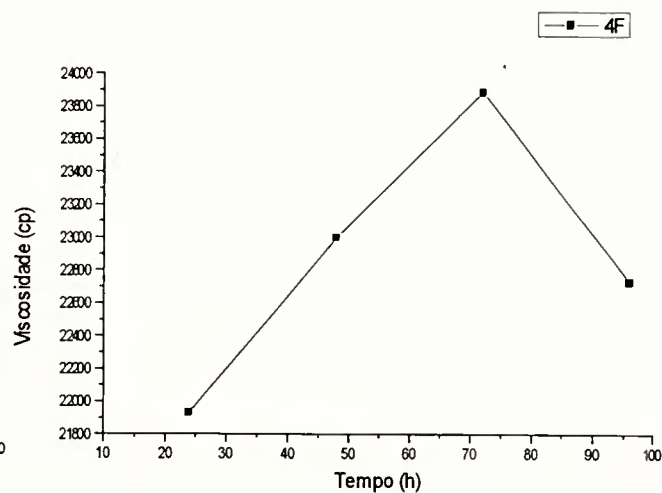
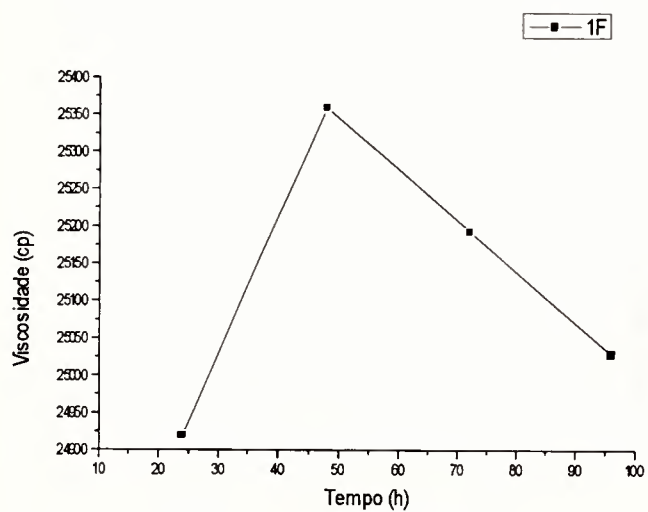
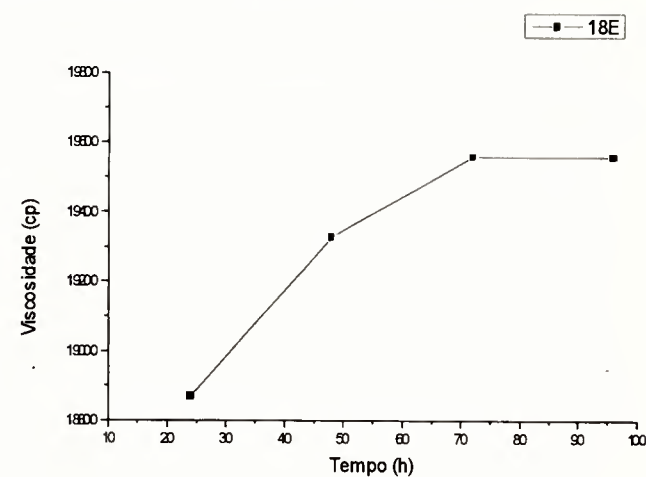
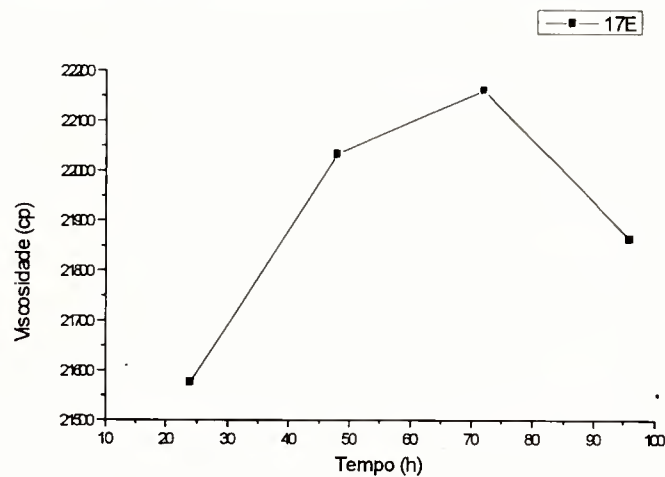
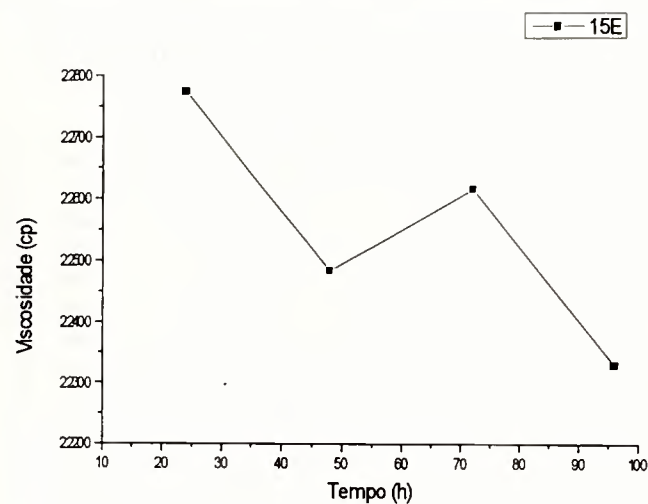


Figura 8 – (continuação).

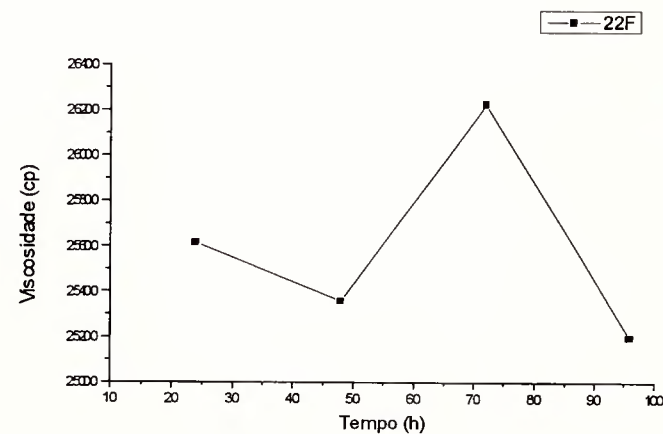
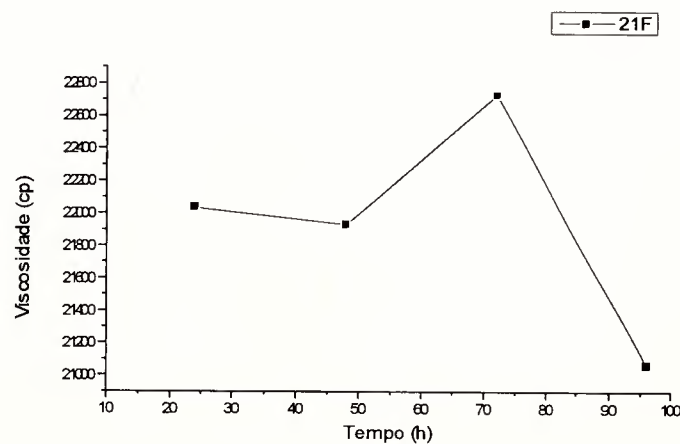
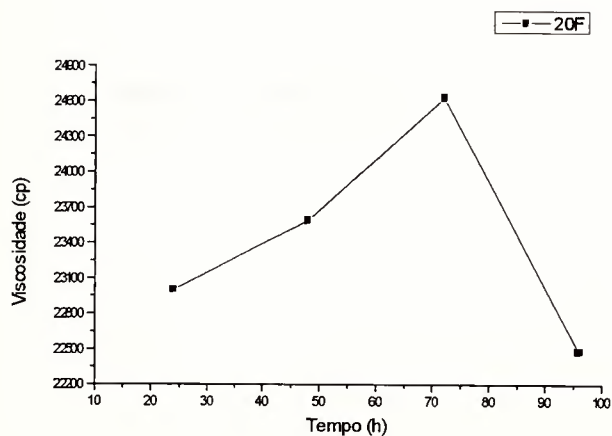
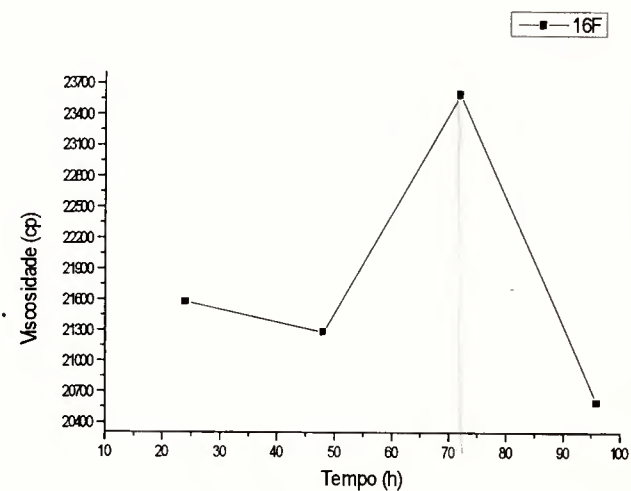
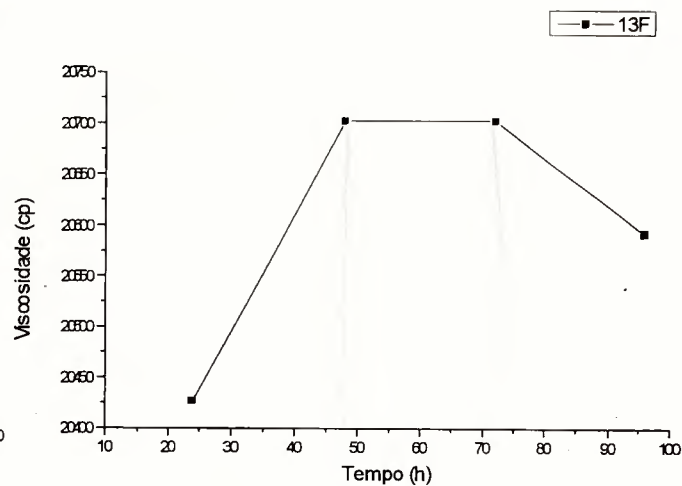
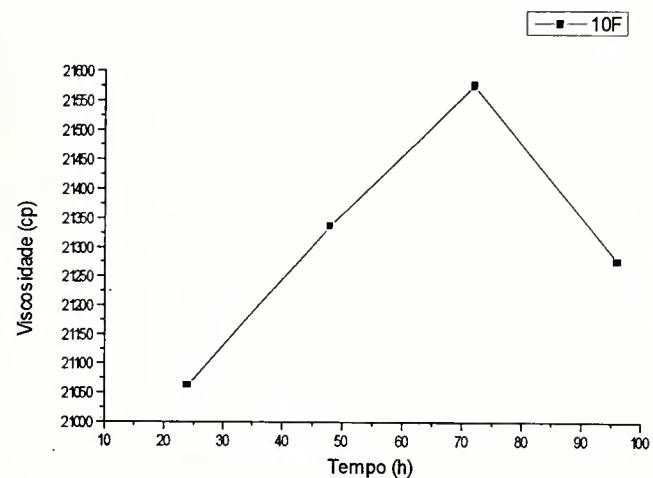


Figura 8 – (continuação).

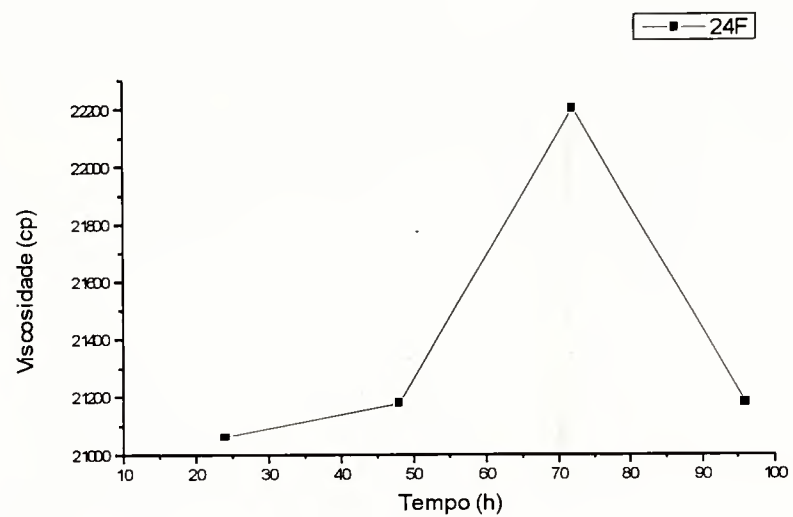


Figura 8 – (continuação).

ANEXO V

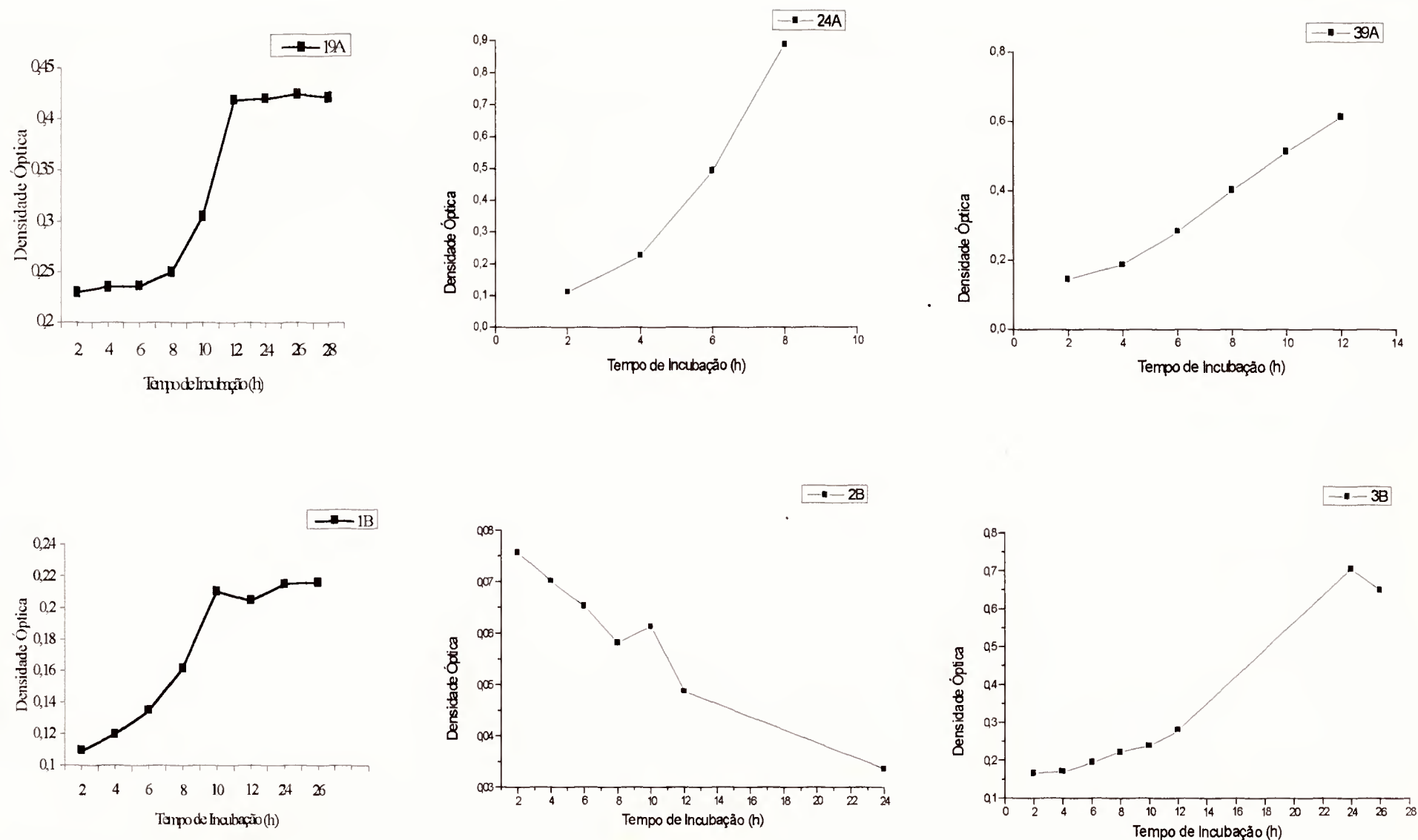


Figura 9 – Representação da curva de crescimento celular das culturas selecionadas, pela leitura da densidade óptica (520 nm) em espectrofotômetro, durante tempo de incubação de até 48 horas, a 30°C e 200 rpm.

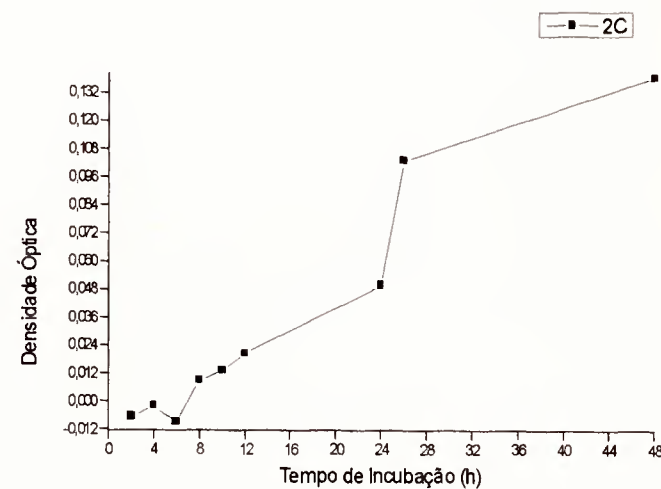
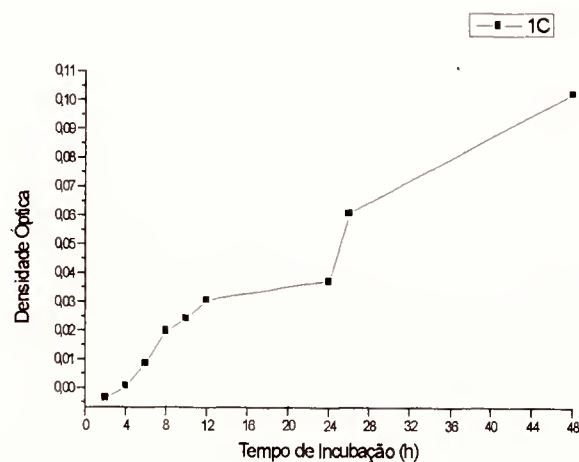
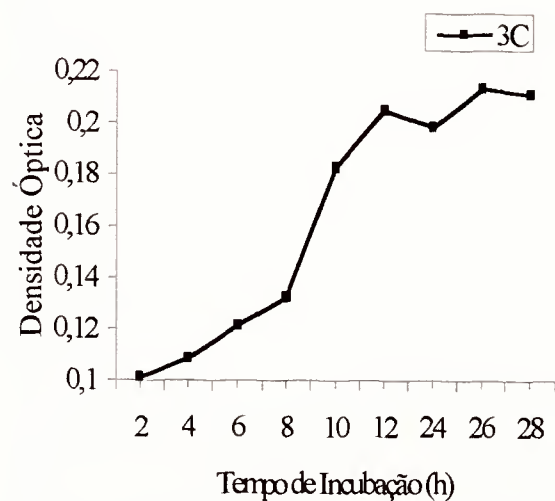
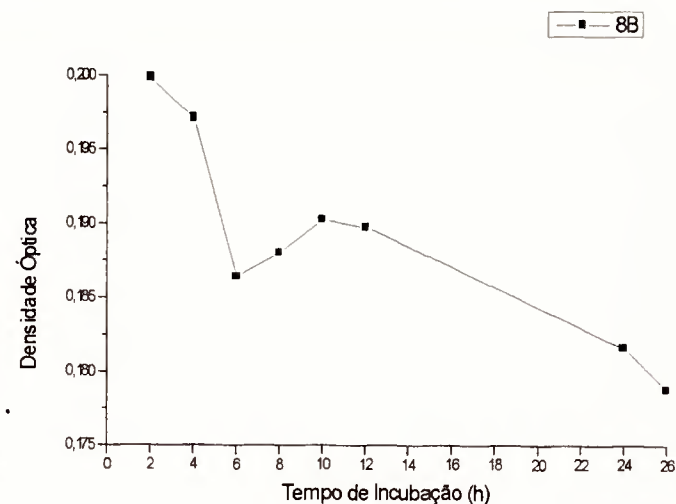
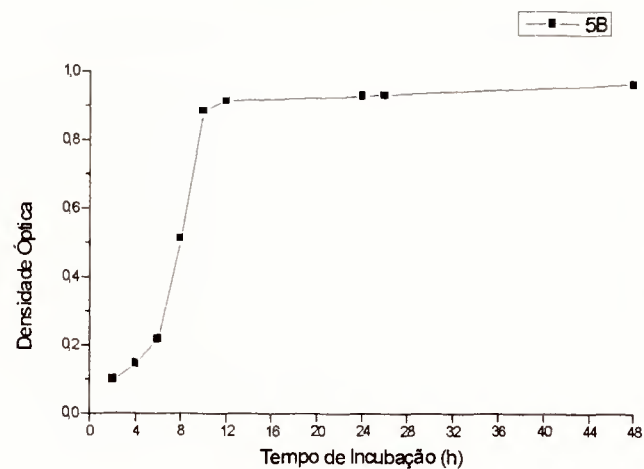
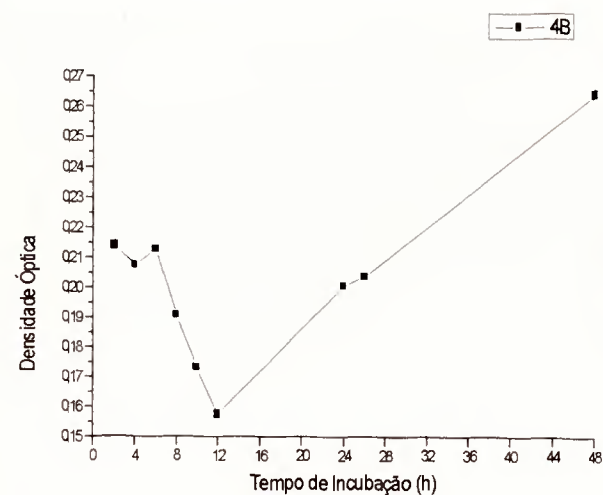


Figura 9 – (continuação).

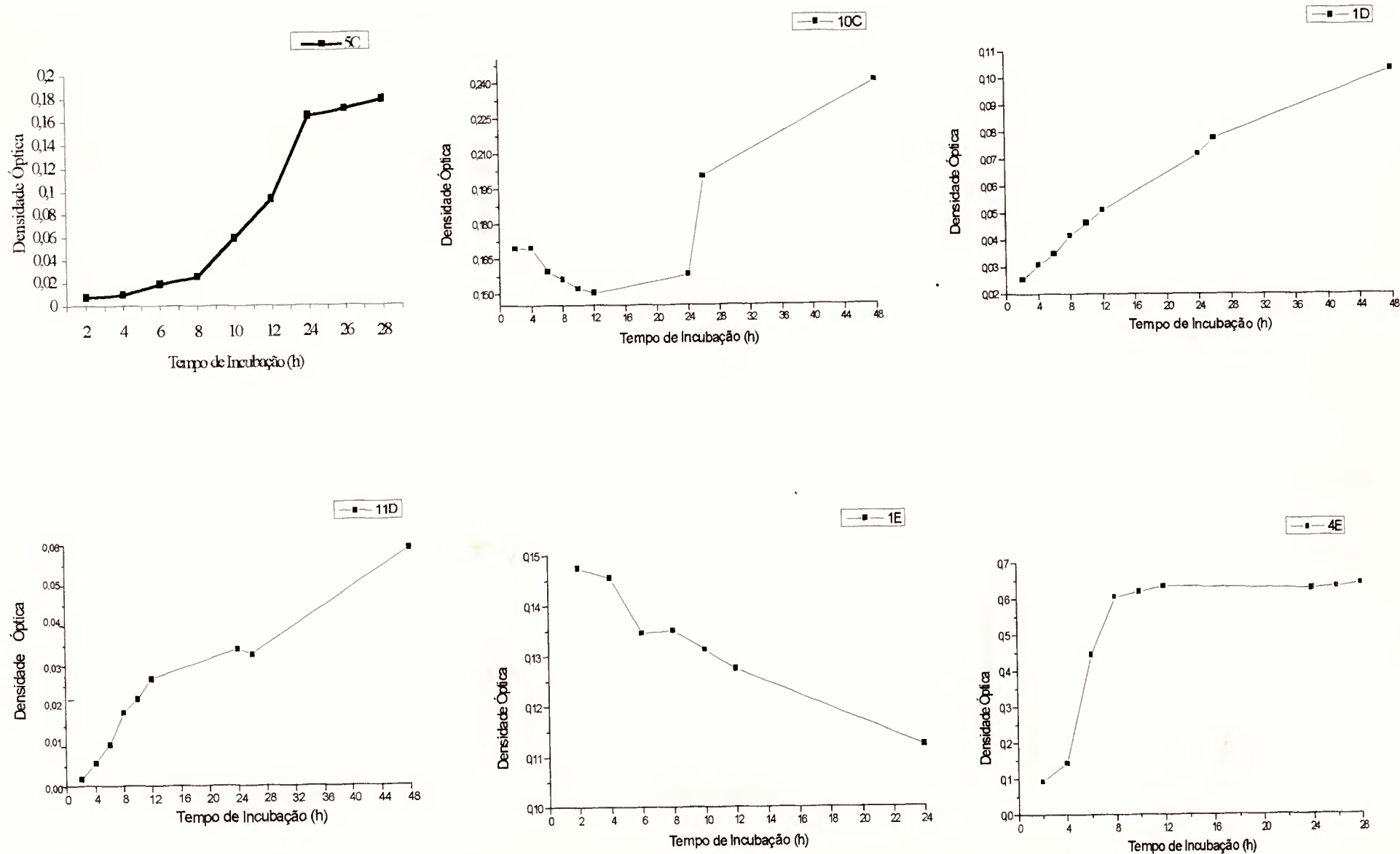


Figura 9 – (continuação).

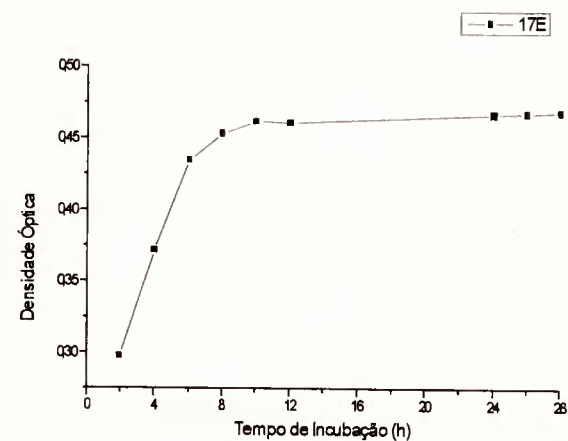
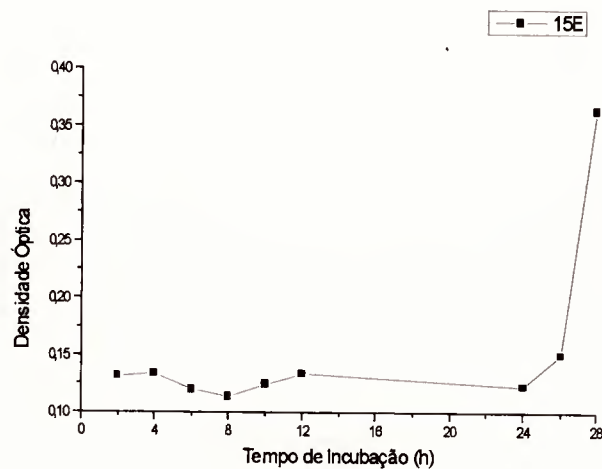
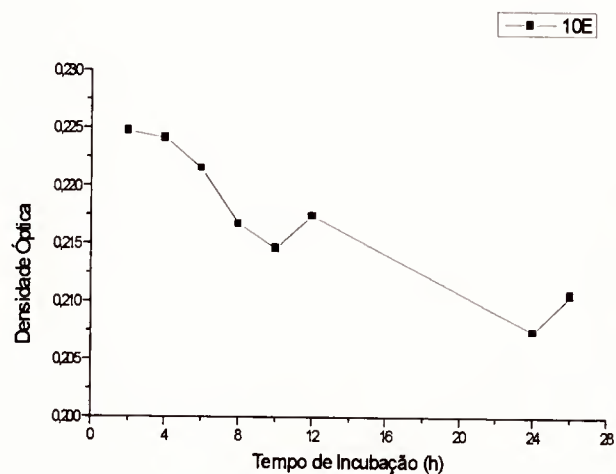
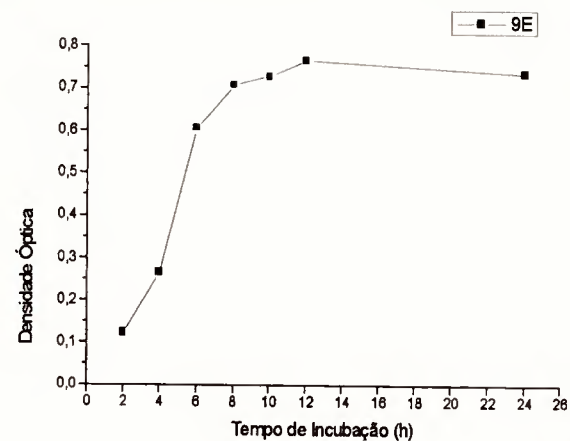
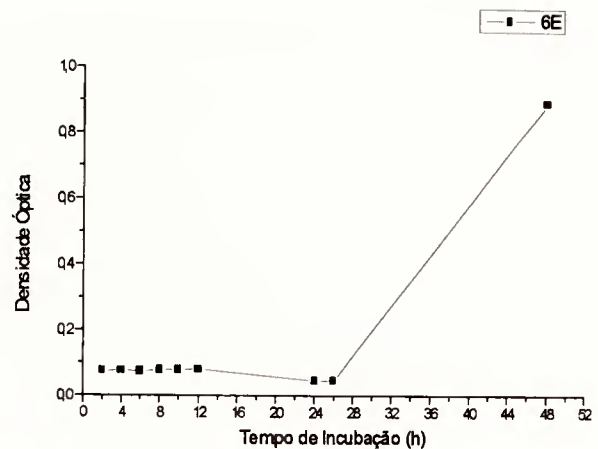
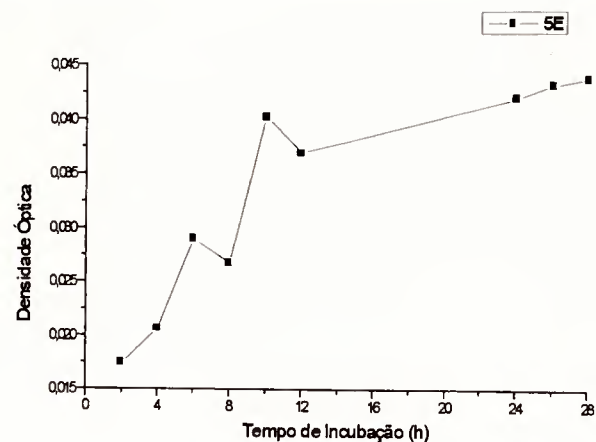


Figura 9 – (continuação).

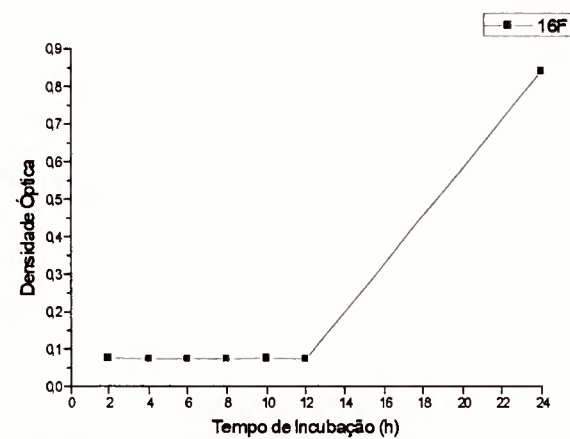
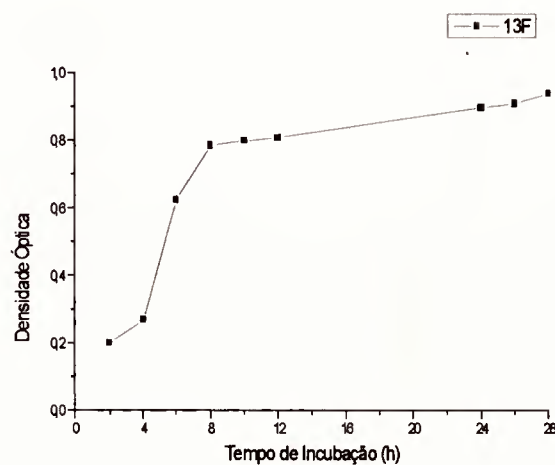
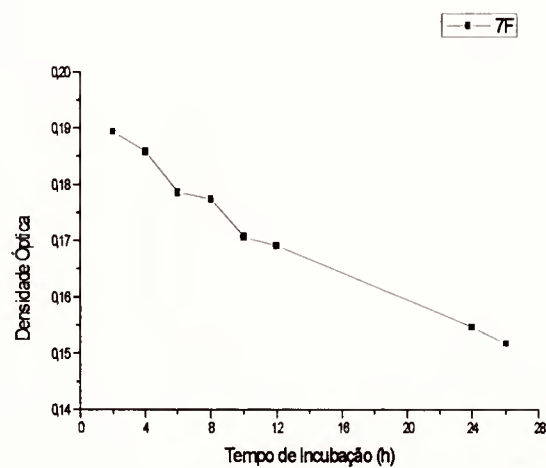
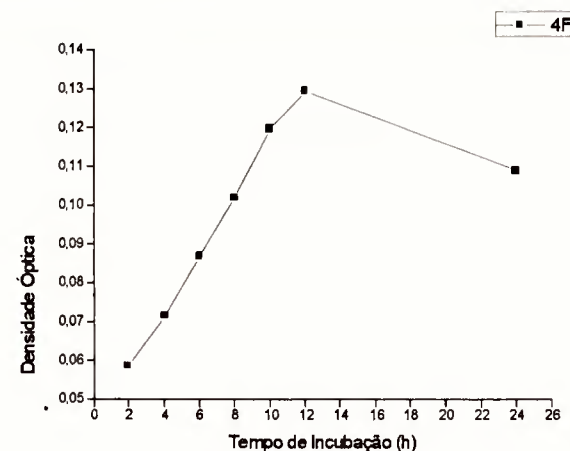
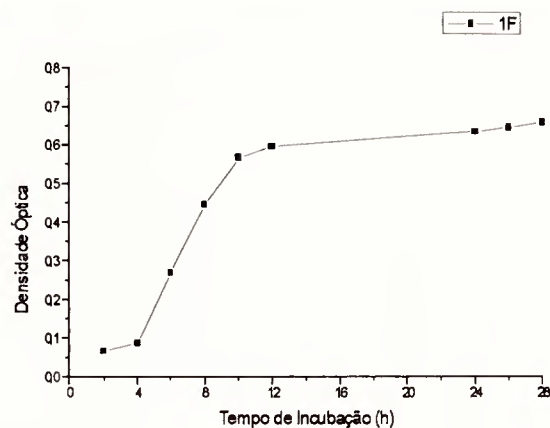
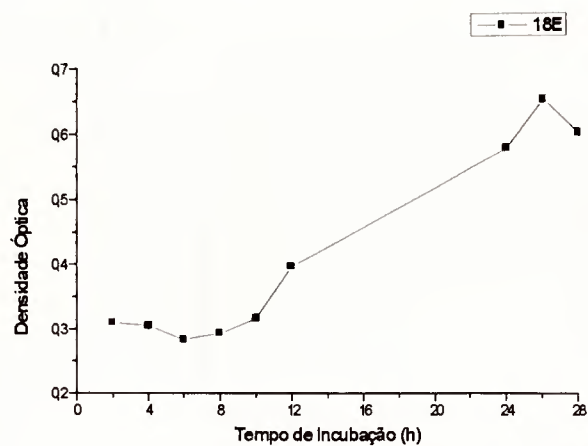


Figura 9 – (continuação).

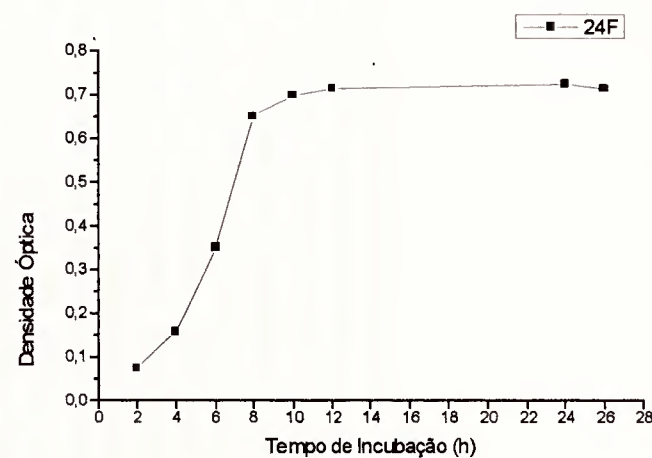
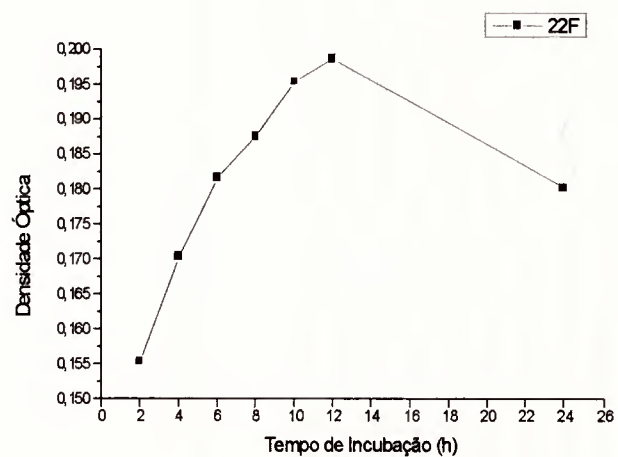
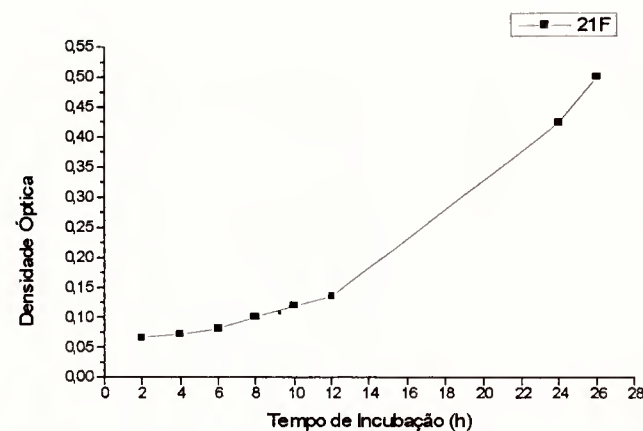
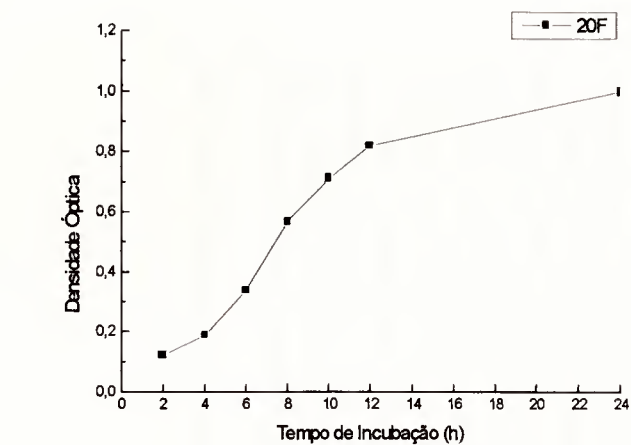


Figura 9 – (continuação).

QUEIROZ, G. M. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from plants rhizosphere. São José do Rio Preto, 2001. 116p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

A lot of bacteria are known by producing exopolysaccharides that can be excreted in the growth medium or stay adhered to the bacterial cellular wall, like a capsular exopolysaccharide. The microbial polysaccharides present several advantages in relation of algae and plants hydrocolloids. Xanthan and gellan microbial gums used in foods were approved by the Food and Drug Administration (FDA). The objectives of this research were the isolation and identification of polysaccharide-producing microorganisms and the production parameters optimization, in function of the carbon source, and the effects of such environmental conditions as pH and temperature. Six plants rhizosphere samples were collected of the Reserva Ecológica do Noroeste Paulista. A total of 122 shinning and gummy colonies were isolated and they were possible polysaccharides-producing microorganisms. The 38 bacteria were selected based on the fast growth and then, submitted to biochemical tests for characterization. These bacteria were contained in the following genera: *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Terrabacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. The cultures were submitted to the fermentation for the determination of viscosity and cellular growth. Three cultures, denominated 10D, 13D and 10F, belonging to the genus *Pseudomonas*, were selected for the polysaccharides production. Studies with these three cultures were accomplished for the determination of polysaccharide production parameters in function of the carbon source added, glucose or sucrose, in the concentrations 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 and 5,0% (p/v). The influence of different incubation temperature (25, 30 and 35°C) and pH (5,0; 6,0; 7,0 and 8,0) of the growth medium were studied. The results indicated that both glucose and sucrose were good substrate for the polysaccharide production. The concentration of 1,0% of the sugar provided the best yield. The polysaccharide production was stimulated at 25°C for the cultures 13D and 10F and at 30°C for the culture 10D. The initial pH 7,0 provided the best polysaccharides production.

Key words: Isolation, characterization, bacterium, rhizosphere, polysaccharide.



