

BEATRIZ STINGLIN LOTH

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE
EXOPOLISSACARÍDEOS**

Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito obrigatório da disciplina de Estágio em Bioquímica, para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas. Sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar Ferreira e Co- orientação do Prof. Dr. Marcello Iacomini.

CURITIBA
2001

BEATRIZ STINGLIN LOTH

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE
EXOPOLISSACARÍDEOS**

Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito obrigatório da disciplina de Estágio em Bioquímica, para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas. Sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar Ferreira e Co- orientação do Prof. Dr. Marcello Iacomini.

CURITIBA
2001

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Julio Cesar Ferreira pelo seu incentivo, apoio, amizade, experiência e confiança.

Ao meu co- orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini pelo apoio técnico.

À professora Ida Pimentel e a aluna Flávia Sejas do Departamento de Patologia pelo auxílio nas colorações de Gram.

À aluna de iniciação Fabiana De Toni pelo auxílio nas análises cromatográficas.

À Nanci da secretaria do Departamento de Bioquímica da UFPR pela ajuda de sempre.

Ao Raphael Ernani Rigoti pelas fotos dos microrganismos.

Ao laboratório do grupo de Química de Carboidratos pelo acesso e empréstimo de materiais e equipamentos.

Ao meu pai e irmão, pelo amor, incentivo e respeito.

A minha tia Maria da Graça Stinglin de Araújo, pelo apoio, amizade e confiança.

A UFPR- TN pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS.....	2
1.2. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS EXOPOLISSACARÍDEOS.....	4
1.3. EXOPOLISSACARÍDEOS E PATOGENICIDADE.....	5
1.4. EXOPOLISSACARÍDEOS E BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	5
1.5. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS EXOPOLISSACARÍDEOS.....	6
1.6.OBJETIVOS.....	9
2.MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1.MEIOS UTILIZADOS PARA O ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE EPSs.....	10
2.1.1. Bold's Mineral Medium.....	10
2.1.2. Gelose Czapeck-Dox.....	10
2.2.MATERIAIS.....	11
2.3. MÉTODOS.....	11
2.3.1. Isolamento de Microrganismos Produtores de EPSs.....	11
2.3.2. Cultivo dos Isolados.....	12
2.3.3. Armazenamento dos Isolados.....	12
2.3.4. Crescimento em Diferentes Fontes de Carbono.....	12
2.3.5. Extração e Obtenção dos EPSs.....	12
2.3.6. Método de Gram.....	12
2.3.7. Métodos Cromatográficos. para Caracterização Estrutural dos EPSs.....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4. CONCLUSÕES	18
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Placas de petri da fase de purificação de microrganismos para a obtenção de colônias isoladas.....	14
FIGURA 2: Colônia isolada de microrganismo produtor de EPSs (aspecto viscoso e brilhante) armazenada em tubo de ensaio.....	15

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Identificação Preliminar dos Microrganismos Isolados.....	16
TABELA 2: Composição Monossacarídica dos EPSs dos Microrganismos Isolados.....	17

RESUMO

Alguns exopolissacarídeos (EPSs) são produzidos por microrganismos, que podem ser identificados em meio sólido pelo aspecto viscoso e brilhante das colônias e em meio líquido pelo aumento da viscosidade do meio. Amostras de solo foram inoculadas em meio de cultura definido, sólido, contendo sacarose como única fonte de carbono. Desta maneira, foram obtidas quatro diferentes colônias de bactérias, que apresentaram as características supracitadas de microrganismos produtores de exopolissacarídeos. Essas colônias de bactérias foram diluídas de 10^4 a 10^5 vezes, seguida do plaqueamento das respectivas suspensões em meio Czapeck- Dox contendo sacarose como fonte de carbono para obter colônias isoladas e a conseqüente purificação dos microrganismos. Posteriormente, cada bactéria isolada foi inoculada no mesmo meio sólido, contendo as seguintes fontes de carbono: trealose, maltose e amido, para excluir a possibilidade destes microrganismos isolados serem produtores das enzimas levana-sacarase e dextrana-sacarase que produzem uma levana e uma frutana respectivamente, largamente estudada por outros grupos. Uma vez isoladas, as bactérias foram inoculadas em meio definido, líquido, contendo sacarose como única fonte de carbono, visando-se a produção de exopolissacarídeos em quantidades suficientes para que estes pudessem ser estudados, quanto à sua composição e estrutura. Métodos cromatográficos foram utilizados para a determinação da composição monossacarídica dos isolados.

1. INTRODUÇÃO

O isolamento de microrganismos pode ser feito pela combinação de nutrientes e de condições físicas, químicas ou físico-químicas do meio de cultura. (PERRY; STALEY, 1997). Dentre os nutrientes podem ser testados diferentes fontes de carbono, tais como: carboidratos, aminoácidos, proteínas ou derivados, ácidos carboxílicos etc. Também podem ser testadas várias fontes de nitrogênio, tais como: nitratos, nitritos, amônia, uréia, aminoácidos, proteínas, etc. Como exemplo de condições físicas, químicas e físico-químicas podemos citar o pH, a temperatura de incubação, a oxigenação da cultura, pressão osmótica entre outros parâmetros.

O enriquecimento de cultura para o isolamento de microrganismos é uma técnica utilizada para obtenção de organismos capazes de biodegradar ou sintetizar determinados compostos metabólicos, que possam ser extraídos do meio de cultura, para possíveis estudos. Para isto adiciona-se ou elimina-se do meio de cultura um composto específico. Por exemplo para o isolamento de *Azotobacter*, microrganismo fixador de nitrogênio, elimina-se do meio de cultura as fontes de nitrogênio. Desta maneira, o meio favorecerá o crescimento dos microrganismos que obtém nitrogênio da atmosfera (PERRY; STALEY, 1997).

Exopolissacarídeos (EPSs) são polissacarídeos encontrados no meio extracelular, podendo ser lineares ou ramificados e também homo ou heteropolissacarídeos. Podem ser excretados na forma de mucilagem formando cápsulas em volta das paredes celulares ou serem simplesmente liberados no meio de cultura. Em muitos casos os EPSs excretados podem formar biofilmes, estruturas microbianas altamente organizadas que favorecem a aderência dos microrganismos a superfície sólida, de forma que o grau de adesão de um biofilme microbiano a uma superfície sólida em meio aquoso, depende da disponibilidade de nutrientes para o crescimento celular e para a biosíntese dos EPSs.(SUTHERLAND, 1980, 1985).

Há um grande número de microrganismos produtores de EPSs, havendo bactérias, fungos e cianobactérias produtores deste tipo de biomolécula. Esta variedade de organismos produtores se reflete numa variedade ainda maior de estruturas encontradas nos polissacarídeos excretados.

1.1. EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

O alginato, é produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e por outras bactérias do gênero *Pseudomonas*, além de ser produzido também por espécies do gênero *Azotobacter* (EVANS; LINKER, 1973; GACESA, 1998). Além do alginato, bactérias do gênero *Pseudomonas* são também capazes de sintetizar outros EPSs como a marginalana. Até o momento, ainda não foram encontradas cepas de *Pseudomonas* sp capazes de sintetizar mais de um tipo de exopolissacarídeo ácido (FETT *et al.*, 1995).

O EPS gelana e outros relacionados como: welana, rhamsana e o polissacarídeo S657, entre outros, são produzidos por bactérias do gênero *Sphingomonas*. (SUTHERLAND; KENNEDY, 1996).

A acetana é um EPS produzido por bactérias do gênero *Acetobacter*, (COLQUHOUN *et al.*, 1995; FONTANA *et al.*, 1991).

A bactéria *Xanthomonas campestris* produz o exopolissacarídeo xantana (JANSSON *et al.*, 1975; MELTON *et al.*, 1976).

O gênero de bactérias *Erwinia* produz os exopolissacarídeos amilovorana e stewartana, que são EPSs de estrutura complexa e ramificada compostos por unidades de glucose, galactose e ácido glucurônico. Diferenças entre estes dois EPSs residem em detalhes na natureza dos substituintes, nas unidades das quais saem as ramificações e na natureza dos grupamentos envolvidos na terminalização das cadeias. (von BODMAN *et al.*, 1998; BERNHARD *et al.*, 1996; NIMITZ *et al.*, 1996).

As bactérias do ácido láctico produzem uma grande variedade de EPSs que são produzidos por uma igualmente grande variedade de bactérias deste tipo, representados pelos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Os monossacarídeos mais comumente encontrados na estrutura destes exopolissacarídeos são glucose e galactose, embora ramnose, fucose, manose, galactosamina e outros monossacarídeos sejam também encontrados (van den BERG *et al.*, 1995; CERNING, 1990).

Os EPSs succinoglucana e galactoglucana, também conhecidos como EPS-I e EPS-II são caracteristicamente produzidos por *Rhizobium meliloti* e por outras bactérias da família *Rhizobiaceae*, porém há uma grande variedade de bactérias do solo pertencentes a outras famílias que são também capazes de sintetizar um ou ambos. Bactérias da família

Rhizobiaceae e outras bactérias produtoras de succinoglucanas e galactoglucanas podem ainda produzir a glucana curdulana. Além das bactérias da família *Rhizobiaceae*, os gêneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Achromobacter* e *Bacillus* também excretam os polissacarídeos supracitados (GONZALEZ *et al.*, 1996; ZEVENHUIZEM, 1997).

Entre as cianobactérias encontramos uma série de espécies produtoras de EPSs. Um levantamento feito com 15 cepas do gênero *Cyanothece* coletadas de ambientes salinos ou hipersalinos, revelou a capacidade de produção de um igual número de diferentes EPSs ácidos contendo ácidos urônicos, acetato, piruvato e sulfato em diferentes proporções. O gênero *Cyanospira* de cianobactérias, recém descoberto a partir de coletas feitas no lago Magadi, um lago alcalino, no Quênia, África, revelou uma cianobactéria *Cyanospira capsulata* que excreta um EPS que contém *N*-acetilglucosamina e 4-O-[1-carboxietil]manose, além de arabinose, fucose, manose e ácido glucurônico em sua estrutura (GAROZZO *et al.*, 1995).

O fungo dimórfico *Aureobasidium pullulans*, produz o EPS pululana que é constituído por glucanas lineares nas quais as unidades de glucose estão unidas por ligações α -1,4- e α -1,6-. Foi relatado que dependendo das condições de cultura dois EPSs são produzidos, sendo que as diferenças entre os dois polímeros não estão na estrutura, mas sim na massa molecular (MADI *et al.*, 1997). A produção de pululana por *A. pullulans* só acontece quando o fungo encontra-se na sua forma leveduriforme, não sendo detectada na forma micelial. Fatores que favorecem a predominância da forma leveduriforme em cultura favorecem também a produção deste EPS (REESLEV *et al.*, 1993).

A bactéria *Halomonas eurihalina* produz um EPS aniônico chamado polímero V2-7 que contém quantidades significativas de sulfato (LLAMAS *et al.*, 1997).

O gênero *Hyphomonas* compreende bactérias marinhas dimórficas, ou seja, com um ciclo de vida bifásico no qual há gerações ceseis e plactônicas. Uma cepa deste gênero mostrou ser capaz de produzir copiosamente um EPS que tem propriedades adesivas tanto em superfícies hidrofílicas como em hidrofóbicas (QUINTERO; WEINER, 1995).

O EPS zooglana produzido pela bactéria *Zooglea ramigera* é altamente ramificado sendo composto por glucose, galactose e piruvato. A cepa mutante 115SLR deste microrganismo é capaz de produzir um outro EPS que contém também acetato e succinato em sua estrutura (TROYANO *et al.*, 1996).

Há entre as bactérias dos ventos hidrotermais das profundidades marinhas uma série de produtores de EPSs que variam em estrutura e composição (RAGUENES *et al.*, 1996; GUEZENNEC *et al.*, 1993; VINCENT *et al.*, 1994).

Os exemplos acima mostrados dão uma idéia da diversidade de estruturas e dos microrganismos capazes de produzir exopolissacarídeos. Porém são apenas breves exemplos e estão longe de cobrir todas as informações a respeito desta diversidade.

1.2. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

A grande diversidade de estruturas e de microrganismos produtores de EPSs está relacionada com os diferentes funções desempenhadas por estas macromoléculas em diferentes microrganismos produtores.

Provavelmente a principal função dos EPSs é a de promover a adesão das células a superfícies sólidas ou entre as células, formando agregados que dão origem aos biofilmes, nos quais os EPSs são considerados uma matriz hidratada onde múltiplas camadas de células estão embebidas (CHRISTENSEN, 1989). A existência desta matriz hidratada confere às células que a colonizam uma série de vantagens seletivas como: adesão a superfícies inertes; proteção contra a dessecação e outros estresses ambientais de forma a proteger as populações ceseis contra variações bruscas do macroambiente; aumento da variabilidade antigênica; dificuldade de reconhecimento pelo sistema imune em cepas patogênicas para animais e proteção contra as defesas dos vegetais, no caso de patógenos de plantas; retenção de íons e nutrientes (GRIFFIN *et al.*, 1996; BERNHARD *et al.*, 1996; GACESA, 1998; QUINTERO; WEINER, 1995).

Em *Hyphomonas*, um gênero de bactérias marinhas, a produção de EPS está relacionada à floculação em cultura líquida e também à adesão a superfícies sólidas tanto hidrofílicas, como o aço inoxidável e o vidro, quanto hidrofóbicas, como o teflon e o policarbonato. Neste microrganismo o EPS excretado é considerado como a adesina primária, indicando que a presença desta macromolécula é uma condição necessária e suficiente para a adesão às superfícies marinhas, formando biofilmes (QUINTERO; WEINER, 1995). Também em bactérias de ambiente aquático, a produção de EPSs é de

fundamental importância para a colonização de superfícies sólidas, promovendo a adesão destes microrganismos a estas superfícies (ALLISON; SUTHERLAND, 1987).

1.3. EXOPOLISSACARÍDEOS E PATOGENICIDADE

Durante um processo de infecção parasitária em uma planta, os EPSs podem agir como uma barreira protetora contra os compostos tóxicos produzidos pelo hospedeiro, criando um ambiente favorável ao crescimento do patógeno no interior da planta infectada e portanto a síntese de EPSs pode ser considerada como essencial para a virulência nestes casos (LEIGH; COPLIN,1992). Nos processos fitopatológicos causados por: *Erwinia stewartii* em milho e *Erwinia amylovora* em macieiras, pereiras entre outras rosáceas, os EPSs stewartiana e amilovorana respectivamente são considerados importantes fatores de virulência (BERNHARD *et al.*, 1996). No caso da infecção causada por *Pseudomonas* os fatores de virulência são as levanas e os alginatos, dependendo das espécies envolvidas num determinado processo de fitopatogenicidade (FETT *et al.*, 1987; CONTI *et al.*, 1994). Em animais, os microrganismos produtores de EPSs estão geralmente ligados a infecções oportunistas ou à infecção hospitalar. Nestes casos, a importância dos EPSs para o processo patogênico está ligada à formação de biofilmes que se constituem em uma barreira às defesas dos organismos infectados, protegendo as células do patógeno dos efeitos de antibióticos que aparentemente não conseguem atravessar a barreira polissacarídica constituída pelo biofilme (EVANS *et al.*, 1990). O *Staphylococcus epidermidis*, um comensal muito encontrado na flora bacteriana da pele de humanos e animais excreta EPSs que formam biofilmes, capazes de proporcionar adesão deste microrganismo a instrumentos cirúrgicos, sondas, catéteres, servindo de inóculo para o estabelecimento de uma infecção oportunista (MARRIE *et al.*, 1982).

1.4. EXOPOLISSACARÍDEOS E BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

A produção de EPSs é comum a várias bactérias fixadoras de nitrogênio. A capacidade de floculação e agregação de fixadores de nitrogênio de vida livre como: *Azospirillum* e *Azotobacter* está ligada à produção destas macromoléculas, podendo ser

interessante do ponto de vista da dispersão e da sobrevivência destes microrganismos no solo (GACESA, 1998). Em *Rhizobium meliloti* a produção do EPS succinoglucana, EPS I ou galactoglucana, EPS II é fundamental para o estabelecimento de nódulos fixadores de nitrogênio funcionais na simbiose desta espécie com plantas de *Medicago sativa*, alfafa (LEIGH; CHOPLIN, 1992).

As bactérias do gênero *Agrobacterium* formam tumores vegetais chamados gálias em plantas superiores, devido a produção de uma succinoglucana muito semelhante ao EPS I de *R. meliloti* (SUTHERLAND, 1985; TIBURTIUS *et al.*, 1996). Na realidade, *Agrobacterium* e *R. meliloti* são estreitamente relacionadas através da grande homologia existente entre as seqüências dos seus RNAs (AIRD *et al.*, 1991), porém *Agrobacterium* é incapaz de fixar nitrogênio.

1.5. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Uma grande parte de EPSs microbianos têm encontrado aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentar, petroquímica entre outras, durante as últimas décadas. Por exemplo: o *Xanthomonas campestris* produtor da xantana comercial é muito utilizado como agente espessante, gelificante, estabilizante e emulsificante na indústria alimentar; As dextranas e seus derivados encontram aplicações nas indústrias farmacêutica e de química fina (SANDFORD; BRAID, 1983); A gelana produzida por *Sphingomonas paucimobilis* (LOBAS *et al.*, 1992) ou por *Aeromonas elodea* é utilizada como agente gelificante na indústria alimentar (KANG *et al.*, 1982); A pululana produzida por *Aureobasidium pullulans* é um promissor polímero para a produção de embalagens, fibras e películas biodegradáveis (McNEILL e HARVEY, 1993); A celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum* é utilizada na formação de películas usadas no tratamento de queimaduras (FONTANA *et al.*, 1991) e a acetana produzida por este microrganismo tem potencialidades biotecnológicas já que este EPS é estruturalmente relacionado à xantana (GRIFFIN *et al.*, 1996).

Existe a possibilidade e o potencial para a produção de EPSs microbianos por fermentação industrial como é feito com as xantanas, dextranas, gelanas e com a pululana. As fermentações industriais oferecem vantagens sobre o produto obtido de algas marinhas devido a possibilidade de obtenção de um produto mais homogêneo, sujeito a um controle

de qualidade, independente de variações sazonais e de efeitos da poluição ou eutrofização nas áreas de coleta, podendo-se obter produtos de composição parcialmente diferente através da manipulação das condições de cultura ou da manipulação genética dos microrganismos produtores (CONTI *et al.*, 1994).

Maioria das bactérias do ácido láctico pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, durante o processo de fermentação produzem EPSs que são excretados no leite prevenindo a sinerese e assegurando textura e corpo ao produto final de um determinado processo de fermentação (CERNING, 1990; CEERNING *et al.*, 1994; van den BERG *et al.*, 1995). Muitos inoculantes para a produção de iogurtes contendo *Streptococcus termophilus* e *Lactobacillus (bulgaricu) delbrueckii* excretadores de EPSs, bem como inoculantes para a confecção de produtos lácticos escandinavos como o “viili” e o “longfil” contendo *Lactococcus (cremoris) lactis* igualmente excretor destas macromoléculas, são comercializados nos Estados Unidos e na Europa (CERNING *et al.*, 1994). O uso de *S. termophilus* na confecção de mussarela demonstrou capacidade maior para a retenção de umidade no queijo, melhorando a consistência e o corpo do produto, impedindo que ele tenha uma textura borrachuda (LOW *et al.*, 1998).

Os EPSs oriundos de bactérias do ácido láctico têm sido largamente estudados quanto as suas estruturas e condições de produção. Devido à variedade de estruturas de EPSs produzidos e por serem esses microrganismos completamente seguros do ponto de vista alimentar, os EPSs por eles produzidos podem vir a constituir uma nova geração de polissacarídeos de uso industrial (CERNING *et al.*, 1994; ROBIJN *et al.*, 1995a; 1995b, 1996a e 1996b; STAAF *et al.*, 1996; LEMOINE *et al.*, 1997; GROBBEN *et al.*, 1998; van den BERG *et al.*, 1995; STINGELE *et al.*, 1997; BUBB *et al.*, 1997).

Apesar do grande potencial biotecnológico e utilidade na indústria de laticínios dos EPS das bactérias do ácido láctico, eles podem causar problemas na fabricação de cidra aumentando consistência da bebida, o que diminui a qualidade do produto. Além das bactérias do ácido láctico, a bactéria *Pediococcus damnosus* também produz EPSs que causam este problema. Este EPS teve sua estrutura determinada com o objetivo de se encontrarem enzimas que o degradem tentando contornar o problema por ele criado (DUEÑAS-CHASCO, *et al.*, 1997).

Há alguns EPSs que sendo aniônicos têm afinidade por íons metálicos, inclusive por

metais pesados, o que confere aos microrganismos que os produzem uma grande importância ecológica e prática desde que eles possam ser úteis na remoção de metais pesados tóxicos de soluções (CORZO *et al.*, 1994; BROWN; LESTER, 1979; RUDD *et al.*, 1984; MARQUÉS *et al.*, 1990; MITTELMAN *et al.*, 1985). Em alguns casos os complexos metal/polissacarídeo permanecem solúveis (GEDDIE *et al.*, 1990; MITTELMAN *et al.*, 1985; PLUDE *et al.*, 1991), enquanto em outros eles precipitam (MÁRQUÉS *et al.*, 1990).

No tratamento de águas servidas os EPSs microbianos também têm grande importância, já que a produção de EPSs neste ambiente é a base da formação de agregados estáveis e de flóculos na formação do lodo ativado (JORAND *et al.*, 1994). Embora, grandes concentrações de EPSs possam atrapalhar o acionamento dos flóculos no lodo ativado, quanto maior for a concentração de EPSs neste lodo maior será também a concentração de microrganismos nele aderidos (URBAIN *et al.*, 1993).

Existe interesse por EPSs potencialmente úteis do ponto de vista industrial não somente dos microrganismos citados, há também uma intensa atividade de pesquisa em torno de EPSs de outras fontes microbianas com potenciais usos. Como: O EPS produzido por *Halomonas eurihalina*, também chamada *Volcaniella eurihalina*, chamado EPS V2-7 que tem grandes quantidades de sulfato em sua estrutura e é um potente agente emulsificante tendo a propriedade de formar géis em pH ácido (CALVO *et al.*, 1995). Bactérias dos ventos hidrotermais das profundidades oceânicas e cianobactérias de ambientes salinos têm sido investigadas com o objetivo de se obter EPSs de interesse biotecnológico (de PHILIPPS *et al.*, 1998; RAGUENES *et al.*, 1996; GUEZENNEC *et al.*, 1993; VICENT *et al.*, 1994).

1.6. OBJETIVOS

- 1) Isolamento de microrganismos do solo produtores de exopolissacarídeos.
- 2) Cultivo em cultura dos microrganismos encontrados, para extração do exopolissacarídeos produzidos.
- 3) Obtenção de informações preliminares sobre a estrutura dos exopolissacarídeos isolados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Meios utilizados para o isolamento de microrganismos produtores de EPSs:

2.1.1. Bold's Mineral Medium (ARMADJIAN, 1993).

Composição:

- 1 - NaNO_3 - 0,25 g/L.
- 2 - CaCl_2 - 0,025 g/L.
- 3 - MgSO_4 - 0,075 g/L.
- 4 - K_2HPO_4 - 0,075 g/L.
- 5 - NaCl - 0,025 g/L.
- 6 - H_3BO_3 - $11,4 \times 10^{-5}$ g/L.
- 7 - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5×10^{-6} g/L.
- 8 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - $8,8 \times 10^{-5}$ g/L.
- 9 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ g/L.
- 10 - MoO_3 - 7×10^{-7} g/L.
- 11 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - $1,5 \times 10^{-6}$ g/L.
- 12 - $\text{Co}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 4×10^{-7} g/L.
- 13 - EDTA - 5×10^{-5} g/L.
- 14 - KOH - $3,1 \times 10^{-5}$ g/L.

Como fonte de carbono sacarose 30g/L.

2.1.2. Gelose Czapeck- Dox.

Composição:

- 1- Sacarose - 20g/L
- 2- Nitrato de Sódio – 2g/L
- 3- Fosfato dibásico de Potássio – 1g/L.
- 4- Sulfato de Magnésio – 0,5g/L.
- 5- Cloreto de Potássio – 0,5g/L.
- 6- Sulfato Ferroso – 0,01g/L.

2.2. MATERIAIS:

- Agitadores magnéticos;
- Alça de platina;
- Balança analítica;
- Câmara de fluxo laminar;
- Capelas;
- Centrifuga;
- Cromatógrafo a gás acoplado à espectrofotômetro de massa;
- Cuba de cromatografia;
- Destiladores de água;
- Erlenmeyers;
- Estufa;
- Incubadora rotatória para culturas de microrganismos;
- Liofilizador;
- Mistura solvente para cromatografia em papel: butanol/piridina/H₂O (5/3/3);
- Placas de petri;
- Rota vaporizador;
- Tubos de ensaio com rolha de algodão e gaze.

2.3. MÉTODOS:

2.3.1. Isolamento de Microrganismos Produtores de EPSs:

Amostras de solo do Centro Politécnico foram diluídas em água destilada estéril de 10^4 a 10^5 vezes, sendo posteriormente inoculadas em meio sólido. Após 48 horas as placas foram observadas para a avaliação da presença de colônias de microrganismos de aspecto viscoso e brilhante, o que indica a produção de EPSs. As colônias de bactérias obtidas com as características desejáveis foram submetidas a um processo de purificação, que constitui da diluição das mesmas em água destilada estéril na ordem de 10^4 a 10^5 vezes, seguida do plaqueamento das respectivas suspensões em meio sólido, contendo sacarose como fonte de carbono.

2.3.2. Cultivo dos Isolados:

As bactérias isoladas foram inoculadas em meio líquido, contendo sacarose como única fonte de carbono, para o cultivo e obtenção de EPSs em quantidades suficientes para que estes pudessem ser estudados, quanto à sua composição monossacarídica e estrutura.

2.3.3. Armazenamento dos Isolados:

Os isolados puros, foram armazenados em tubos de ensaio contendo gelose, vedados com rolha de gaze e algodão. Sendo feito seu repique de dois em dois meses.

2.3.4. Crescimento em Diferentes Fontes de Carbono:

Os isolados foram avaliados quanto ao crescimento nas fontes de carbono: sacarose, trealose, maltose e amido.

2.3.5. Extração e Obtenção dos EPSs:

As culturas de microrganismos produtores de EPSs foram centrifugadas para a obtenção de suspensões livres de células, sendo os sobrenadantes submetidos à precipitação com etanol 70%. A amostra foi novamente centrifugada e o precipitado foi resuspenso em água destilada e dializada por 24 horas. Após a diálise a amostra foi seca por liofilização e utilizada para os procedimentos analíticos. Alternativamente para alguns isolados não houve precipitação com etanol, as amostras centrifugadas foram dializadas 24 horas e foram desidratadas ao máximo em rota vaporizador.

2.3.6. Método de Gram:

1' Violeta Genciana;

1' Lugol;

Lavar com Água;

15" Álcool;

30" Fucsina.

Os isolados foram diferenciados pelo Método de Gram descrito acima.

2.3.7. Métodos Cromatográficos para a Caracterização Estrutural dos EPSs:

Foram realizados dois tipos de cromatografias para a determinação da composição monossacarídica, a de partição em papel, a qual consiste num método descendente, em papel Whatman n.º 1 e mistura solvente n-butanol: piridina: água (5:3:3) (HOUGH e JONES, 1962). Sendo a revelação feita através da detecção dos açúcares com nitrato de prata e hidróxido de sódio (TREVELYAN et al., 1950) para a obtenção qualitativa dos monossacarídeos e a cromatografia líquida gasosa, utilizando um Cromatógrafo líquido gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrofotômetro de massa FINNIGAN-MAT utilizando colunas capilares de 30m x 0,25mm (d.i.), DB-225 e DB210, hélio como gás de arraste (2mL/min.), temperatura inicial de 50°C, seguida de um gradiente de 4°C/min. Até 220°C, e mantida constante para a determinação qualitativa e quantitativa dos monossacarídeos. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática e a identificação foi feita com base nos seus perfis de fragmentação características. Sendo este experimento precedido da hidrólise total de uma amostra com ácido trifluoracético 1M, por 8 horas a 100°C, com posterior redução e acetilação dos produtos da hidrólise (WOLFROM e THOMPSON, 1963 a, b).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase de isolamento de microrganismos produtores de exopolissacarídeos foi encontrado quatro colônias de bactérias com as características desejáveis, que foram submetidas a um processo de purificação.



FIGURA 1 : Placas de petri do processo de purificação de microrganismos para a obtenção de colônias isoladas.

O processo de purificação permitiu o isolamento das quatro colônias de bactérias encontradas. Após repetir a metodologia três vezes e obter como resultado o aparecimento do mesmo tipo de colônia, os isolados foram considerados puros e armazenados em tubo de ensaio contendo gelose, como mostra a figura 2 :

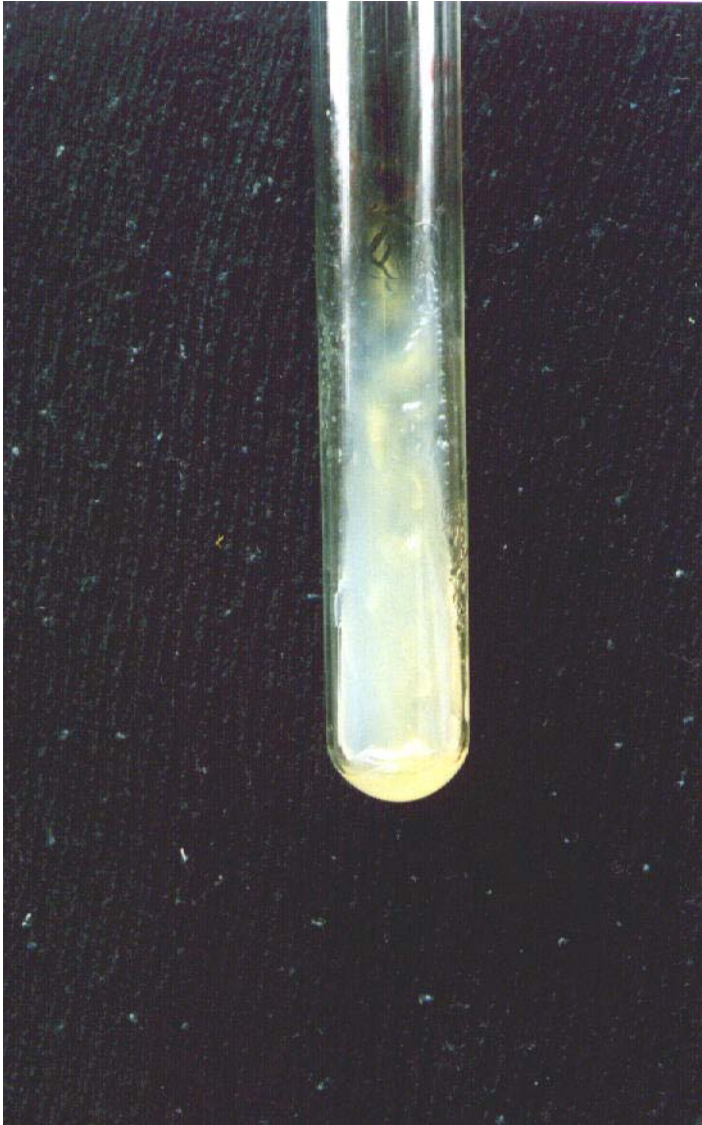


FIGURA 2: Colônia isolada de microrganismo produtor de EPSs (aspecto viscoso e brilhante) armazenada em tubo de ensaio.

Os isolados foram inoculados em meio sólido contendo diferentes fontes de carbono: amido, maltose, sacarose e trealose, (tabela 1) com o objetivo de proceder uma diferenciação entre eles em relação ao crescimento e visando-se excluir a possibilidade dos microrganismos isolados serem portadores das enzimas levana-sacarase e dextransacarase, que produzem uma levana e uma frutana respectivamente muito estudada por outros grupos. Eles apresentaram variações de crescimento nas fontes de carbono supracitadas, como mostra a tabela 1.

TABELA 1-IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

	amido	Maltose	sacarose	trealose	Coloração de Gram	forma das células	cor da colônia
Isolado 1	-	+	+	+	+	diplococos	transparente
Isolado 2	-	+	+	+	+	cocos	amarelo pálido
Isolado 3	++	++	++	+	-	cocos	vermelho rosada
Isolado 4	-	-	++	+	+	bastonetes	amarelo brilhante

- crescimento negativo; + crescimento positivo; ++ crescimento intenso

O crescimento em outras fontes de carbono diferentes da sacarose (tabela 1) e a composição monossacarídica dos isolados, (tabela 2) indicam que estes não são portadores das enzimas citadas. Como os resultados de composição monossacarídica não mostraram a presença de frutose em nenhum dos EPSs isolados, a possibilidade de frutanas está descartada. A detecção de pelo menos dois tipos de unidade monossacarídica em cada um dos três isolados estudados (tabela 2) indica que estes são heteropolissacarídeos descartando a possibilidade de serem levanas.

Além de diferenciar os microrganismos isolados os experimentos de crescimento em diferentes fontes de carbono, indicam a possibilidade de se avaliar o potencial de produção de EPSs em cada uma destas fontes, permitindo assim a realização de estudos posteriores de otimização da produção de EPSs por estes microrganismos.

A coloração de Gram mostrada na tabela 1, permitiu a diferenciação dos isolados, indicando variações morfológicas dos microrganismos produtores de EPSs.

TABELA2-COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EPSs DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Ac.	Galactose	Glucose	Manose	Polióis	Ramnose	Fucose
-----	-----------	---------	--------	---------	---------	--------

	Glucurônico						
Isolado 1*†	-	83%	-	17%	-	-	-
Isolado 3* ‡	-	+	+	+	+	-	+
Isolado 4* ‡	+	+	+	-	-	+	-

* cromatografia em papel; †GLC-MS; ‡GLC

A tabela 2, mostra que os diferentes isolados são capazes de produzir diferentes exopolissacarídeos, sendo que o isolado 1 é uma galactomana. O que se evidencia pelas diferentes composições monossacarídicas de cada um deles. A composição monossacarídica de cada um dos isolados foi determinada pelos métodos de cromatografia em papel, cromatografia gasosa e ainda por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massa.

O uso da cromatografia em papel foi escolhido pelo fato deste método ser mais acessível e barato. Os resultados assim obtidos foram então confirmados pelos outros dois métodos já citados. O fato de a cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massa só ter sido usada na caracterização do ESP produzido pelo isolado 1 é devido a um problema de inacessibilidade de uso do aparelho por motivo de defeito no mesmo ao longo da realização do trabalho. Para contornar este problema optou-se então pelo uso da cromatografia gasosa na caracterização dos EPSs produzidos pelos isolados 3 e 4.

4. CONCLUSÕES

- ⇐ A metodologia utilizada permitiu o isolamento de quatro microrganismos produtores de exopolissacarídeos.
- ⇐ Os diferentes microrganismos isolados apresentaram diferentes capacidades de crescimento e de produção de EPSs nos meios de cultura utilizados.
- ⇐ A produção de exopolissacarídeos em fontes de carbono diferentes da sacarose e a composição monossacarídica indicam, que estes microrganismos isolados não são produtores das enzimas dextrana-sacarase e levana-sacarase.
- ⇐ Os microrganismos isolados diferem quanto às características de crescimento em diferentes fontes de carbono e quanto à morfologia das células.
- ⇐ Os microrganismos isolados excretam diferentes exopolissacarídeos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRD, E. L. H.; BRIGHTWELL, G.; JONES, M. A.; JOHNSTON, A. W. B. Identification of the *exo* loci required for exopolysaccharide synthesis in *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883. **J. Gen. Microbiol.**, 137: 2287-2297, 1991).

ALLISON, D. G.; SUTHERLAND, I. W. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, 133: 1319-1327, 1987.

ARMADJIAN, V. **The Lichen Symbiosis**, John Wiley & Sons, 2 edition, 1993.

BERNHARD, F.; SCHULLERUS, D.; BELLEMANN, P.; NIMTZ, M.; COPLIN, D. L.; GEIDER, K. Genetic transfer of amylovoran and stewartan synthesis between *Erwinia amylovora* and *Erwinia stewartii*. **Microbiology**, 142: 1087-1096, 1996.

BROWN, M. J.; LESTER, J. N. Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. **Water Res.**, 13: 817-837, 1985

BUBB, W. A.; URASHIMA, T.; FUJIWARA, R.; SHINNAI, T.; ARIGA, H. Structural characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* OR 901. **Carbohydr. Res.**, 301: 41-50, 1997.

CALVO, C.; FERRER, M. R.; MARTINEZ-CHECA, F.; BEJAR, V.; QUESADA, E. Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 55, 45-54, 1995.

CERNING, J. Extracellular polysaccharides produced by acid lactic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, 87: 113-130, 1990.

CERNING, J.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M.; TOPISIROVIC, L. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 3914-3919, 1994.

CHRISTENSEN, B. E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **J. Bacteriol.**, 10: 181-202, 1989.

COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M.; MORRIS, V. J. NMR studies of acetan and the related bacterial polysaccharide, CR1/4, produced by a mutant strain of *Acetobacter xilinum*. **Carbohydrate Res.**, 269: 319-331, 1995.

CONTI, E.; FLAIBANI, A.; O'REGAN, M.; SUTHERLAND, I. W. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties. **Microbiology**, 140: 1125-1132, 1994

CORZO, J.; LÉON-BARRIOS, M.; HERNANDO-RICO, V.; GUTIERRES-NAVARRO, A. M. Precipitation of metallic cation by the exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* strain BGA-1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 4531-4536, 1994.

de PHILIPPIS, R.; MARGHERI, M. C.; MATERASSI, M.; VINCENZINI, M. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 1130-1132, 1998.

DUEÑAS-CHASCO, M. T.; CARVAJAL, M. A. R.; MATEO, P. T.; RODRIGUEZ, G. F.; ESPARTERO, J. L.; IRIBAS, A. I.; SERRANO, A. M. G. Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. **Carbohydr. Res.**, 303: 453-458, 1997.

EVANS, D. J.; BROWN, M. R. W.; ALLISON, D. J.; GILBERT, P. Susceptibility of bacterial biofilms to tobramycin: role of specific growth rate and phase in the cell division cycle. **J. Antimicrob., Chemother.**, 31: 585-591, 1990.

EVANS, L. R.; LINKER, A. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, 116: 915-924, 1973.

FETT, W. F.; WELLS, J. M.; CESCUTI, P.; WIJEI, C. Identification of Exopolysaccharides Produced by fluorescent *Pseudomonas* associated with Commercial Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 513-517, 1995.

FONTANA, J. D.; FRANCO, V. C.; de SOUZA, S. J.; LYRA, I. N.; de SOUZA, A. M. Nature of the plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ('Tea Fungus') biofilm used in skin therapy. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 28/29: 341-351, 1991.

GACESA, P. P. Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and prospects. **Microbiology**, 144: 1133-1143, 1998.

GAROZZO, D.; IMPALLOMENI, G.; SPINA, E.; STURIALE, L.; CESÀRO, A.; CESCUTTI, P. Identification of *N*-acetylglucosamine and 4-O-[1-carboxyethyl]mannose in the exopolysaccharide from *Cyanospira capsulata*. **Carbohydr. Res.**, 270: 97-106, 1995.

GEDDIE, J. L.; SUTHERLAND, I. L. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. **J. Appl. Bacteriol.**, 74: 467-472, 1993.

GONZÁLEZ, J. E.; REUHS, B. L.; WALKER, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **Proc. nat. Acad. Sci. USA**, 93: 8636-8641, 1996.

GRIFFIN, A. M.; MORRIS, V. J.; GASSON, M. J. Identification, cloning and sequencing the *aceA* gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 137: 115-121, 1996.

GROBBEN, G. J.; CHIN-JOE, I.; KITZEN, V. A.; BOELS, I. C.; BOER, F.; SIKKEMA, J.; SMITH, M. R.; BONT, J. A. M. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCBF 2772 with a simplified defined medium. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 1333-1337, 1998.

GUEZENNEC, J. G.; PIGNET, P.; RAGUENÉS, G.; DESLANDES, E.; LIJOUR, Y.; GENTRIC, E. Preliminary chemical characterization of unusual eubacteria exopolysaccharides of deep sea origin. **Carbohydr. Polym.**, 24: 287-294, 1993.

HOUGH, L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v.1, p. 21-30, 1962.

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

JORAND, F.; GUICHERD, P.; URBAIN, V.; MANEM, J.; BLOCK, J. C. Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria. **Environ. Sci. Technol.**, 30: 211-218, 1994.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T.; COTTRELL, I. W. Agar like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, 43: 1086-1091, 1982.

LEIGH, J. A.; COPLIN, D. L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interaction. **Annu. Rev. Microbiol.**, 46: 307-346, 1992.

LEMOINE, J.; CHIRAT, F.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; FAVRE, N.; NEESER, J. R. Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi39 and Sfi12. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63: 3512-3518, 1997.

LLAMAS, I.; DEL MORAL, A.; BÉJAR, V.; GIRON, M. D.; SALTO, R.; QUESADA, E. Plasmids from *Halomonas eurialina*, a microorganism which produces an exopolysaccharide of biotechnological interest. **FEMS Microbiol. Lett.**, 156: 251-257, 1997.

LOBAS, D.; SCHUMPE, S.; DECKWER, W. D. The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DMS 6314). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37: 411-415, 1992.

LOW, D.; AHLGREN, J. F.; HORNE, D.; McMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; BROADBENT, J. R. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 2147-2151, 1998.

MADI, N. S.; HARVEY, L. M.; MEHLER, A.; MCNEIL, B. Synthesis of two distinct exopolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydr. Polym.**, 32: 107-114, 1997.

MARQUÉS, A. M.; BONET, R.; SIMON-PUJOL, M. D.; FUSTÉ, M. C.; CONGREGADO, F. Removal of uranium by an exopolysaccharide from *Pseudomonas* sp. **Appl. Environ. Microbiol.**, 34: 429-431, 1990.

MARRIE, T. J., NELLIGAN, J.; COSTERNON, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of an endocardial pacemaker lead. **Circulation** 66: 1339-1349, 1982.

McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Viscous fermentation products. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 13: 275-304, 1993.

MELTON, L. D.; MINDT L.; REES, D.; SANDERSON, G. R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: Evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydr. Res.**, 46: 245-257, 1976.

MITTELMAN, M. W.; GEESEY, G. G. Copper-binding characteristics from a freshwater sediment bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, 49: 846-851, 1985.

NIMITZ, M.; MORT, A.; WRAY, V.; DOMKE, T.; ZHANG, Y.; COPLIN, D. L.; GEIGER, K. Structure of stewartan, the capsular exopolysaccharide from the corn pathogen *Erwinia stewartii*. **Carbohydr. Res.**, 288: 189-201, 1996.

PERRY, J. J.; STALEY, J. T. **Microbiology: Dynamics and Diversity**. United States of America, 1997.

PLUDE, J. L.; PARKER, D. L.; SCHOMMER, O. J.; TIMMERMAN, R. J.; HAGSTROM, S. A.; JOERS, J. J.; HNASKO, R. Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flosaquae* C3-40. **Appl. Environ. Microbiol.**, 57: 1696-1700, 1991.

QUINTERO, E. J.; WEINER, R. M. Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* Strain MHS-3 in its attachment to surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1995.

RAGUENÉS, G.; PIGNET, P.; GAUTHIER, G.; PERES, A.; CHRISTEN, R.; ROUGEAUX, H.; BARBIER, G.; GUEZENNEC, J. Description of a new polymer-secreting bacterium from deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62: 67-73, 1996.

REESLEV, M.; JORGENSEN, B. B.; JORGENSEN, O. B. Influence of Zn⁺ on yeast-mycelium dimorphism and exopolysaccharide production by the fungus *Aureobasidium*

pullulans grown in a defined medium in continuous culture. **J. Gen. Microbiol.**, 139: 3065-3070, 1993.

ROBIJN, G. W.; van den BERG, D. J. C.; HAAS, H.; KAMERLING, J. P.; VLIERGENTHART, J. F. G. Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus seke* 0-1. **Carbohydr. Res.**, 276: 117-136, 1995a.

ROBIJN, G. W.; THOMAS, J. R.; HAAS, H.; van den BERG, D. J. C.; KAMERLING, J. P.; VLIERGENTHART, J. F. G. The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. **Carbohydr. Res.**, 276: 137-154, 1995b.

ROBIJN, G. W.; WIENK, H. L. J.; van den BERG, D. J. C.; HAAS, H.; KAMERLING, J. P.; VLIERGENTHART, J. F. G. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. **Carbohydr. Res.**, 285: 129-139, 1996a.

ROBIJN, G. W.; GALLEGO, R. G.; WIENK, H. L. J.; van den BERG, D. J. C.; HAAS, H.; KAMERLING, J. P.; VLIERGENTHART, J. F. G. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidiphilus* LMG9433. **Carbohydr. Res.**, 288: 203-218, 1996b.

RUDD, T.; STERRITT, R. M.; LESTER, J. M. Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process. **J. Water Pollut. Control Fed.**, 56: 1260-1268, 1984.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. "The Polysaccharides" vol. 2, **Academic Press**, New York, 1983, pp. 411-490, 1983.

STAAF, M.; WIDMALM, G.; YANG, Z.; HUTTUNEN E. Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus*. **Carbohydr. Res.**, 291: 155-164, 1996.

STINGELE, F.; LEMONIE, J.; NEESER, J. R. *Lactobacillus helveticus* Lh59 secretes an exopolysaccharide that is identical to one produced by *Lactobacillus helveticus* TN-4, a presumed spontaneous mutant of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. **Carbohydr. Res.**, 302: 197-202, 1997.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.**, 34: 79-150, 1980.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.**, 39: 243-270, 1985.

SUTHERLAND, I. W.; KENNEDY, L. Polysaccharide lyases from gelatin producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology**, 142: 867-872, 1996.

TIBURTIUS, A.; de LUCA, N. G.; HUSSAIN, H.; JOHSTON, A. W. B. Expression of the exo Y gene, required for exopolysaccharide synthesis in *Agrobacterium*, is activated by regulatory *ros* gene. **Microbiology**, 142: 867-872.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature** (Lond.), 166:444-445, 1950.

TROYANO, E.; LEE, S. P.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J. Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zooglea ramigera* 115SLR. **Carbohydr. Polym.**, 31: 35-40, 1996.

URBAIN, V.; BLOCK, J. C.; MANEM, J. Bioflocculation in the activated sludge: an analytical approach. **Water Res.**, 27: 829-838, 1993.

van den BERG, D. C.; ROBIJN, G. W.; JANSSEN, A. C.; GIUSEPPIN, M. L. F.; VREEKER, R.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. G.; LEDEBOER, A. M.; VERRIPS, T. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 2840-2844, 1995.

VICENT, P.; PIGNET, P.; TALMONT, F.; BOZZI, L.; FOURNET, B.; GUEZENNEC, J., JEANTHON, C.; PRIEUR, D. Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60: 4134-4141, 1994.

von BODMAN, S. B.; MAJERCKAK, D. R.; COPLIN, D. L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 95:7687-7692, 1998.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v2, p. 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v2, p. 211-215, 1963b.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Succinoglucan and galactoglucan. **Carbohydr. Polym.**, 33: 139-144, 1997.