

## PRODUÇÃO E COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE BIOPOLÍMEROS PRODUZIDOS POR RIZÓBIOS E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Maria do Carmo Silva Barreto<sup>1\*</sup>; Márcia do Vale Barreto Figueiredo<sup>2</sup>; Hélio Almeida Burity<sup>3</sup>;  
Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva<sup>4</sup>; José Luiz de Lima-Filho<sup>5</sup>.

### RESUMO

Os biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. A produção de exopolissacarídeos (EPSs) microbianos tem sido objeto de intensa pesquisa, pelo seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores. No entanto, os polissacarídeos sintetizados por bactérias do grupo *Rhizobium*, tem sido estudados na tentativa de melhor compreender sua participação na simbiose leguminosa x *Rhizobium*. O trabalho teve por objetivo avaliar a produção e a viscosidade de biopolímeros, obtidos de oito isolados de *Rhizobium* sp. e uma estirpe padrão *Rhizobium tropici* (CIAT 899) em diferentes tempos de cultivo, assim como determinar a caracterização genotípica. Os resultados mostraram que os isolados 3, 14 e CIAT 899 apresentaram maior produtividade (1,3; 1,7 e 2 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) e as viscosidades aparente dos isolados 3, 16 e CIAT 899 apresentaram os maiores valores, em 168 horas de processo. Análises realizadas com os marcadores REP e ERIC permitiram gerar informações sobre a diversidade genética dos isolados estudados.

**Palavras Chave:** Exopolissacarídeos, fermentação, reologia, *Rhizobium* sp.

### ABSTRACT

The biopolymers are polysaccharides of microbial origin, synthesized by bacteria, fungi and yeasts. Production of microbial exopolysaccharides (EPSs) has been the object of intense research by its high potential for application in different sectors. However, the polysaccharides synthesized by bacteria of *Rhizobium* group have been studied in an attempt to better

understand their participation in legume symbiosis x *Rhizobium*. The study had for objective to evaluate the production and the viscosity of biopolymers, obtained from eight isolated of *Rhizobium* sp. and a standard strain of *Rhizobium tropici* (CIAT 899) at different times of cultivation as well as determine the genetic characterization. The results showed that the isolated 3, 14 and CIAT 899 presented higher productivity (1.3, 1.7 and 2 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) and the apparent viscosities of isolated 3, 16 and CIAT 899 showed the highest values in 168 hours of procedure. Analyses performed with the markers REP and ERIC have produced information on the genetic diversity of the isolates studied.

**Key words:** exopolysaccharides, fermentation, rheology, *Rhizobium* sp.

### INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Esses polissacarídeos de cadeia complexa também são conhecidos como gomas devido a sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso.

Um grande número de bactérias conhecidas produz quantidades abundantes de exopolissacarídeos (EPS), particularmente às fitopatogências como *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pectobacterium* sp. e bactérias fixadoras de nitrogênio *Rhizobium* sp., *Beijerinckia* sp. e *Azotobacter* sp. (VERMANI et al. 1995). Destas, os EPS de *Xanthomonas campestris* (xantana), *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (gelana), *Acetobacter xylinum* (celulose) e *Rhizobium* sp. (succinoglucana) estão sendo comercializados (SUTHERLAND 2001).

<sup>1\*</sup>Bióloga, MSc, Instituto Agronômico de Pesquisa Agropecuária – IPA, Laboratório Biologia do Solo, Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, Recife – PE, Brazil. E-mail: mcsbarreto@gmail.com

<sup>2</sup>Bióloga, Dra, Instituto Agronômico de Pesquisa Agropecuária – IPA, Laboratório Biologia do Solo, Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, Recife – PE, Brazil.

<sup>3</sup>Eng. Agrônomo, PhD, Instituto Agronômico de Pesquisa Agropecuária – IPA, Laboratório Biologia do Solo, Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, Recife – PE, Brazil.

<sup>4</sup>Bióloga, Dra, Instituto Agronômico de Pesquisa Agropecuária – IPA, Laboratório Biologia do Solo, Av. Gal. San Martin, 1371, Bongi, Recife – PE, Brazil.

<sup>5</sup>Médico, PhD, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, Brazil.

(Recebido para Publicação em 12/02/2010, Aprovado em 07/07/2010)

Segundo COSTERTON (1987), os EPS possibilitam vida livre à bactéria, permitindo a aderência e colonização à superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam. Esses exopolissacarídeos envolvem as membranas das células protegendo-as do dessecamento e outros estresses ambientais, além de poder ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximo a bactéria (SUTHERLAND 1988 e WHITFIELD 1988). Os EPS podem ser homopolímeros ou heteropolímeros e possuem uma variedade de substituintes não carboidratados. Entre os homopolímeros encontrados em bactérias que interagem com plantas, as mais comuns são as glucanas periplasmáticas  $\beta$  (1-2) que estão presentes em *Rhizobiaceae* (OTOBONI 2001).

Os polissacarídeos bacterianos hidrossolúveis vêm sendo utilizados pelas indústrias como emulsificantes, estabilizantes, espessantes, agentes de suspensão e dependendo de sua natureza química, as gomas microbianas podem também ser empregadas como promotoras de gelificação. No entanto os polissacarídeos sintetizados por bactérias do gênero *Rhizobium*, tais como succinoglicanas e galactoglucanas (ZEVENHUIZEN 1997 e YOUNES et al. 2000) têm sido estudados na tentativa de melhor compreender sua participação na simbiose.

A produção de EPS microbianos tem sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores, pois não se encontra exposta às alterações climáticas ou a problemas nas colheitas, que prejudicam a oferta e alteram o custo de produção das gomas tradicionais. No processo de produção de polissacarídeos deve-se considerar desde o microrganismo em estudo até a determinação dos parâmetros de agitação, tempo de incubação, excesso ou ausência de carboidratos e volume de inóculo, onde se destaca o meio de produção e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos EPS (FARIA 2002).

Na literatura estão descritos vários meios de produção, entretanto a composição qualitativa é a mesma, e, cada suplemento, apresenta uma determinada função na produção de polissacarídeo. Basicamente, os meios para produção de polissacarídeos apresentam uma fonte de fósforo e potássio e nitrogênio (sulfato de amônio) em concentrações adequadas para o crescimento do microrganismo; uma fonte de carbono (glicose, sacarose, manose, frutose e outras) como reserva energética e ainda oligoelementos como  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{K}^{1+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e outros, os quais têm um papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção do polissacarídeo (MARTINS et al. 1990; WONG 1993; MADI et al. 1997).

Soluções de biopolímeros bacterianos com propriedades reológicas interessantes do ponto de vista industrial geralmente exibem propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas e tensão residual elevada (SUTHERLAND 2001), porém a viscosidade aparente do caldo de fermentação era o parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do biopolímero (BUENO & GARCIA-CRUZ 2000). Dos parâmetros que interferem na viscosidade dos polímeros, pode-se citar o tipo de estrutura molecular e concentração de polímero. A viscosidade da solução aquosa de um polissacarídeo está diretamente relacionada com a rigidez de sua molécula que, por sua vez, depende da sua estrutura, principalmente primária e secundária, a qual está diretamente relacionada à bactéria utilizada e às condições operacionais do processo (BRADSHAW et al. 1983).

A seleção de microrganismos que produzam polissacarídeos com propriedades funcionais

economicamente interessantes, bem como, os estudos para otimizar o rendimento e a produtividade dos processos fermentativos na obtenção destes é um desafio constante (BOZA 2002). A seleção da linhagem deveria ser o primeiro passo quando é tentado um processo específico de produção.

Um método alternativo, para selecionar linhagens é a caracterização via PCR, técnica pela qual os moldes correspondem as sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) e ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) os quais mapeam o genoma de variedades de bactérias Gram-negativas (VERSALOVIC et al., 1991). REP e ERIC são sequências centrais repetidas e conservadas dentro do genoma de uma bactéria. A amplificação, por PCR, das regiões genômicas como REP ou ERIC (VERSALOVIC et al. 1991) produz uma coleção de fragmentos distintos no gel de agarose, fazendo o processo de caracterização de cepas simples e rápido (JUDD & SADOWSKY, 1993).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção e viscosidade de EPSs, obtidos de oito isolados de *Rhizobium* sp. comparados com a estirpe padrão *Rhizobium tropici* (CIAT 899) em diferentes tempos de cultivo, e determinar se as seqüências REP e ERIC estão presentes no genoma dos isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

Foram utilizadas oito bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, (isoladas da região do sertão de Pernambuco – Araripina) do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, resistentes a alta temperatura e formadoras de goma e uma estirpes padrão *Rhizobium tropici* (CIAT 899) obtidas do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia - CNPAB/ EMBRAPA.

### Inóculo

As culturas foram incubadas em placas a 28 °C, por 48 horas, em estufa e estocadas a  $\pm 4$  °C, em meio YNA. A partir dessas culturas os experimentos foram conduzidos em duas etapas. Primeiro preparou-se uma suspensão bacteriana, partindo de uma alçada de cultura crescida em meio YM modificado e incubada em estufa por 48 h a  $28 \pm 1$  °C. Transcorrido este período, transferiu-se de maneira asséptica 2,5 % (v/v) da cultura, que serviu como inóculo para a fermentação em 96 e 168 horas de crescimento. Esta foi realizada em Erlenmeyer de 250 mL, com 80 mL de meio de produção, contendo em  $\text{g.L}^{-1}$ : 30 g de sacarose; 0,4 g de Extrato de Levedura; 1 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 10 %; 4 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 10 %; 2 mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 %; 1 mL de NaCl a 10 % (VINCENT, 1970), incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a  $28 \pm 1$  °C.

### Produção e recuperação de biopolímero

A produção total dos biopolímeros [ $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ ] obtidos nos diferentes tempos de cultivo foram avaliados pela massa do produto seco por volume de meio YM modificado, em incubadora refrigerada com agitação Modelo TE-421 TECNAL. A quantidade produzida de EPS durante a fermentação foi determinada através da técnica da massa

seca. Álcool etílico P.A. foi adicionado ao mosto fermentado até atingir a concentração de 80 % na solução hidroalcoólica formada. Após a total precipitação do EPS presente no meio fermentado foi realizada a secagem do produto em dessecador à temperatura 30 °C, até peso constante. Todas as determinações foram efetuadas em triplicata.

### Viscosidade

A qualidade do biopolímero produzido foi determinada em um viscosímetro rotacional Brookfield, modelo RVT, com spindle 2, a 20 °C, nas taxas de deformação de 10, 20, 50 e 100 rpm, acoplados a um banho-maria termostatizado, modelo TE-184 TECNAL. Foram determinadas as viscosidades aparentes e a avaliação do comportamento pseudoplástico. As equações e procedimentos específicos aplicados para os cálculos das taxas de cisalhamento em função da rotação aplicada no material foram obtidos através dos métodos verificados por MITSCHKA (1982) citado por MORAIS (1999) para reômetros deste modelo (RV).

### Caracterização Genética

Para a extração do DNA genômico, os isolados foram crescidos em meio de cultura TY líquido (BERINGER, 1974). Para extração do DNA, foi utilizado o Kit Purilink Genomic DNA (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. Para amplificação do elemento REP foi usado os *primers* REP-1 forward (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP-2 reverse (5'-ICGICTATCIGGCCTAC-3') e para o elemento ERIC os *primers* utilizados foram: ERIC-1 forward (5'-ATGTAAGTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC-2 reverse (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). As reações de amplificação para cada *primers* (REP e ERIC) com um volume final de 25µL foram: Água ultra pura 13,7µL; tampão 10X 2,5 µL; dNTPs Mix (10mM) 2,5 µL; primer 1 forward 1 µL; primer 2 reverse 1 µL; 0,3 µL de Taq polimerase (3U) (Pharmacia); DNA genômico 2 µL. As reações foram efetuadas num termociclador MJ Research Thermocycler, modelo PTC 100.

Os padrões de bandas geradas pela análise de PCR foram comparadas para determinar a relação genética dos isolados com a estirpe padrão (CIAT 899). As similaridades genéticas foram estimadas usando o coeficiente de "Simple Matching (SM)". Os dendrogramas foram construídos no programa NTSYS-pc usando a opção UPGMA (Unweightes Pair-Group Method, Arithmetic Average).

### Análise estatística

ANOVA foi aplicada em conformidade com um modelo matemático associado ao esquema experimental (STEEL &

TORRIE 1960), utilizando Soft Estatística (Statsoft Inc., Tulsa) e os efeitos foram avaliados pelo F- teste. O erro-padrão foi estimado e as comparações das médias foram avaliadas ( $P < 0,01$ ) utilizando Tukey HSD.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção de biopolímero

A Tabela 1 apresenta a produção média ( $\text{g.L}^{-1}$ ) das fermentações realizadas em triplicata, para a produção do biopolímero, durante 96 e 168 horas de cultivo para os oito isolados e da estirpe padrão CIAT 899, bem como, a média do grupo de experimento das mesmas. Nesta tabela observa-se que, a produção máxima no período de 168 horas de processo ocorreu para todas as estirpes, e que, a bactéria CIAT 899 (padrão) apresentou a maior produção, seguido dos isolados 14, 16 e 3 que apresentaram produções superiores aos demais isolados estudados e, pelo Teste de Tukey, estes apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,01$  em relação à produção), indicando que com o aumento do tempo (168 horas) ocorre um aumento da produção de exaplossicarídeo, demonstrando que a adição de 30g de sacarose e agitação de 200 rpm, para as 168 horas a temperatura de 28 °C é a condição maximizada para a produção do biopolímero realizada neste estudo.

Entretanto, sabe-se que a produção é influenciada pela linhagem do microrganismo, tempo e meio de fermentação (ANTUNES et al. 2000; SOUZA & VENDRUSCOLO 2000; TORRES et al. 1993). Neste estudo, a fonte de carbono utilizada como substrato foi à sacarose que é bastante utilizada em experimentos de fermentação. As fermentações foram realizadas com o meio de produção elaborado a partir do meio YM (VINCENT, 1970), na concentração de 3% de sacarose, em vez de 1% como citado no meio, com o intuito de incrementar a produção das linhagens testadas.

As bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de utilizar uma ampla gama de produtos como fontes de carbono. A literatura cita cultivos com glicose, galactose, frutose, arabinose, xilose, ramnose, maltose, sacarose, lactose, trealose, rafinose, manitol, furamato, malato, succinato, citrato e piruvato (JORDAN, 1984). De todos estes produtos, a sacarose é o de mais fácil obtenção e mais vantajoso economicamente. Segundo SUTHERLAND (2002) aglicose e sacarose são usadas como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros. O rendimento da conversão de sacarose em células pelo *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* oscila entre 0,4 e 0,5 g de células por grama de sacarose (BOIARDI, 1983; BALATTI, 1992; IPT, 1993a).

**Tabela 1.** Dados médios das análises individuais e do grupo de experimento da produção de biopolímeros por *Rhizobium* sp.

Bactérias	Produção (g.L <sup>-1</sup> ) 96 horas	Produção (g.L <sup>-1</sup> ) 168 horas
CIAT 899	1,2520 a	1,8542 a
ISOL 14	1,0575 ab	1,6608 ab
ISOL 16	0,8237 bc	1,3225 bc
ISOL 3	0,8825 bc	1,1746 cd
ISOL 11	0,6241 cd	0,8463 d
ISOL 4	0,4958 de	0,9429 cd
ISOL 6	0,4029 def	0,8479 d
ISOL 2	0,2162 ef	0,3217 e
ISOL 1	0,1229 f	0,2779 e

As médias (3 repetições) seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,01)

O tempo de fermentação, que também é outro fator limitante, para esse estudo foi fixado em dois tempos, 96 e 168 horas, pois em estudos prévios foi observado que em 96 horas a curva permanecia ascendente para a produção.

PADILHA (2003) também verificou que os resultados de fermentação obtidos em duas linhagens de *Xanthomonas* demonstraram a influência do tempo de incubação na produção do biopolímero, onde a linhagem *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289 apresentou maior concentração em ambas as condições testadas, 72 e 96 horas, 6,9 g.L<sup>-1</sup> e 7,9 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, em relação à linhagem de *X. campestris* pv. *campestris* CA110 que produziu 6,3 g.L<sup>-1</sup> e 6,8 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

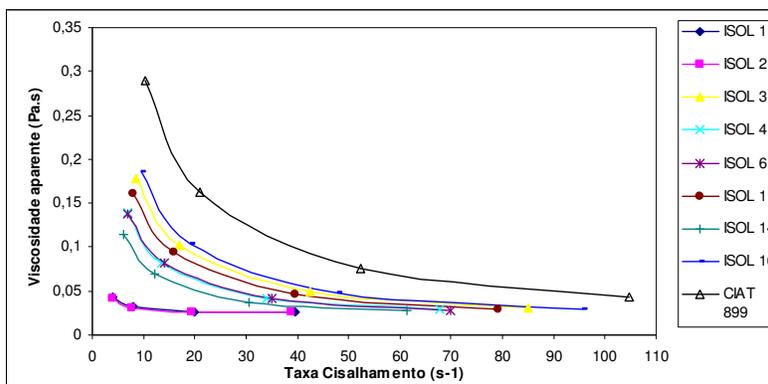
Após a fermentação, os biopolímeros foram recuperados e avaliados visualmente, para verificar as diferenças quanto à coloração e estrutura das duas estirpes, maiores produtoras de goma (CIAT 899 e ISOL 14) após a precipitação com etanol. Quanto à coloração, não foi detectada pigmentação nas gomas obtidas.

#### Viscosidade aparente

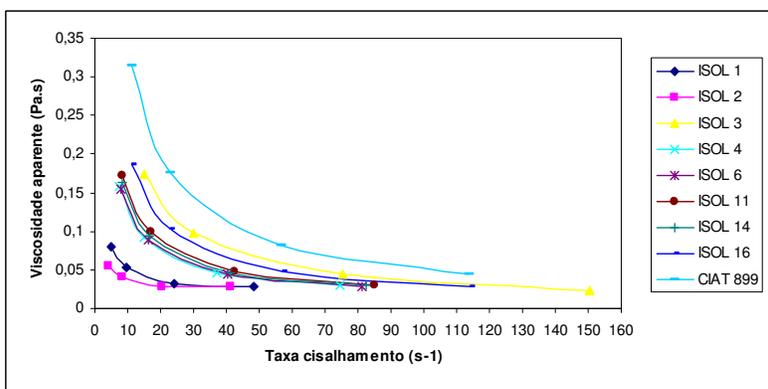
As propriedades reológicas foram avaliadas através da análise de viscosidade aparente, para verificar a qualidade dos EPSs produzidos, demonstrando o comportamento da solução aquosa do polímero na temperatura de 20 °C, comparando-se nos tempos de fermentação de 96 e 168 horas.

Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 1 e 2, onde as soluções das gomas apresentaram comportamento pseudoplástico, isto é, a viscosidade aparente decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento. De acordo com a literatura, esse comportamento tem sido encontrado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (AMANULLAH et al. 1996; CACIK et al. 2001; PADILHA 2003).

Através dos gráficos comparativos entre as leituras de viscosidade aparente das soluções aquosas das diferentes gomas produzidas, pode-se visualizar que o CIAT 899, ISOL 16 e ISOL 3 apresentaram os valores de viscosidade mais elevados em ambos os tempos de processo, porém, em 168 horas as viscosidades tiveram um aumento comparando-se a 96 horas (Figura 1 e 2).



**Figura 1.** Variação da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento de soluções aquosas de EPS 2,5 % (v/v) de oito isolados de *Rhizobium* e uma estirpe padrão CIAT 899 a 20 °C com tempo de fermentação de 96 h, determinada com viscosímetro rotacional Brookfield (modelo RVT).



**Figura 2.** Variação da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento de soluções aquosas de EPS 2,5 % (v/v) de oito isolados de *Rhizobium* e uma estirpe padrão CIAT 899 a 20 °C com tempo de fermentação de 168 h, determinada com viscosímetro rotacional Brookfield (modelo RVT).

A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento é uma característica comum aos biopolímeros bacterianos. BEYER et al (1987) observaram que em soluções a 1% do polissacarídeo produzido por *Rhizobium* CB744 medidas a 25 °C e 65 °C, também houve um decréscimo da viscosidade com taxa de cisalhamento e temperatura. VENDRUSCOLO (1995) estudou o comportamento reológico das soluções aquosas a 6 % do biopolímero *Beijerinckia* 7070, produzido por fermentação com meio de cultura VIII contendo 5 % de sacarose, medido nas temperaturas de 25, 45 e 65 °C. Verificou que a viscosidade é dependente da temperatura e que decresce com o aumento desta, porém, o biopolímero recupera as suas características reológicas quando a viscosidade é medida novamente na temperatura inicial, no caso 25 °C.

Em estudo realizado por BUENO & GARCIA-CRUZ (2000) com a bactéria do gênero *Pseudomonas*, foi verificada a influência do tempo de cultivo em 24, 48 e 72 horas, utilizando-se dois caldos de fermentação diferentes. Em um caldo, a fonte de carbono utilizada foi à glicose e no

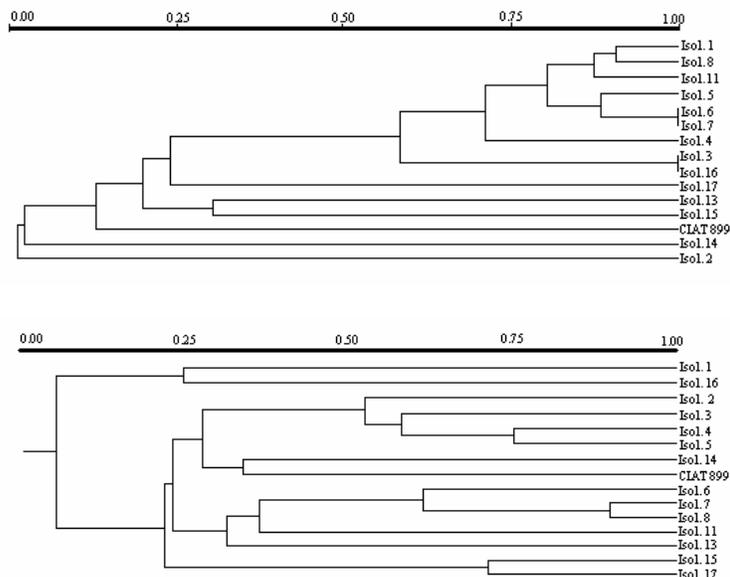
outro, a sacarose na concentração de 2,0 %. Os biopolímeros apresentaram comportamento pseudoplástico e

a maior viscosidade aparente obtida foi em 72 horas de cultivo. O meio contendo sacarose produziu fluidos mais viscosos em 24 e 48 horas e o meio de cultura contendo glicose produziu fluidos mais viscosos somente após 72 horas de cultivo.

As propriedades reológicas de um biopolímero devem ser estáveis durante mudanças na temperatura, pH e força iônica. O conhecimento sobre as propriedades dos biopolímeros, principalmente, a viscosidade e o comportamento reológico são importantes para futuras aplicações industriais, refletem sua estrutura química primária e servem para predizer em quais produtos podem ser utilizados (SCAMPARINI et al. 1997).

### Caracterização Genética

De acordo com os dendrogramas, as relações genéticas existentes entre os genótipos analisados indicam claramente que os mesmos podem ser divididos em diferentes grupos, a partir dos padrões revelados pelos “primers” REP (Figura 3a) e ERIC (Figura 3b).



**Figura 3.** Agrupamento das sequências REP (a) e ERIC (b) de isolados de *rhizobium*, com determinação de similaridade pelo coeficiente Simple Matching (SM) e método de agrupamento UPGMA.

Os padrões do produto da PCR gerados a partir do “primer” REP (Figura 3a) permitiram agrupar os isolados em um grande grupo com a formação de subgrupos de 4ª geração, devido exclusivamente à presença do isolado 14 que apresentou uma grande divergência dos demais isolados estudados e a estirpe padrão de *Rhizobium tropici* (CIAT 899). Os padrões do “primer” ERIC (Figura 3b) revelam a formação de 2 grupos. O grupo I formado exclusivamente pelos isolados 1 e 16 que apresentaram um grau de similaridade de 0,25 (25,0%). O grupo II, representado pelos demais isolados e o CIAT 899 mostra resultados que indicam a formação de 4 subgrupos que são geneticamente mais semelhantes entre si.

### CONCLUSÕES

- A produção obtida nessa condição foi  $1,85 \text{ g.L}^{-1}$  para a estirpe CIAT 899;  $1,66 \text{ g.L}^{-1}$  para o ISOL 14 e  $1,32 \text{ g.L}^{-1}$  para o ISOL 16;
- Os biopolímeros sintetizados por *Rhizobium sp* apresentaram comportamento reológico característico de soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos, apresentando os valores mais elevados de viscosidade aparente para CIAT 899, isolado 3 e 16, respectivamente.
- Estudos viscosimétricos das soluções do polissacarídeo revelaram comportamento pseudoplástico, mesmo em baixas concentrações.

- Os marcadores REP e ERIC permitiram gerar informações sobre a diversidade genética dos isolados estudados, o que

contribuirá para estudos futuros das relações filogenéticas entre os mesmos.

### REFERENCIAS

- AMANULLAH A, SERRANO LC, GALINDO E, NIENOW AW. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, New York, v.12, p. 466-473, 1996.
- ANTUNES AEC, MOREIRA AS, VENDRUSCOLO JLS, VENDRUSCOLO, CT. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv Pruni. **Ciência e Engenharia** v.9, n. 1, p. 83-87, 2000.
- BALATTI A.P. Producción de inoculantes para leguminosas. La Pampa: Facultad de Ciências Exactas Y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa, 1992. 152p
- BERINGER, J.E.R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **J. Gen Microbiol**, v. 84, p.188-198, 1974.
- BOIARDI J.L; BALATTI A.P; MAZZA L.A. Cultivos de *Rhizobium phaseoli* en sistema sumergido. **Rev. Fac. Agron.** v. 4, p.19-27, 1983.
- BOZA Y.E.A.G. Encapsulamento *Beijerinckia sp* utilizando Spray-drier. Departamento de Ciência de alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas 2002.
- BUENO S. M; GARCIA-CRUZ C.H. Influência do tempo de fermentação e presença de sais na reologia do caldo de fermentação de uma bactéria do gênero *Pseudomonas* isolada do solo. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos** Fortaleza. Livro de resumos...Fortaleza, 2000. Cap. 17. p. 9-47.

BRADSHAW I.J, NISBET B.A; KERR M.H; SUTHERLAND I.W. Modifield xanthan: its preparation and viscosity. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.3, p. 23-38, 1983.

CACIK, F; DONDO R.G; MARQUES, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering**, [S. l.] v.25, p. 409-418, 2001.

COSTERTON I.W. Bactrial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology** v. 41, p. 435-464, 1987.

FARIA L.H.B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias Isoladas de amostras do solo**. São José do Rio Preto, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas, Universidade Estadual Paulista.

JORDAN D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J.G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984. P.235-244.

JUDD, A.K.; SADOWSKY, M.J. The *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 hyperreiterated DNA region, HRS1, HasDNA and aminoacid sequence homology to IS 1380, na insertion sequence from *Acetobacter pasteurianus*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.59 n.6, p. 1656-1661, 1993.

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

MARTINS L.O; BRITO L.C; SÁ-CORREIA, I. Roles of Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York v. 12, p.794-799, 1990.

OTOBONI A.M.M.B. **Determinação da composição dos exopolissacarídeos em diferentes isolados de *Xylella fastidiosa* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. Jaboticabal. 2001. 82p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista,

PADILHA, F.F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microrganismos**. 2003. 99 p. Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas

SCAMPARINI A.R.P. Modification of xanthangum. In: WOLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY Toronto. Abstracts...Toronto,1991. V. 8. P.177.

SCAMPARINI, A; MARIUZZO, D; FUJIHARA, H; JACOBUSI, R; VENDRUSCOLO, C. Structural Studies of CV-70 Polysaccharide. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 115-121, 1997.

SOUZA, A.S; Vendruscolo, C.T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* cepas 24 e 58. *Ciência e Engenharia*.v. 8, n. 2, p.115-123, 2000.

SUTHERLAND, I.W. Bacterial surface polysaccharides structure and function. **International Review of Cytology**, v.113, p.187-231, 1988.

SUTHERLAND I.W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, Barking v.11, p. 663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, [S.l.] v. 29, p. 70-71, 2002.

TORRES, L.G; BRITO, E; GALINDO, E; CHOPIN, L. Viscous behaviour of Xanthan Aqueous solutions from a variant of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 58-64, 1993.

VINCENT J.M. **A manual for the practical study of the root nodule bacteric**. Oxford, Scientific Publications; (Inst. Biol. E Coq. Handbook, 15) 1970. 163p.

VENDRUSCOLO, C.T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. isolado do solo da região de Ribeirão Preto – SP, Brasil**. Campinas,1995. 143p. Tese – Universidade Estadual de Campinas.

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**, Osaka , v.80, n. 6, p. 599-602, 1995.

VERSALOVIC, J; KOEUTH, T; LUPSKI, J.R.. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p. 6823-6831, 1991.

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

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal Microbiology**, v.34, p. 415-420, 1988.

YOUNES, A; ACHOUAK, W; MAROL, C; HEULIN, T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. **Applied and Environmental Microbiology**, August v. 66, n. 8, p.3393-3398, 2000.

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