

*UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS*

Aspectos metabólicos, fisiológicos e taxonômicos de actinomiceto produtor de exopolissacarídeos, proveniente de águas subterrâneas contaminadas (São Carlos, SP)

Roberta Fusconi

SÃO CARLOS

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Aspectos metabólicos, fisiológicos e taxonômicos de actinomiceto produtor de exopolissacarídeos, proveniente de águas subterrâneas contaminadas (São Carlos, SP)

Roberta Fusconi

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais

SÃO CARLOS

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F993am

Fusconi, Roberta.

Aspectos metabólicos, fisiológicos e taxonômicos de actinomiceto produtor de exopolissacarídeos, proveniente de águas subterrâneas contaminadas (São Carlos, SP) / Roberta Fusconi. -- São Carlos : UFSCar, 2005.
112 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Microbiologia. 2. Exopolissacarídeos. 3. Desnutrição bacteriana. 4. Melaço. 5. *Gordonia polyisoprenivorans*. 6. Ultramicrobactéria. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

.....
Prof. Dra. Mirna J.L. Godinho
(Orientadora)

.....
Prof. Dra. Nelma R.S. Bossolan
(Co-orientadora)

*HOJE EU TENHO UMA MENINA
ELA É YARA LISSÁ
YARA, SEREIA DOS RIOS*

*ELA CANTA PRÁ ENCANTAR
SOL LISSÁ E LUA MAWU
VIERAM O MUNDO CRIAR*

*YARA LISSÁ SOL, MENINA
VAMOS TODOS TE EMBALAR
E NA RODA DE CAPOEIRA
VAMOS TE ABENÇOAR ...
(ROBY)*

AGRADECIMENTOS

- *À Profa. Dra. Mirna J. L. Godinho, pela orientação, pelas oportunidades e pelo carinho durante todos estes ... 13 anos de convivência.*
- *À Profa. Dra. Nelma R.S. Bossolan, pela co-orientação e à Nelma, pela grande amizade.*
- *À CAPES, pela bolsa concedida.*
- *Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (UFSCar), pelo financiamento de parte deste trabalho.*
- *À Usina São Francisco (Sertãozinho, SP), pelo fornecimento do melaço de cana-de-açúcar.*
- *Aos Doutores: Alberto C. Peret (DHB, UFSCar), Armando A.H. Vieira (DB, UFSCar), Denise G. Santana (ICAGR, UFU), Eloisa P. Gianotti (DHS, EESC-USP), Gilberto Moraes (DGE, UFSCar), Guimes Rodrigues Filho (IQ, UFU), Isara L.C. Hernández (DEQ, UFSCar), Ivã H. Moreno (DHB, UFSCar), Marcelo Zaiat (DHS, EESC-USP), Marli Ranal (IB, UFU), Mirna H. R. Selegim (IQSC, USP), Reiner M. Kroppenstedt (DSMZ, Alemanha), Rosana F. Vazoller (ICB, USP) e ao Grupo de Biofísica Molecular (IFSC, USP) pela valiosa ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.*
- *À Darci, sempre, sempre, sempre Darci.*
- *À “família laboratório”: Mônica, Carlinha, Tati e Fernando.*
- *À família Pavesi sem São Carlos, segunda família.*
- *À Maria, Valmir, Dri, Carol e Ingrid, pela velha e boa amizade.*
- *À Erika, por ter se “catapultado” em Uberlândia.*
- *Às crianças do Bairro São Gabriel de Uberlândia, pequenos angoleiros, pelos choros e pelos sorrisos.*
- *Ao “kit Guimes”, Caê, Camila e Inaê, pelos momentos de cumplicidade e carinho.*

ALLA FAMILIA FUSCONI, SEMPRE PRESENTE
SULL'ATTENTI - BABBO NONNO, MAMMA
NONNA, ZIO FRANCI E A TUTTI I BISI
LONTANI, MA VICINI – NONNA IRIDE,
NONNO MIRO, NONNA ANGELINA E NONNO
DINO

ESTA TESE FOI ESCRITA À SEIS MÃOS, SEIS
PÉS, TRÊS CABEÇAS E TRÊS
CORAÇÕES ...

A GUIMES e al mio piccolo grande sole YARA LISSÁ

APRESENTAÇÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho são apresentados, segundo as normas do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, em um conjunto de trabalhos científicos, redigidos para publicação, estando a tese estruturada em nove capítulos.

O capítulo 1 contém a introdução na qual não se teve a intenção de fazer uma revisão completa sobre o assunto, mas sim contextualizar o trabalho, mostrando a sua importância, e relacionar os temas discutidos em detalhes nos demais capítulos. O capítulo 2 apresenta os objetivos gerais da pesquisa. O capítulo 3 descreve a metodologia utilizada ao longo do trabalho. Os capítulos 4, 5, 6 e 7 são os trabalhos científicos oriundos da pesquisa realizada. Cada trabalho científico é independente e apresenta especificidade em relação à introdução, objetivos, metodologia, discussão dos resultados e conclusões. O item 8 apresenta as conclusões e o item 9 contém algumas sugestões para estudos futuros visando dar continuidade ao trabalho realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – área

C - comprimento

°C - grau Celsius

CCH - *p*-nitrofenilfosforil-cloro

CCT - Coleção de Cultura Tropical

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CDP - 2-desoxitimidina-5-*p*-nitrofenil

CXY - *p*-nitrofenil- β -D-xilose;

DB - Departamento de Botânica

DGE - Departamento de Genética

DHS – Departamento de Hidráulica e Saneamento

DNA – ácido desoxiribonucleico

D.O. - densidade óptica

DSM - Digital Scanning Microscope

DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EMBL - European Molecular Biology Laboratory

EPS – exopolissacarídeos

f - função

g – grama

GTA – glutaraldeído

GYM - glucose, yeast extract , maltose

h – horas

IB – Instituto de Biologia

ICAGR – Instituto de Ciências Agrárias

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

INT - p - iodonitrotetrazolium formazan

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

L - largura

l – litro

Ln – logarítmo neperiano

M – molar

M2 a M10 – meio melaço de 2 a 10%

MEOR – microbial enhanced oil recovery

mg - miligrama

ml - mililitro

mm - milímetro

nm – nanômetro

PBS - phosphate buffer saline

PCR – polymerase chain reaction

pH - potencial hidrogeniônico

PHB - poli-hidroxi-butirato

rpm - rotação por minuto

SP -São Paulo

UFC - unidade formadora de colônia

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

μm – micrômetro

μ_{\max} – máxima velocidade específica de crescimento

t – tempo

TBSA - ácido tuberculostearico

TCE - tricloroetileno

Tg – tempo de geração

UMB – ultramicrobactérias

v – volume

VBNC – viable but not culturable cells

X_0 – concentração celular inicial

X– concentração celular final

π – pi

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3.

Figura 1. Procedimento adotado para a realização dos experimentos de crescimento da linhagem Lg..... 21

Figura 2. Procedimento adotado para a realização da desnutrição da linhagem Lg..... 24

Capítulo 4.

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem Lc cultivada em caldo nutritivo a 25°C sob agitação constante de 137 rpm. A e B são provenientes de 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente..... 46

Capítulo 5.

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem Lg cultivada em caldo nutritivo a 25°C sob agitação constante de 137 rpm. (a) e (b) são provenientes de 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente..... 67

Figura 2. Crescimento (O.D.₆₀₀) da linhagem Lg em : (a) meio GYM, (b) meio melaço de 2% a 8% (M2 a M8), e (c) meio melaço 9% e 10% (M9 to M10). Os valores representam médias..... 68

Figura 3. (a) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e (b) tempo de geração (Tg) da linhagem Lg em meio GYM e meio melaço de 2% a 10% (M2 a M10). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância..... 69

Capítulo 6.

Figura 1. Crescimento (UFC/mL, ●; D.O.₆₀₀, ■) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 em meio GYM, meio melaço 2%, 6% e 10%. Os valores representam médias..... 88

Figura 2. Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e tempo de geração (Tg) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 em meio GYM e meio melaço de 2%, 6% e 10% (M2 ,M6 e M10), calculados a partir dos dados de densidade óptica (D.O.₆₀₀) (a) e de células viáveis (UFC/ml) (b). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância..... 89

Figura 3. EPS (total, livre e capsular) produzidos por *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios GYM, melação 2% (M2), melação 6% (M6) e melação 10% (M10). (a) do início do experimento até o final da fase exponencial (b) do início do experimento até 24 h de fase estacionária. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância..... 90

Figura 4. EPS (total, livre e capsular) produzidos por unidade de concentração celular de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios GYM, melação 2% (M2), melação 6% (M6) e melação 10% (M10). (a) do início do experimento até o final da fase exponencial (b) do início do experimento até 24 h de fase estacionária. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância..... 91

Capítulo 7.

Figura 1. Viabilidade celular durante o processo de desnutrição de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137. Os valores representam médias..... 106

Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137 durante o processo de desnutrição..... 107

Figura 3. Medidas das células de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137 durante o processo de desnutrição. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância..... 108

Figura 4 – Classes de comprimento (a) e largura (b) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 durante o processo de desnutrição (0, 7 e 56 dias). Valores baseados na medida de 100 células..... 109

Figura 5 – Classes da relação comprimento/largura (a), volume (b) e área (c) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 durante o processo de desnutrição (0, 7 e 56 dias). Valores baseados na medida de 100 células..... 110

LISTA DE TABELAS

Capítulo 4.

Tabela 1. Características bioquímicas da linhagem Lc e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 2002)..... 47

Tabela 2 . Composição de ácidos micólicos da linhagem Lc e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 1999)..... 48

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos da linhagem Lc e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 1999)..... 49

Capítulo 5.

Tabela 1. Características bioquímicas da linhagem Lg e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 2002) quanto à utilização de fontes de carbono.. 66

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 Área de estudo.....	8
Capítulo 2. Objetivos.....	16
Capítulo 3. Materiais e Métodos.....	17
3.1 Linhagens bacterianas.....	17
3.2 Caracterização das linhagens pela abordagem polifásica.....	17
3.21 Caracterização cultural e morfológica.....	17
3.22 Caracterização bioquímica.....	18
3.23 Caracterização quimiotaxonômica.....	19
3.24 Caracterização molecular.....	19
3.3 Análise de fenótipo mucoso.....	19
3.4 Experimentos de crescimento da linhagem Lg.....	20
3.41 Cultivo da linhagem Lg em meio GYM e meio melaço.....	21
3.42 Análise do crescimento.....	22
3.43 Quantificação dos exopolissacarídeos.....	22
3.5 Comportamento da linhagem Lg frente à desnutrição.....	23
3.51 Desnutrição da linhagem Lg.....	23
3.52 Avaliação da viabilidade.....	25
3.53 Avaliação do tamanho celular.....	25
3.54 Avaliação da forma celular.....	26
3.6 Meios de cultura e soluções utilizadas.....	26
Capítulo 4. Caracterização de linhagem de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> isolada de água subterrânea na área de um antigo aterro controlado em região subtropical.....	32
Capítulo 5. Caracterização e cultivo em melaço de cana -de -açúcar de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> CCT 7137, uma nova linhagem isolada de água subterrânea contaminada	50
Capítulo 6. Produção de exopolissacarídeos por <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> CCT 7137, isolada de água subterrânea contaminada, usando melaço de cana-de-açúcar como meio de cultura.....	70
Capítulo 7. Sobrevivência à desnutrição de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> CCT 7137 isolada de água subterrânea contaminada.....	92
8. Conclusões.....	111
9. Sugestões para estudos futuros.....	112

RESUMO

As linhagens Lc (CCT 7277) e Lg (CCT 7137), isoladas da água subterrânea contaminada pelo chorume de um antigo aterro controlado (São Paulo, Brasil) e produtoras de exopolissacarídeos (EPS), foram caracterizadas por taxonomia polifásica. A linhagem Lg teve a) o crescimento e a produção de EPS analisados em meio GYM e em diferentes concentrações de melaço-de-cana de açúcar (entre 2% e 10%) e b) o desempenho avaliado quando submetida ao processo de desnutrição. As análises morfológicas, bioquímicas, quimiotaxonômicas e moleculares mostraram que as linhagens Lc e Lg possuem propriedades típicas da linhagem tipo de *Gordonia polyisoprenivorans* (DSM 44302^T). A análise do número de células viáveis mostrou que o meio GYM foi o que mais favoreceu o crescimento da bactéria ($\mu_{\max} = 0,232 \text{ h}^{-1}$). A produção de EPS, em todos os meios de cultura, iniciou-se durante a fase exponencial e continuou ao longo da fase estacionária de crescimento. Após 24h de fase estacionária foi detectada uma maior produção de EPS total nos meios melaço 6% (172,86 g/l) e 10% (139,47 g/l), uma maior produção de EPS total por unidade de concentração celular no meio melaço 10% ($39,03 \times 10^{-11} \text{ g/UFC}$) e uma maior porcentagem de EPS livre nos meios melaço 2%, 6% e 10% (88,37%, 62,4% e 64,22% do total de EPS, respectivamente). *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 apresentou, como respostas de sobrevivência à desnutrição, redução da densidade de células cultiváveis (13,7% e 3,25% após 7 e 56 dias, respectivamente), redução no volume celular (de 0,55 para 0,33 μm^3) e alteração da forma celular que passou de bastonete para cocobacilar. *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7277 e CCT 7137 constituem duas das seis linhagens de *G. polyisoprenivorans* até então isoladas e as primeiras isoladas de ecossistema brasileiro. Os dados obtidos no presente trabalho mostraram o potencial de *G. polyisoprenivorans* CCT7137 para ser utilizada como ultramicrobactéria em testes em meio poroso e para se estudar a utilização de melaço de cana-de-açúcar como meio nutriente para a produção de EPS *in situ* visando a biorremediação de ambientes impactados, utilizando a tecnologia de biobarreiras.

ABSTRACT

Strains Lc (CCT 7277) and Lg (CCT 7137), isolated from landfill leachate-contaminated groundwater and found to produce exopolysaccharides (EPS), were characterized by polyphasic taxonomy. The growth and EPS production of Lg strain on sugarcane molasses, at concentrations between 2% and 10% and on the standard GYM medium were studied and its responses to nutrient starvation were analysed. Morphological, biochemical, chemotaxonomic and molecular tests indicated that Lc and Lg have properties typical of *Gordonia polyisoprenivorans* DSM 44303^T. Viable cell counts revealed that GYM medium was the best for growth ($\mu_{\max} = 0,232 \text{ h}^{-1}$). EPS production started during the exponential phase and continued during the stationary phase, in all culture media. After 24h of stationary phase, *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 showed a highest total EPS production in 6% (172,86 g/l) and 10% (139,47 g/l) sugarcane molasses media, a highest EPS production for unit of cellular concentration in 10% sugarcane molasses medium ($39,03 \times 10^{11} \text{ g/UFC}$) and a highest percentage of free EPS in 2%, 6% e 10% sugarcane molasses media (88,37%, 62,4% e 64,22%, respectively). *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 showed three responses to nutrient starvation: a decrease in the cell viability (13,7% and 3,25% after 7 and 56 days respectively), a reduction in cell size (from 0,55 to 0,33 μm^3) and a cell shape change (from rod to coccobacillus). *G. polyisoprenivorans* CCT 7277 and CCT 7137 are two of six strains of *G. polyisoprenivorans* so far isolated and recorded in the literature, and the first strains found in a Brazilian ecosystem. The data presented here suggest the potential of *G. polyisoprenivorans* CCT7137 to be used as ultramicrobacteria in porous media experiments such as to aim for the study of sugarcane molasses as nutrient source for *in situ* EPS to biorremediate contaminated sites through the biobarrier technology.

Capítulo 1.

INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A população humana cresceu drasticamente na segunda metade do século XX, de 2 bilhões de pessoas em 1930 para 5,6 bilhões em 1995, tornando-se uma séria ameaça ambiental, uma vez que a poluição faz parte da história da humanidade e os maiores exemplos de poluição estão associados às atividades antrópicas (Brendecke & Pepper 1996).

O ambiente antrópico se concentra na superfície do globo terrestre e é extremamente dependente da interação entre os sistemas solo – água – atmosfera (Pepper 1996). A água está presente nos três sistemas sendo que, da água doce existente no planeta (3% do total), 95% é representado por água subterrânea, 3,5% por água superficial e 1,5% por umidade (Canter *et al.* 1988). Ainda que grande parte da população mundial dependa de fontes subterrâneas de água não contaminada (Gibert *et al.* 1994), a água subterrânea vem sofrendo crescente contaminação, a partir do solo e das águas superficiais por metais pesados, ácidos, nitrogênio, fósforo e substâncias orgânicas naturais e xenobióticas (Notenboom *et al.* 1994). Segundo estes mesmos autores, entre as fontes de contaminação estão: a aplicação de fertilizantes e pesticidas, a deposição de resíduos urbanos, industriais e de mineração, redes de esgoto e a deposição atmosférica.

Uma área contaminada pode ser relativamente estável, podendo, porém, apresentar riscos futuros se não remediada (Romanatschuk *et al.* 2000). As técnicas utilizadas para a remediação de solo e águas subterrâneas contaminados fazem parte de três categorias (Brusseu & Miller 1996): a) técnicas de contenção, onde a pluma contaminante é controlada para evitar a propagação da contaminação, lançando mão de barreiras físicas ou hidráulicas

instaladas no solo; b) técnicas de remoção, onde o contaminante é transferido do local da contaminação para um ambiente controlado; e c) técnicas de tratamento, onde o contaminante é transformado em material inócuo por processo químico ou biológico. O tratamento da área contaminada pode ser conduzido *ex situ*, após a remoção do solo ou da água ou *in situ*, no próprio local da contaminação. Segundo os autores, cada técnica tem suas vantagens e desvantagens sendo que, muitas vezes, uma ação de remediação envolve técnicas das três categorias.

A biorremediação vem apresentando destaque e consiste na utilização de organismos, principalmente microrganismos, para degradar contaminantes ou para prevenir a poluição pelo tratamento de resíduos (Atlas 1995). A biorremediação reúne técnicas que lançam mão de reatores e leiras de compostagem (*ex situ*), da inoculação de culturas bacterianas (*ex situ* ou *in situ*), da adição de nutrientes, e da adição de oxigênio (Boopathy 2000) ou de compostos liberadores de oxigênio, como por exemplo peróxido de cálcio (*in situ*) (Kao *et al.* 2003), para estimular a atividade microbiana. A biorremediação apresenta limitações, como por exemplo a existência de compostos químicos não degradáveis, a produção de metabólitos tóxicos associados à metabolização de contaminantes e a complexidade do ambiente solo que exige uma abordagem interdisciplinar para garantir o sucesso. Entretanto, este processo vem recebendo cada vez mais atenção pois, quando comparado a outras tecnologias, apresenta baixo custo, pode ser aplicado *in situ*, reduz a perturbação ambiental, elimina os resíduos de forma definitiva, tem maior aceitação pública e pode ser acoplado a tratamentos físicos e químicos (Boopathy 2000). Além disso, na tentativa de superar as limitações, foram feitas tentativas para otimizar a biodegradação de contaminantes que na natureza ocorre lentamente (Alexander 1994), tais como o isolamento de novos microrganismos com capacidade biodegradativa superior aos isolados anteriormente (Atlas 1995), e tentativas de melhorar os processos envolvidos no tratamento biológico. Neste contexto, vem sendo investigado o papel

de microrganismos produtores de exopolissacarídeos (EPS) na prevenção e na remediação ambiental.

Os EPS, ao serem sintetizados, podem permanecer aderidos à superfície celular formando uma cápsula ou serem liberados no meio adjacente como um material amorfo (Sutherland 1990). Os EPS possuem grande importância ecológica para os organismos que os produzem, uma vez que estão associados à proteção contra a dessecação (Roberson & Firestone 1992), predadores e agentes antimicrobianos e associados à captação e acúmulo de nutrientes (Costerton 1999). Sutherland (2001) destaca a importância dos EPS como os principais componentes estruturais dos biofilmes que, por sua vez, constituem o habitat natural de muitas comunidades microbianas, tanto em ambientes naturais como artificiais, onde um substrato sólido permanece exposto à umidade. Os EPS formam uma matriz polimérica onde as células encontram-se distribuídas, permitindo o fluxo de nutrientes, enzimas, metabólitos e outros solutos por todo o biofilme, já que apresenta canais que separam as microcolônias. Além disso, funciona como reserva de nutrientes essenciais, como cátions que são captados do ambiente uma vez que, em sua maioria, os EPS são de natureza aniônica. Assim sendo, a matriz do biofilme pode ser considerada como um sistema enzimático imobilizado, porém dinâmico.

Os microrganismos produtores de exopolissacarídeos, como os microrganismos diretamente envolvidos nos processos de biodegradação, têm sido isolados dos mais diversos ambientes, devido ao seu uso potencial como fonte de biopolímeros de interesse industrial, e como alternativa ao uso de microrganismos geneticamente modificados para a produção de novos EPS para fins específicos (Muralidharan & Jayachandran 2003). Entre as aplicações já estabelecidas para os EPS microbianos, destacam-se a fabricação de gazes cicatrizantes, filmes para cobertura de alimentos, estabilizantes de espumas para bebidas, agentes hidratantes para produtos cosméticos e farmacêuticos e agentes de controle de viscosidade de

lamas de perfuração (Sutherland 1998). No âmbito ambiental, além da já estabelecida aplicação dos EPS microbianos como floculantes para a clarificação de água (Sutherland 1998), sabe-se que os mesmos são fundamentais nos processos de tratamento de águas residuárias (Houghton *et al.* 1999).

A grande maioria dos estudos com produção de EPS tem sido conduzida com culturas puras de linhagens patogênicas ou de interesse industrial e, apesar de não ser possível generalizar respostas obtidas para uma espécie (Wachenheim & Patterson 1992), algumas considerações gerais podem ser feitas: a) a síntese de EPS é influenciada por variáveis ambientais como temperatura, pH, oxigênio, fonte de carbono, que podem ser utilizadas para regular a produção de EPS para os diferentes fins (Linton 1990; Ebube *et al.* 1992; Ricciardi *et al.* 2002; López *et al.* 2002; Nampoothiri *et al.* 2003); b) a estrutura dos EPS sintetizados é, de forma geral, independente do substrato utilizado, embora a mesma, em espécies capazes de produzir mais de um tipo de EPS, seja influenciada pela fonte de carbono (Sutherland 1990); c) a fase de crescimento na qual os EPS são produzidos varia conforme o microrganismo (Sutherland 1990); d) a partir da compreensão da biossíntese dos EPS, existem etapas específicas que podem ser utilizadas para ser feito o controle da produção dos mesmos (Looijesteijn *et al.* 1999); e) existe a possibilidade de se utilizar sub-produtos agroindustriais, como por exemplo água de maceração de milho e melão, como substratos alternativos para a produção de EPS, visando uma redução dos custos de produção de EPS e a utilização de tecnologias limpas (Sutherland 1996); f) os EPS apresentam a propriedade de acumular metais e o mecanismo está sendo elucidado para uma possível utilização na detoxificação de locais contaminados por metais tóxicos (Kachalany *et al.* 2001; Ozdemir *et al.* 2003). Estudos com biofilmes compostos por comunidades biodegradativas revelaram ainda que os EPS apresentam a propriedade de acumular poluentes ambientais, como por exemplo o herbicida

diclofop, quando o mesmo foi fornecido como única fonte de carbono (Wolfaardt *et al.* 1995; Wolfaardt *et al.* 1998).

Segundo Houghton *et al.* (1999), técnicas que foram aperfeiçoadas em outras áreas da microbiologia estão permitindo estabelecer a composição dos biopolímeros, entender a formação de biofilmes e a sorção de poluentes e, assim, esclarecer o papel que os biopolímeros exercem nos processos de tratamento. Além disso, as bactérias produtoras de EPS vêm sendo estudadas para serem utilizadas na tecnologia de biobarreiras para biorremediação *in situ* de áreas contaminadas, com base no conhecimento adquirido sobre as mesmas nos últimos 15 anos (Blenkinsopp & Costerton 1991).

A tecnologia de biobarreiras se baseia na formação de biofilmes e, portanto, na capacidade natural das bactérias de produzirem EPS. As biobarreiras propiciam uma barreira biológica, formada pelas bactérias e os EPS por elas produzidos, que separa áreas adjacentes do ambiente subterrâneo, impedindo que uma pluma contaminante se propague (Lappin-Scott & Costerton 1992). Este processo é possível uma vez que, tanto em meios porosos (solo) como em meios fraturados (rocha), os biofilmes propiciam o tamponamento e a conseqüente diminuição da permeabilidade do meio (Shaw *et al.* 1985; Ross *et al.* 2001).

Os estudos conduzidos em escala laboratorial com microorganismos produtores de EPS para o tamponamento de meios porosos e fraturados, após o estímulo dos mesmos pela injeção de nutrientes, mostraram a aplicação potencial das biobarreiras. Dennis & Turner (1998) mostraram a formação de biobarreiras em meio poroso pelo estímulo da produção de EPS por uma única espécie bacteriana (*Beijerinckia indica*) e Kim (2004) mostrou a formação de biobarreiras com uma bactéria (*Azotobacter chroococcum*) e com um fungo (*Aureobasidium pullulans*). Esses dois estudos são de fundamental importância, pois avaliaram a resistência das biobarreiras formadas frente às condições adversas como dessecação (Dennis & Turner 1998), alterações na temperatura (de - 4°C a 5°C) (Kim 2004) e

pH ácido (pH 3) e básico (pH 11) (Dennis & Turner 1998; Kim 2004). Para a aplicação de biobarreiras, uma vez que o biofilme é formado e que a condutividade hidráulica do meio é reduzida, é importante que o tamponamento seja mantido sob diferentes condições ambientais (Kim 2004). Kim (2004) mostrou que a biobarreira formada pelo fungo (*A. pullulans*) foi mais sensível à substâncias químicas e à alterações na temperatura do que a formada pela bactéria (*A. chroococcum*).

Além dos estudos com culturas puras, Ross *et al.* (2001) mostraram a possibilidade de formar biobarreiras em meios fraturados pelo estímulo de microrganismos nativos, pela adição de nutrientes. É importante salientar que, recentemente, tem surgido a preocupação de tentar modelar matematicamente a formação de biobarreiras para auxiliar no delineamento de estratégias mais eficientes. Chen-Charpentier & Kojouhanov (2003) modelaram o fluxo de água, o transporte de nutrientes e contaminantes bem como a formação de uma biobarreira constituída por uma bactéria formadora de biofilme (*Klebsiella oxytoca*) e uma bactéria degradadora de tricloroetileno (TCE) (*Burkholderia cepacia*). Dessa maneira, a bactéria formadora de biofilme é usada para estabelecer a biobarreira que reduz o transporte do contaminante; este, por sua vez, vai ser degradado pela bactéria degradadora imobilizada na mesma.

A tecnologia de biobarreiras está diretamente relacionada com a indústria petrolífera, que utiliza a denominação “tamponamento seletivo” para a técnica na qual os microrganismos produtores de polímeros auxiliam a extração de óleo dos reservatórios, alterando a permeabilidade dos mesmos (Bryant & Burchfield 1989). Para este fim, os microrganismos isolados do ambiente são submetidos a um processo de seleção baseado em experimentos de laboratório. Na etapa de campo, os microrganismos são injetados no reservatório juntamente com os nutrientes apropriados para estimular o crescimento e a produção do metabólito desejado (Khire & Khan 1994).

Ao longo das pesquisas relacionadas com a indústria petrolífera, foram realizadas pesquisas que visaram o aumento da profundidade de penetração das bactérias e do tamponamento seletivo de áreas permeáveis em reservatórios de óleo. Com esses objetivos, Lappin-Scott *et al.* (1988) e MacLeod *et al.* (1988) propuseram a injeção de bactérias de tamanho reduzido pela desnutrição, e que tiveram seu tamanho normal e a produção de EPS restabelecida pela injeção de nutrientes, propiciando o tamponamento do meio poroso ou do perfil de rocha. Essas bactérias de tamanho reduzido são denominadas ultramicrobactérias ou UMB (Torrella & Morita 1981). Em ambientes naturais como oceanos, solos, aquíferos aonde não há quantidade suficiente de energia, as bactérias podem entrar em um estado de desnutrição, análogo à formação de esporos, que garante a sobrevivência das espécies (Morita 1988). Durante este estado podem ocorrer diferentes respostas, entre as quais a redução de tamanho com consequente formação de UMB (Lappin-Scott & Costerton 1990), já observada por Novitsky & Morita (1976). Assim sendo, realizando estudos sobre as respostas das bactérias frente à desnutrição, foi proposta a utilização de bactérias que reduzem de tamanho formando UMB para penetrar mais profundamente no solo e nas rochas (Lappin-Scott & Costerton 1990), não só para a extração de óleo, mas também para a biorremediação através da formação de biobarreiras ou da injeção no solo de linhagens degradadoras de contaminantes ambientais (Lappin-Scott & Costerton 1992). Segundo Blenkinsopp & Costerton (1991), outra alternativa é associar a utilização de UMB degradadoras de contaminantes com a técnica de biobarreiras. Apesar desta tecnologia já ter sido testada em grande escala pela equipe do Dr. J.W. Costerton junto à Universidade de Montana, no Center for Biofilm Engineering (Watanabe 1996), a literatura sobre o tema é incipiente.

1.2 ÁREA DE ESTUDO

O antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (SP) está localizado entre os paralelos 47° 45' - 47° 55' W de longitude e 22° 00' - 22° 15' S de latitude (Prado et al, 1981). A cidade de São Carlos utilizou durante 17 anos uma voçoroca para a disposição final de resíduos domiciliares, industriais e de serviços da área da saúde. Entre 1979 e 1988 os resíduos foram depositados a céu aberto, em 1988 os resíduos passaram a ser aterrados, em 1990 o aterro controlado deixou de receber os resíduos da área da saúde que passaram a ser incinerados e, em 1996, o aterro foi fechado (Gadotti 1997). Atualmente, os resíduos da cidade estão sendo despejados em um aterro sanitário, e a área do antigo aterro controlado está sendo utilizada para a pastagem de búfalos. Apesar do aterro controlado em questão, ter sido desativado há 8 anos, ele constitui um dos maiores problemas de ação antrópica na região pois está situado acima do ponto de captação de água da cidade de São Carlos e em área de recarga do aquífero Botucatu, hoje denominado Guarani (Gonçalves 1992), que apresenta altos índices de vulnerabilidade à contaminação (Hirata *et al.* 1990). A partir da detecção de uma pluma contaminante proveniente do aterro controlado em questão (Ellert *et al.* 1990), diversos estudos foram realizados e mostraram a influência do mesmo nas águas subterrâneas adjacentes (Bossolan 1992; Menezes 1995; Gadotti 1997; Fusconi & Godinho 1999). A pesquisa mais recente mostrou que a influência do aterro ainda persiste (Polaz 2004), corroborando com um estudo que mostrou que a infiltração do chorume pode perdurar, em média, por até 18 anos após a desativação de aterros (Xu *et al.* 1999).

A Prefeitura Municipal de São Carlos realizou em 2004 um relatório sobre a situação do antigo aterro controlado, visando a catalogação da área junto ao banco de dados de áreas contaminadas da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Tendo em vista o problema da contaminação da água subterrânea adjacente ao antigo aterro controlado

da cidade de São Carlos (SP), a necessidade de soluções para os problemas relacionados à geração e deposição final de resíduos e o baixo número de estudos realizados em águas subterrâneas de ambientes sub-tropicais, está sendo conduzido, junto ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos (LEMA) da UFSCar o projeto intitulado “Microbiologia de águas subterrâneas adjacentes ao antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (SP): monitoramento das populações de bactérias e estudos sobre o potencial de linhagens bacterianas para a utilização em processos biotecnológicos”, do qual o presente trabalho faz parte.

Referências Bibliográficas

- Alexander, M. 1994 *Biodegradation and Bioremediation*. p. 302. San Diego: Academic Press Inc. ISBN 0-12-049860-X
- Atlas, R.M. 1995 Bioremediation. *Contamination & Environment* **3**, 32-42.
- Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W. 1991 Understanding bacterial biofilms. *Trends in Biotechnology* **9**, 138-143.
- Boopathy, R. 2000 Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**, 63-67.
- Bossolan, N.R.S. 1993 *Aspectos ecológicos das populações bacterianas em águas subterrâneas sob o efeito de um aterro controlado*. Dissertação, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, UFSCar, São Carlos, Brasil.
- Brendecke, J.W. & Pepper, I.L. 1996 The extent of global pollution. In *Pollution Science*, eds. Pepper, I.L., Gerba, C.P. & Brusseau, M.L. pp. 3-8. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-550660-0

- Brusseau, M.L. & Miller, R.M. 1996 Remediation. In *Pollution Science*, eds. Pepper, I.L., Gerba, C.P. & Brusseau, M.L. pp. 151-168. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-550660-0
- Bryant, R.S. & Burchfield, T.E. 1989 Review of microbial technology for improving oil recovery. *SPE Reservoir Engineering* **5**, 151-154.
- Canter, L.W., Knox, R.C. & Fairchild, D.M. 1988 *Groundwater quality protection*. p. 562. Michigan: Lewis Publishers.
- Chen-Charpentier, B.M. & Kojouharov, H.V. 2003 Numerical simulation of dual-species biofilms in porous media. *Applied Numerical Mathematics* **47**, 377-389.
- Costerton, J.W. 1999 The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **22**, 551-563.
- Dennis, M.L. & Turner, J.P. 1998 Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* **124**, 120-127.
- Ebube, N.K., Udeala, O.K. & Ghobashy, A.A. 1992 Isolation and characterization of a novel polysaccharide from *Bacillus licheniformis* NCIB 11634. *Journal of Industrial Microbiology*, **9**, 239-245.
- Ellert, N., Ross, S., Mendes, J.M.B. & Martín, E. 1990 Mapeamento geofísico do lixão de São Carlos. In *Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas: Anais de um congresso brasileiro em Porto Alegre, Brasil*. Associação Brasileira de Águas Subterrâneas. pp. 82-88.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J.L. 1999 Bacteria and protozoa populations in groundwater in a landfill area in São Carlos, SP. *Revista de Microbiologia* **30**, 196-202.
- Gadotti, R.F. 1997 *Avaliação da contaminação das águas superficiais e subterrâneas adjacentes ao lixão da cidade de São Carlos*. Dissertação, Hidráulica e Saneamento USP, São Carlos, Brasil.

- Gibert, J., Stanford, J.A., Dole-Olivier, M.-J. & Ward, J.V. 1994 Basic attributes of groundwater ecosystems and prospects for research. In *Groundwater ecology*, eds Gibert, J., Danielopol, D.L. & Stanford, J.A. pp. 7-40. London: Academic Press. ISBN 0-12-282110-6
- Gonçalves, A.R.L. 1986 *Geologia ambiental da área de São Carlos*. Dissertação, Instituto de Geociências USP, São Paulo, Brasil.
- Hirata, R.C.A., Bastos, C.R.A., Rocha, G.A., Gomes, D.C. & Iritani, M.A. 1990 Groundwater pollution risk and vulnerability map of the São Paulo State - Brazil. In *International Seminar of Pollution Protection and Control of Groundwater: Anais de congresso internacional ocorrido em Porto Alegre, Brasil*. pp. 236 - 246.
- Houghton, J.I. & Quarmby, J. 1999 Biopolymers in wastewater treatment. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 259-262.
- Kachlany, S.C., Levery, S.B, Kim, J.S, Reuhs, B.L., Lion, L.W. & Ghiorse, W.C. 2001 Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology* **3**, 774-784.
- Kao, C.M., Chen, S.C., Wang, J.Y., Chen, Y.L. & lee, S.Z. 2003 Remediation of PCE-contaminated aquifer by na in situ two-layer biobarrier: laboratory batch and column studies. *Water Research* **37**, 27-38.
- Khire, J.M. & Khan, M.I. 1994 Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanism of MEOR. *Enzyme and Microbial Technology* **2**, 170-172.
- Kim. G. 2004 Hydraulic conductivity change of bio-barrier fomed in the subsurface by the adverse conditions including freeze-thaw cycles. *Cold Regions Science and Thecnology* **38**, 153-164.

- Lappin-Scott, H.M., Cusack, F. & Costerton, J.W. 1988 Nutrient resuscitation and growth of starved cells in sandstone cores: a novel approach to enhanced oil recovery. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1373-1382.
- Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1990 Starvation and penetration of bacteria in soils and rocks. *Experientia* **46**, 807-812.
- Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1992 Ultramicrobacteria and their biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* **3**, 283-285.
- Linton, J.D. 1990 The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the production organism. *FEMS Microbiological Reviews* **75**, 1-18.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T. & Hugenholtz, J. 2001 Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5003-5008.
- López, E., Ramos, I. & Sanromán, M.A. 2003 Extracellular polysaccharides production by *Arthrobacter viscosus*. *Journal of Food Engineering* **60**, 463-467.
- MacLeod, F.A., Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1988 Plugging of a model rock system by using starved bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1365-1372.
- Menezes, D.B. 1995 *Diagnóstico dos impactos do depósito de resíduos sólidos de São Carlos - SP, no meio físico*. Dissertação, São Carlos, 1995. Hidráulica e Saneamento USP, São Carlos, Brasil.
- Morita, R.Y. 1988 Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation in nature. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 436-440.
- Muralidharan, J. & Jayachandran, S. 2003 Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Process Biochemistry* **38**, 841-847.

- Nampoothiri, K.M., Singhanian, R.R., Sabarinath, C. & Pandey, A. 2003 Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry* **38**, 1513-1519.
- Notenboom, J., Plénet, S. & Turquin, M.J. 1994 Groundwater contamination and its impact on groundwater animals and ecosystems. In *Groundwater ecology*, eds Gibert, J., Danielopol, D.L. & Stanford, J.A. pp. 477-504. London: Academic Press. . ISBN 0-12-282110-6
- Novitsky, J.A. & Morita, R.Y. 1976 Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Applied and Environmental Microbiology* **32**, 617-622.
- Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N., Isler, R. & Cosar, T. 2003 Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresource Technology* **90**, 71-74.
- Pepper, I.L. 1996 Abiotic characteristics of soil. In *Pollution Science*, eds. Pepper, I.L., Gerba, C.P. & Brusseau, M.L. pp. 9-18. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-550660-0
- Polaz, C. N. M., Fusconi, R. & Godinho, M. J. L. 2004. Análise comparativa de populações bacterianas de águas subterrâneas antes e depois da desativação de um aterro controlado em São Carlos (SP). *IX Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental*, Curitiba.
- Prado, H., Oliveira, J.B. & Almeida, C.L.F. 1981 Levantamento pedológico semi - detalhado do estado de São Paulo: quadrícula de São Carlos. Instituto Agrônomo, Campinas.
- Racy F.P.P. 2004 *Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios*. Dissertação, PPG-ERN, 63, UFSCar, São Carlos, Brasil.
- Ricciardi, A., Parente, E., Crudele, M.A., Zanetti, F., Scolari, G. & Mannazzu, I. 2002 Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and

- preliminary characterization of the polymer. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 297-308.
- Robertson, E.B. & Firestone, M.K. 1992 Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1284-1291.
- Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjälä, K. & Haahtela, K. 2000 Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution* **107**, 179-185.
- Ross, N., Villemur, R., Deschênes, L. & Samson, R. 2001 Clogging of a limestone fracture by stimulating groundwater microbes. *Water Research* **35**, 2029-2037.
- Shaw, J.C., Bramhill, B., Wardlaw, N.C., Costerton, J.W. 1985 Bacterial fouling in a model core system. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 693-701.
- Sutherland, I.W. 1990 *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. pp. 70-88. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-36350-0.
- Sutherland, I.W. 1996 Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 249-261.
- Sutherland, I.W. 1998 Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**, 41-46.
- Sutherland, I.W. 2001 The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS in Microbiology* **9**, 222-227.
- Torrella, F. & Morita, R.Y. 1981 Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 518-527.

- Wachenheim, D.E. & Patterson, J.A. 1992 Anaerobic production of extracellular polysaccharide by *Butyrivibrio fibrisolvens* nyx. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 385-391.
- Watanabe, M.E. 1996 Starved bacteria investigated as bioremediation, biobarrier technology. *Environmental Science & Technology* **30**, 333.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D. & Caldwell, D.E. 1995 Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 152-158.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D. & Caldwell, D.E. 1998 In situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microbial Ecology* **35**, 213-223.

Capítulo 2.

OBJETIVOS

- Verificar a classificação taxonômica de duas linhagens de bactérias (Lc e Lg), isoladas da água subterrânea adjacente ao antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (SP);
- Avaliar o crescimento e a produção de EPS da linhagem Lg em meio melaço de cana - de - açúcar;
- Avaliar o desempenho da linhagem Lg submetida à desnutrição.

Capítulo 3.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS

As linhagens Lc e Lg foram isoladas de águas subterrâneas adjacentes ao antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (SP) e selecionadas como bactérias produtoras de exopolissacarídeos (EPS) (Fusconi & Godinho 2002). As linhagens Lc e Lg foram depositadas junto à CCT (Coleção de Cultura Tropical - Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, Brasil) com os números CCT 7277 e CCT 7137, respectivamente.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS PELA ABORDAGEM POLIFÁSICA

As linhagens Lc e Lg foram caracterizadas e classificadas pela taxonomia polifásica, baseada em características fenotípicas e genotípicas.

3.21 Caracterização cultural e morfológica

A morfologia celular foi analisada a partir de imagens feitas em microscopia eletrônica de varredura (Digital Scanning Microscope – DSM 960, Zeiss) após 24 e 48 h de cultivo, em caldo nutritivo a 25°C e agitação constante de 137 rpm, e 50 células medidas manualmente utilizando-se o software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). A metodologia utilizada para a preparação das amostras para as análises em microscopia eletrônica de varredura, foi baseada em Araújo (1995) e Bratbak (1993), segundo o protocolo abaixo.

1. As amostras foram fixadas, a uma concentração final de 2,5% (v/v), com uma solução estoque de glutaraldeído 10% (v/v) diluída em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 gelado. Após a fixação, as amostras foram deixadas 6 horas na geladeira (4°C) e, em seguida, foram filtradas em membranas de policarbonato de 0,22µm de porosidade;
2. As células retidas nas membranas foram lavadas três vezes com 3 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,3 gelado que foi deixado 10 minutos sobre as membranas antes de ser filtrado;
3. As células lavadas foram desidratadas com 3 ml de uma série de soluções de etanol (v/v: etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol 100%) que foram deixadas durante 10 minutos sobre as membranas antes da filtração. O procedimento com a solução de etanol 100% foi repetido três vezes;
4. As membranas foram retiradas do conjunto de filtração, cortadas e coladas com esmalte incolor no suporte apropriado para a análise e, em seguida, foram transferidas para a estufa de secagem a 37 ± 1 °C por 12 a 14 horas;
5. As amostras foram recobertas com ouro (Sputter Coater, Balzers SCD – 050) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (Digital Scanning Microscope – DSM 960, Zeiss).

Os aspectos culturais foram analisados após 7 dias de incubação em ágar nutritivo a 25°C.

Testes microbiológicos de rotina como reação de Gram, relação com o oxigênio, redução de nitrato, oxidase, catalase, motilidade e formação de esporos foram realizados segundo métodos padrão descritos por Smibert & Krieg (1994).

3.22 Caracterização bioquímica

A análise da utilização de diferentes fontes de carbono pelas linhagens Lc e Lg foi realizada junto à DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,

Braunschweig, Alemanha) em placas padrão de microtitulação (Greiner) (Kämpfer *et al.* 1990 modificado por Linos *et al.* 1999).

3.23 Caracterização quimiotaxonômica

As análises quimiotaxonômicas das linhagens Lc e Lg, foram realizadas junto à DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha). Os aminoácidos da parede celular foram analisados em cromatografia de camada delgada segundo Stanek & Roberts (1974), os ésteres metílicos dos ácidos graxos por cromatografia gasosa segundo Miller (1982), Sasser (1990) e Kämpfer & Kroppenstedt (1996) e os ácidos micólicos segundo Klatte *et al.* (1994), por cromatografia gasosa.

3.24 Caracterização molecular

A extração de DNA genômico e a amplificação por PCR foram realizadas segundo descrito em Rainey *et al.* (1996) e a seqüência parcial rDNA 16S das linhagens Lc e Lg foi comparada com seqüências representativas de actinomicetos obtidas da EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

3.3 ANÁLISE DE FENÓTIPO MUCOSO

Afim de selecionar a linhagem para os experimentos de crescimento, produção de EPS e desnutrição foi utilizando o desenvolvimento recorrente da mucosidade das colônias como indicador de produção de EPS (Chan *et al.* 1984; Junkins & Doyle 1992; Dupont *et al.* 2000). A análise da mucosidade das colônias das linhagens Lc e Lg foi feita em cultivo de 7 dias a 25 °C, em meio ágar melaço 2%, 6% e 10%, meio ágar GYM e ágar nutritivo, tocando-se a colônia com uma alça de platina e observado-se a formação de um fio de muco.

3.4 EXPERIMENTOS DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM Lg

Foram realizados três experimentos de crescimento da linhagem Lg em meio GYM e meio melação:

Experimento 1 – cultivo da linhagem Lg em meio GYM e meio melação em concentrações que variaram de 2 a 10% para análise do crescimento. Durante o cultivo foram retiradas, periodicamente, alíquotas para o monitoramento do crescimento celular pela análise da absorbância (D.O.₆₀₀).

Experimento 2 – cultivo da linhagem Lg em meio GYM e meio melação 2, 6 e 10% para uma análise mais detalhada do crescimento da bactéria. Durante o cultivo foram retiradas, periodicamente, alíquotas para o monitoramento do crescimento celular pela análise da absorbância (D.O.₆₀₀) e pela análise do número de células viáveis (UFC/ml), estimado pelo método de microgotas (Collins *et al.* 1995). As placas com ágar nutritivo, contendo 6 microgotas de 5µl para cada diluição testada, foram incubadas a 25°C de 48 a 72 horas e as microcolônias, presentes em cada microgota, contadas.

Experimento 3 – cultivo da linhagem Lg em meio GYM e melação 2, 6 e 10% para a análise da produção de EPS segundo o item 3.54. Durante o cultivo foram retiradas alíquotas para o monitoramento do crescimento celular pelo número de células viáveis, estimado pelo método de microgotas (Collins *et al.* 1995), e para a quantificação dos EPS. O monitoramento desses parâmetros foi realizado em três pontos amostrais: ponto 1 - início do experimento (tempo zero); ponto 2 - final da fase exponencial; ponto 3 - fase estacionária (24 horas após a retirada do ponto 2). Esses pontos amostrais foram selecionados a partir da análise dos resultados obtidos no experimento 2.

3.41 Cultivo da linhagem Lg em meio GYM e meio melaço

Todos os experimentos de crescimento da linhagem Lg foram padronizados segundo a Figura 1: a linhagem Lg foi repicada em ágar nutritivo, a partir de uma cultura estoque mantida a 4 °C e, incubada durante 7 dias a 25°C. Uma alça padrão de massa celular foi retirada dessa cultura e ressuspendida em 10 ml de caldo nutritivo. Desta suspensão, 7,5 ml foram transferidos para erlenméiers de 500 ml contendo 142,5 ml de caldo nutritivo, obtendo-se uma pré-cultura, da qual foi retirado o inóculo, durante a fase exponencial (26 a 28 h de crescimento). Assim, o inóculo (11ml) foi transferido para erlenméiers de 1000 ml, contendo 209 ml de meio a ser utilizado (meio GYM e meio melaço). O inóculo, padronizado em 0,3 de absorbância (D.O.₆₀₀), apresentou 10^7 UFC/ml. Os cultivos foram em aerobiose a 25°C, sendo que as culturas em meio líquido foram mantidas com agitação constante de 137 rpm, segundo Kondo *et al.* (2000).

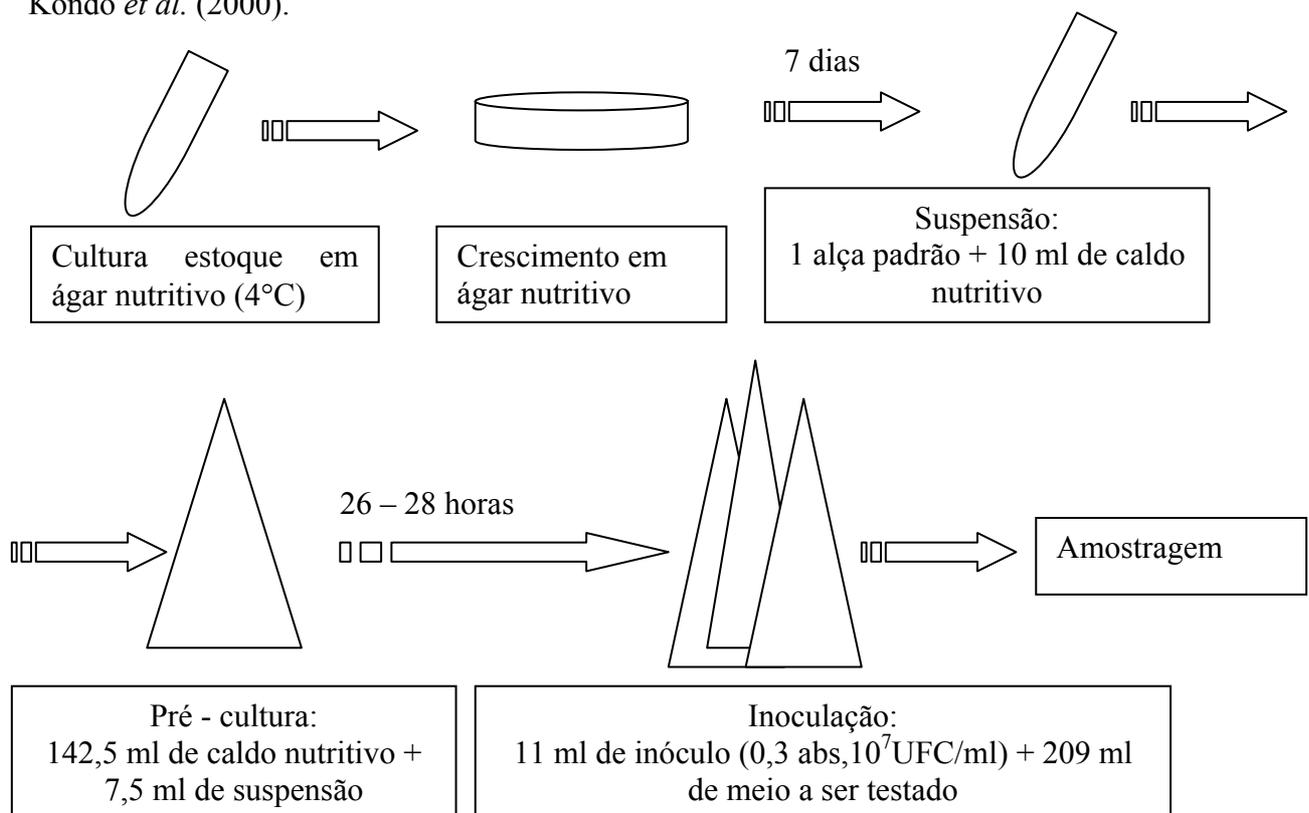


Figura 1. Procedimento adotado para a realização dos experimentos de crescimento da linhagem Lg.

3.42 Análise do crescimento

O crescimento bacteriano foi avaliado pelo monitoramento da densidade óptica ($D.O_{600}$), através da qual foram calculados: (a) a relação X/X_0 ou seja, entre a densidade óptica em cada tempo de amostragem (X) e a densidade óptica no início do experimento (X_0); (b) a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}) obtida por regressão linear de uma função gráfica $\ln X/X_0 = f(t)$, utilizando quatro pontos experimentais consecutivos, e indicada pelo coeficiente de correlação r (Borzani 1993); (c) o tempo de geração (T_g) calculado a partir da equação $\mu_{max} = \ln 2/T_g$. Os experimentos foram conduzidos com três repetições de cada meio e os resultados analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

3.43 Quantificação dos exopolissacarídeos

As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm de porosidade para a retirada das células, e dializadas em membranas de celulose (peso molecular entre 12000 a 16000 Daltons) durante 48 horas em água destilada, trocada três vezes ao dia para a eliminação dos açúcares residuais do meio de cultura. Os carboidratos totais das amostras foram analisados pelo método do ácido sulfúrico-fenol (Dubois *et al.* 1956), a fim de estimar a quantidade de EPS total, livre e capsular, adicionando-se 0,7 ml de fenol 3% e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado à 0,5 ml de amostra. Para a determinação do EPS total as amostras permaneceram em banho-maria a 98°C durante 1 hora para a liberação do EPS capsular. Os EPS livre e capsular foram quantificados diretamente pelo método do ácido sulfúrico-fenol, sendo que o EPS capsular foi determinado pela subtração da concentração de EPS livre do EPS total (Hannemann 1994). Os valores de EPS foram calculados pela subtração da quantidade de carboidratos totais interferentes encontrados no meio de cultura sem inóculo, das quantidades encontradas no meios de cultivo (Kimmel &

Roberts 1998; Bergmaier *et al.* 2003). A quantidade de EPS foi expressa em g/l utilizando glicose como padrão e a produção por unidade de concentração celular de EPS foi calculada com base na contagem de células viáveis e expressa em g/UFC. Os experimentos foram conduzidos com três repetições de cada meio e os resultados analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

3.5 COMPORTAMENTO DA LINHAGEM Lg FRENTE À DESNUTRIÇÃO

3.51 Desnutrição da linhagem Lg

A desnutrição da linhagem Lg foi realizada segundo o esquema mostrado na Figura 2. Antes da desnutrição, foi realizada uma pré-cultura da linhagem Lg para a obtenção do inóculo.

A bactéria foi repicada em ágar nutritivo, a partir de uma cultura estoque mantida a 4° C, e incubada durante 7 dias a 25°C. Uma alça padrão de massa celular foi retirada dessa cultura e ressuspensa em 10 ml de caldo nutritivo. Desta suspensão, 7,5 ml foram transferidos para três erlenméiers de 500 ml contendo 142,5 ml de caldo nutritivo que foram incubados até a cultura atingir a fase exponencial de crescimento (26 a 28 h). De uma das réplicas da pré-cultura foram retiradas duas alíquotas de 50 ml, que foram transferidas, respectivamente, para dois tubos de centrífuga. Assim acondicionadas, as células foram separadas do meio de cultura e lavadas com PBS estéril antes de serem inoculadas nos frascos contendo a solução para a desnutrição. Para a separação das células, as duas alíquotas de 50 ml foram centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C (Centrífuga Sorval, RC5C Plus), o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas passaram pelo processo de lavagem. As células sedimentadas em cada tubo foram ressuspensas em 50 ml de PBS estéril e centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C (Centrífuga Sorval, RC5C

Plus). O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram lavadas por mais duas vezes.

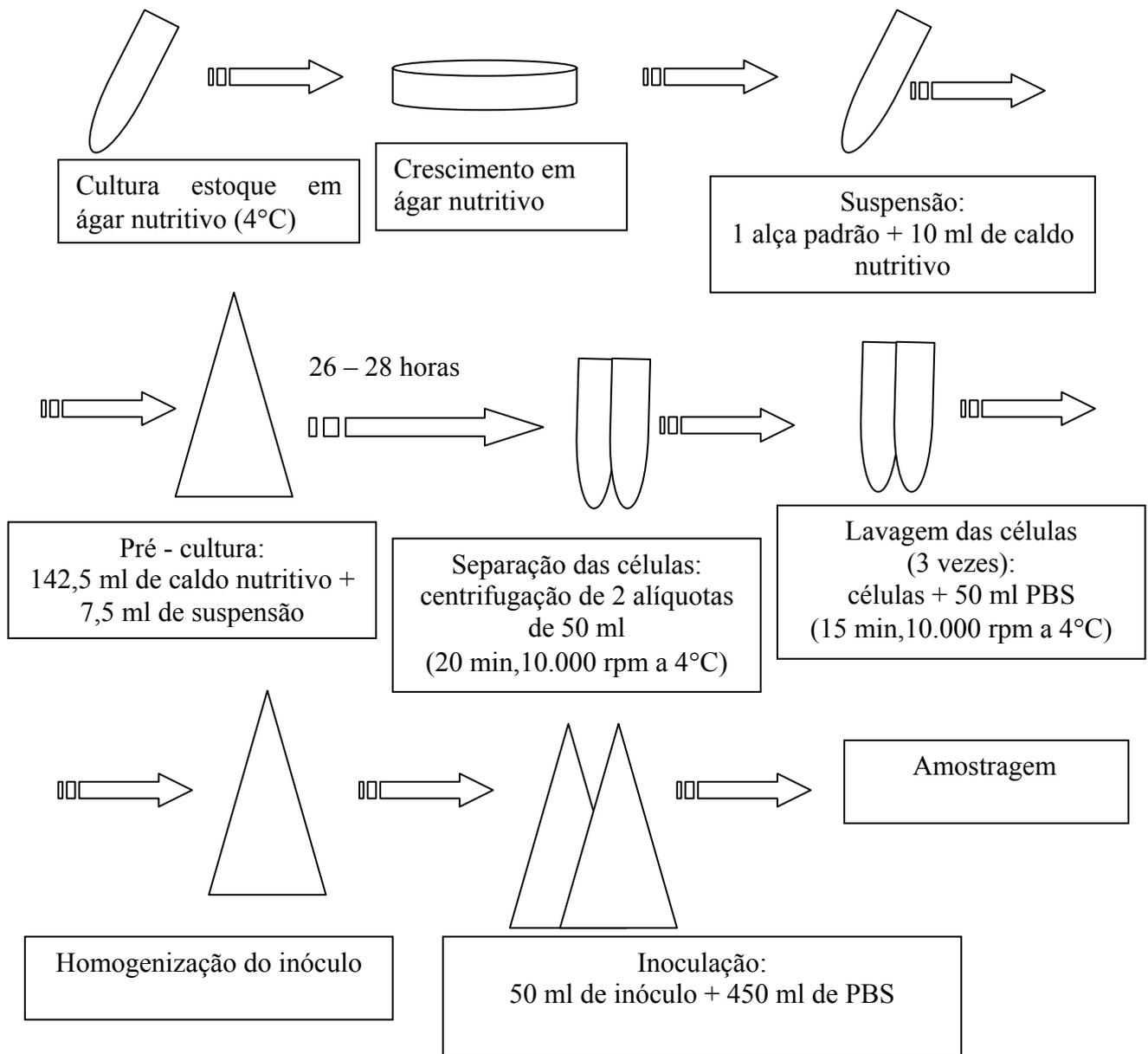


Figura 2. Procedimento adotado para a realização da desnutrição da linhagem Lg.

Após a terceira lavagem, as células de cada tubo foram ressuspensas em 50 ml de solução PBS estéril e, o conteúdo de cada tubo, transferido para um erlenmeyer estéril contendo uma barra magnética.

O inóculo assim preparado foi agitado até o desaparecimento dos grumos de células. Duas alíquotas de 50 ml do inóculo foram transferidas, respectivamente, para dois erlenméiers de 1000 ml contendo 450 ml de solução PBS estéril e uma barra magnética. Os erlenméiers foram mantidos à temperatura ambiente e agitação constante e foram amostrados periodicamente para a avaliação da viabilidade, tamanho e forma celular.

3.52 Avaliação da viabilidade

A viabilidade celular foi avaliada, ao longo do processo de desnutrição, pela análise da densidade de células cultiváveis (UFC/ml) estimada pelo método de microgotas (Collins *et al.* 1995). As placas com ágar nutritivo, contendo 6 microgotas de 5µl para cada diluição testada, foram incubadas a 25°C por 48 a 72 h, após o que foram contadas as microcolônias presentes em cada microgota.

3.53 Avaliação do tamanho celular

O tamanho celular foi analisado a partir de imagens feitas em microscopia eletrônica de varredura (Digital Scanning Microscope – DSM 960, Zeiss) no início (T₀) e após 7 (T₇), 28 (T₂₈), 42 (T₄₂) e 56 (T₅₆) dias de desnutrição. A metodologia utilizada para a preparação das amostras para as análises em microscopia eletrônica de varredura foi baseada em Araújo (1995) e Bratbak (1993), como no item 3.31.

O comprimento e a largura de 50 células de cada réplica foram medidas utilizando-se o software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Para análise do tamanho das células, além das medidas de comprimento e largura, foi calculada a razão comprimento/largura, o volume e a área.

Para o cálculo do volume e a área foi utilizada a fórmula matemática que representa a morfologia de bastonetes, ou seja, cilindro com lados paralelos e as correspondentes calotas nas extremidades.

Volume do cilindro: $V = (\pi/4) \cdot L^2 (C - L/3)$ (Bolter *et al.* 1993)

Área do cilindro: $A = \pi \cdot C \cdot L$ (Sun & Liu 2003)

Onde, C representa o comprimento e L a largura da célula.

Os resultados foram analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

3.54 Avaliação da forma celular

A forma celular foi definida pela razão comprimento/largura segundo Racy (2004): a) entre 1,0 e 1,25 para cocos; b) entre 1,26 e 1,75 para cocobacilos; c) entre 1,76 e 5,0 para bastonetes e d) maior que 5,0 para filamentos.

3.6 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

a) Ágar nutritivo (g/l)

Peptona (5,0); extrato de carne (3,0); ágar (15,0). pH 7,0.

b) Caldo nutritivo (g/l)

Peptona (5,0); extrato de carne (3,0). pH 7,0.

c) Meio GYM (do inglês: “glucose, yeast extract , maltose”) (g/l)

Glicose (4,0); extrato de levedura (4,0); extrato de malte (10,0). pH 7,0.

d) Meio melaço

O melaço de cana de açúcar utilizado para a preparação do meio de cultura foi fornecido pela Usina São Francisco (Sertãozinho, São Paulo) e mantido em geladeira.

Antes da preparação do meio de cultura, o melaço foi clarificado para a eliminação dos resíduos sólidos interferentes (Mattos *et al.* 1997): o melaço foi diluído em peso com água destilada (1:1) e, em seguida, foi adicionado ao mesmo uma solução de fosfato de sódio monobásico (1,5 g/l). Este preparado foi autoclavado a 121°C por 30 minutos, para que ocorresse a precipitação. Após um período de decantação de 24 horas, a fase líquida foi sifonada, colocada em frascos e congelada. A concentração de sacarose do melaço bruto e do melaço clarificado foi medida com o auxílio de um refratômetro (Zeiss).

Para a preparação do meio de cultura em diferentes concentrações de sacarose, o melaço clarificado foi descongelado e diluído em volumes apropriados de água destilada conforme a concentração desejada. Em seguida o pH foi ajustado em $7,0 \pm 0,2$ e o meio de cultura foi autoclavado.

e) Solução estoque de glutaraldeído (GTA)

O GTA 25% foi diluído em tampão fosfato para obter uma solução estoque de GTA 10% que foi armazenada em geladeira.

f) Tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3)

Solução A - Solução de fosfato de sódio dibásico 0,1M: 2,682 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ em 100 ml de água destilada filtrada em membrana 0,22 μm .

Solução B - Solução de fosfato de sódio monobásico 0,1M: 1,38g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ em 100ml de água destilada filtrada em membrana 0,22 μm .

Para obter o pH em 7,3 foram misturados 77ml da solução A com 23ml da solução B e, caso necessário, o pH foi corrigido com uma das soluções. A solução de tampão fosfato foi armazenada em geladeira.

g) Solução salina tamponada com fosfato (do inglês phosphate buffer saline ou PBS) (g/l)

Cloreto de sódio (8,5); fosfato de potássio dibásico (1,23); fosfato de sódio monobásico (0,4).

Referências Bibliográficas

- Araújo, J.C. 1995 *Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado em esgoto sanitário sintético*. Dissertation, Hidráulica e Saneamento USP, São Carlos, Brazil.
- Bergmaier, D., Champagne, C.P. & Lacroix, C. 2003 Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1049-1057.
- Bolter, M., Möller, R. & Dzomla, W. 1993 Determination of bacterial biovolume with epifluorescence microscopy: comparison of size distributions from image analysis and size classifications. *Micron* **24**, 31-40.
- Borzani, W. 1993 Objective criteria to confirm the existence of the exponential growth phase in a batch microbial process. *Revista de Microbiologia* **24**, 278-280.
- Bratbak, G. 1993 Microscope methods for measuring bacterial biovolume, epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, eds. Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. pp. 309-317. Boca Raton: Lewis Publishers. ISBN 0-873-715640
- Chan, R., Lam, J.S., Costerton, J.W. 1984 Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* **19**, 8-16.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. & Grange, J.M. 1995 *Collin's and Lyne's Microbiological Methods*. p. 493. Oxford: Butterworth - Heinemann. ISBN 0-7506-0653-3.

- Dubois, M., Gilles, L.A., Hamilton, J.K., Reberes, P.A. & Smith, F. 1956 Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Dupont, I., Roy D. & Lapointe, G. 2000 Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **24**, 251-255.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J. L. 2002 Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 363-369.
- Hannemann, T.F. 1994 *Effects of carbon source on bacterial exopolysaccharide production under denitrifying conditions*. Dissertação, Department of Civil and Environmental Engineering, Washington State University, Washington, EUA.
- Junkins, A.D. & Doyle, M.P. 1992 Demonstration of exopolysaccharide production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **25**, 9-17.
- Kämpfer, P., Dott, W. & Kroppenstedt, R.M. 1990 Numerical classification and identification of some nocardioform bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **6**, 309-391.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R.M. 1996 Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 989-1005.
- Kimmel, S.A. & Roberts, F.R. 1998 Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 87-92.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R.M. & Rainey, F.A. 1994 *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus*-species. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 355-360.

- Kondo, T., Yamamoto, D., Yokota, A., Suzuki, A., Nagasawa, H. & Sakuda, S. 2000 Gordonan, an acidic polysaccharide with cell aggregation-inducing activity in insect BM-N4 cells, produced by *Gordonia* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2388-2394.
- Linos, A., Steinbüchel, A., Spröer, C. & Kroppenstedt, R.M. 1999 *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1785-1791.
- Mattos, K.A., Volpon, A.G.T., Previato, L.M. & Previato, J.O. 1997 *Aplicação de microrganismos produtores de biopolímeros na recuperação de petróleo, avaliação do melão como fonte alternativa para a produção de biopolímeros*. Technical report CENPES/SEBIO, Rio de Janeiro, Brazil.
- Miller, L.T. 1982 Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 584-586.
- Racy, F.P.P. 2004 *Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios*. Dissertação, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, São Carlos, SP.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M. & Stackebrandt, E. 1996 The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage, proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 1088-1092.
- Sasser, M. 1990 Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsletters* **20**, 1-6.

- Smibert, R.M. & Krieg, N.R. 1994 Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology*, eds. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. & Krieg, N.R. pp. 607-654. Washington: American Society for Microbiology Press. ISBN 1-555-81048-9
- Staneck, J.L. & Roberts, G.D. 1974 Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology* **28**, 226-231.
- Sun, J. & Liu, A.D. 2003 Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* **25**, 1331–1346.

Capítulo 4.

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM DE *GORDONIA POLYISOPRENIVORANS* ISOLADA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA NA ÁREA DE UM ANTIGO ATERRO CONTROLADO EM REGIÃO SUBTROPICAL

Roberta Fusconi^{1*}; Mirna Januária Leal Godinho¹; Isara Lourdes Cruz Hernández¹; Nelma Regina Segnini Bossolan²

¹Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; ²Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

*Corresponding author: Mailing Address: Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luís Km 235, 13565-905. Caixa Postal 676. São Carlos, SP, Brasil. E-mail: rfusconi@iris.ufscar.br

Resumo

A linhagem Lc (CCT 7277), isolada da água subterrânea adjacente a um antigo aterro controlado em região sub-tropical, foi caracterizada e identificada por taxonomia polifásica. As células em forma de bastonete, ocorreram isoladas ou aos pares em formato de V, típico de bactérias corineformes, apresentaram reação Gram positiva, catalase positiva, oxidase negativa, não apresentaram motilidade e não formaram esporos. O organismo apresentou crescimento tanto em aerobiose quanto em anaerobiose na presença de NaNO₃. As características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e quimiotaxonômicas apresentadas pela linhagem são típicas do gênero *Gordonia* e perfil de ácidos micólicos e graxos correspondentes aos de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T. A análise do seqüenciamento das primeiras 500 bases do rDNA 16S da linhagem Lc mostrou uma similaridade de 100% com a linhagem tipo de *Gordonia polyisoprenivorans* DSM 44302^T. Até então, cinco linhagens de *G. polyisoprenivorans* foram isoladas de diferentes ambientes em diferentes partes do planeta sendo, *G. polyisoprenivorans* CCT 7277, a quinta descrita e a segunda isolada da água subterrânea adjacentes ao antigo aterro controlado em questão.

Palavras chave: *Gordonia polyisoprenivorans*, águas subterrâneas, aterro controlado, região sub-tropical

Introdução

O gênero *Gordonia*, proposto por Tsukamura (1971), faz parte do grupo de actinomicetos produtores de ácidos micólicos (ácidos graxos de alto peso molecular), cuja classificação passou por uma série de revisões, até que o seqüenciamento do rDNA 16S mostrou que os mesmos formavam um grupo homogêneo dentro da ordem *Actinomycetales*, estando alocados atualmente, na subordem *Corynebacterineae* (Stackebrandt *et al.* 1997).

Nas últimas décadas houve um grande interesse na identificação de bactérias do gênero *Gordonia* devido, em grande parte, ao seu potencial biotecnológico. Esse gênero apresenta envolvimento com a biodegradação de contaminantes ambientais através de vias metabólicas relacionadas à oxidação de hidrocarbonetos (Kummer *et al.* 1999; Xue *et al.* 2003), à degradação de borracha (Linos *et al.* 1999; Linos *et al.* 2002), à dessulfurização de compostos aromáticos (Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2000), entre outras. Além das características metabólicas que revelaram seu potencial para a biorremediação, espécies de *Gordonia* foram selecionadas para a síntese de compostos químicos como lisina (Kyriacou *et al.* 1997) e de um exopolissacarídeo denominado gordonan (Kondo *et al.* 2000).

Frente à necessidade de remediar os efeitos negativos do antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (São Paulo, Brasil), situado em área de recarga do aquífero Guarani (Fusconi & Godinho 1999), foi iniciado um programa de isolamento de linhagens bacterianas produtoras de exopolissacarídeos das águas subterrâneas adjacentes ao mesmo (Fusconi & Godinho 2002). Considerando os usos potenciais de membros das espécies do gênero *Gordonia* em processos de biorremediação, o presente trabalho teve como objetivo relatar a detecção e a caracterização, pela taxonomia polifásica, de uma linhagem de *Gordonia sp.* (linhagem Lc) isolada das águas subterrâneas da área em questão.

Materiais e Métodos

Linhagem bacteriana

A linhagem estudada foi isolada, de água subterrânea contaminada por chorume, durante um período de triagem para a seleção de bactérias produtoras de exopolissacarídeos, na área do antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (SP, Brasil) (Fusconi & Godinho 2002). A linhagem foi depositada junto à Coleção de Cultura Tropical (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, Brasil) com o número CCT 7277.

Caracterização da linhagem bacteriana

A morfologia celular foi analisada em microscopia eletrônica de varredura, após 24 e 48 horas de incubação em caldo nutritivo a 25°C e agitação constante de 137 rpm, e , as células medidas utilizando-se o software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Os aspectos culturais foram avaliados após 7 dias de incubação em ágar nutritivo e em meio ágar GYM a 25°C. Os testes microbiológicos de rotina como reação de Gram, utilização de oxigênio, redução de nitrato, oxidase, catalase, motilidade e formação de esporos foram realizados segundo métodos padrão descritos por Smibert & Krieg (1994).

A análise da utilização de diferentes fontes de carbono, dos caracteres quimiotaxonômicos e o seqüenciamento do rDNA 16S foram realizados junto à DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha). A avaliação da utilização das fontes de carbono foi realizada em placas padrão de microtitulação (Greiner) segundo Kämpfer *et al.* (1990) modificado por Linos *et al.* (1999). Os aminoácidos da parede celular foram analisados segundo Stanek & Roberts (1998) e os esters metílicos dos ácidos graxos segundo descrito anteriormente (Miller 1982; Sasser 1990; Kämpfer & Kroppenstedt 1996) e

os ácidos micólicos segundo Klatte *et al.* (1994). A extração de DNA genômico e a amplificação por PCR foram realizadas segundo descrito em Rainey *et al.* (1996) e a seqüência parcial rDNA 16S da linhagem Lc foi comparada com seqüências representativas de actinomicetos obtidas da EMBL .

Microscopia eletrônica de varredura

A metodologia para as análises em microscopia eletrônica de varredura, foi baseada em Araújo (1995) e Bratbak (1993), segundo o protocolo abaixo.

1. As amostras foram fixadas, a uma concentração final de 2,5% (v/v), com uma solução estoque de glutaraldeído 10% (v/v) diluída em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 gelado. Após a fixação, as amostras foram deixadas 6 horas na geladeira (4°C) e, em seguida, foram filtradas em membranas de policarbonato de 0,22µm de porosidade;
2. As células retidas nas membranas foram lavadas três vezes com 3 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,3 gelado que foi deixado 10 minutos sobre as membranas antes de ser filtrado;
3. As células lavadas foram desidratadas com 3 ml de uma série de soluções de etanol (v/v: etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol 100%) que foram deixadas durante 10 minutos sobre as membranas antes da filtração. O procedimento com a solução de etanol 100% foi repetido três vezes;
4. As membranas foram retiradas do conjunto de filtração, cortadas e coladas com esmalte incolor no suporte apropriado para a análise e, em seguida, foram transferidas para a estufa de secagem a 37 ± 1 °C por 12 a 14 horas;
5. As amostras foram recobertas com ouro (Sputter Coater, Balzers SCD – 050) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (Digital Scanning Microscope – DSM 960, Zeiss).

Resultados

As células da linhagem Lc apresentaram reação positiva para Gram e catalase, negativa para oxidase. O organismo não reduziu nitrato, não apresentou motilidade e esporos. Cresceu em condições aeróbias como anaeróbias em presença de NaNO₃. As células em forma de bastonete, ocorreram isoladas ou aos pares em formato de V, típico de bactérias corineformes (Figura 1). O tamanho médio das células, após 24 h de cultivo em caldo nutritivo a 25°C sob agitação de 137 rpm, foi de $2,15 \pm 0,54 \times 0,57 \pm 0,05 \mu\text{m}$ e, após 48 horas sob as mesmas condições de incubação, foi de $1,16 \pm 0,22 \times 0,61 \pm 0,05 \mu\text{m}$ mostrando uma redução na relação comprimento/largura de $3,80 \pm 1,04$ para $1,93 \pm 0,43$, respectivamente. Quando cultivadas em ágar nutritivo e meio GYM as colônias apresentaram coloração creme rosada e duas variantes morfológicas: colônias de superfície rugosa e aspecto seco e colônias de superfície lisa e aspecto mucoso. Após exposição à luz durante 7 dias, a pigmentação das colônias ficou mais forte, tornando-se rosa alaranjada.

Os resultados dos testes bioquímicos revelaram que a linhagem Lc utilizou 13 das 32 fontes de carbono testadas e que, dentre os compostos testados para hidrólise, apenas *p*-nitrofenil- β -D-xilose apresentou reação positiva (Tabela 1). Pela análise dos resultados dos testes bioquímicos, observou-se maior similaridade da linhagem Lc com *Gordonia polyisoprenivorans*, embora algumas diferenças foram observadas: (a) a linhagem Lc não utilizou ácido D-glicosamínico, D-turanose, caprato, citrato, L-alanine, L-aspartato, L-prolina or quinato; (b) a linhagem Lc hidrolizou *p*-nitrofenil- β -D-xilose; (c) ao contrário de *G. polyisoprenivorans* que apresentou reação variável na utilização de tiroamina, a linhagem Lc apresentou reação positiva; (d) a linhagem Lc não utilizou caprato ou 4-aminobutirato, fontes de carbono não determinadas para *G. polyisoprenivorans*.

A parede celular da linhagem apresentou como o único ácido, o ácido *meso*-diaminopimélico. As cadeias dos ácidos micólicos variaram de 57 a 64 átomos de carbono com C₆₀ e C₆₂ como os principais ácidos micólicos (Tabela 2). Apresentou ácidos graxos saturados e insaturados não ramificados, ácido tuberculostearico (TBSA) e os ácidos palmítico (C_{16:0}), oleico (*cis*-9 C_{18:1}) e TBSA foram os principais ácidos graxos (Tabela 3)

A seqüência parcial de rDNA 16S foi determinada sendo que a análise das primeiras 500 bases do rDNA 16S da linhagem Lc revelou uma similaridade de 100% com a linhagem tipo de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T.

Discussão

A linhagem Lc apresentou características morfológicas, bioquímicas e propriedades quimiotaxônomias típicas do gênero *Gordonia* (Stakebrandt *et al.* 1988), perfil de ácidos micólicos e ácidos graxos correspondentes aos de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T e uma alta similaridade da seqüência das primeiras 500 bases do rDNA 16S com a linhagem tipo de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (Linos *et al.* 1999), passando a ser denominada *G. polyisoprenivorans* CCT 7277.

De acordo com a classificação hierárquica proposta por Stakebrandt *et al.* (1997) para os actinomicetos, o gênero *Gordonia* está classificado como sendo da classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*, família *Gordoniaceae*.

Assim como os membros do gênero *Gordonia* (Stakebrandt *et al.* 1988), a linhagem testada apresentou coloração de Gram positiva, micélio, motilidade e esporos ausentes, catalase positiva, oxidase negativa, ácido *meso*-diaminopimélico como único ácido da parede celular, ácidos micólicos contendo entre 48 e 66 átomos de carbono, ácidos graxos saturados e insaturados, não ramificados e ácido tuberculostearico (TBSA). A linhagem apresentou

colônias lisas e mucosas, como na descrição da espécie por Linos *et al.* (1999) e também uma variante de superfície rugosa e aspecto seco, já detectada nas linhagens VH2 (Arenskötter *et al.* 2001; Linos *et al.* 1998) e Y2K (Arenskötter *et al.* 2001) de *G. polyisoprenivorans*.

Inicialmente, linhagens de *Gordonia* isoladas de pacientes com infecções pulmonares foram descritas como patógenos oportunistas (Tsukamura 1971). Entretanto, novas espécies foram isoladas de diferentes habitats terrestres e aquáticos, em diferentes regiões do planeta. *Gordonia hydrophobica* (Bendinger *et al.* 1995) e *Gordonia nitida* foram isoladas de águas residuárias na Coreia (Yoon *et al.* 2000), *Gordonia hirsuta* de filtros biológicos na Alemanha (Klatte *et al.* 1996), *Gordonia rhizosphaera* da rizosfera de mangróvias no Japão (Takeuchi & Hatano 1998), *Gordonia desulfuricans* de solo na Inglaterra (Kim *et al.* 1999), *G. alkanivorans* de solo contaminado por alcatrão e fenol na Alemanha (Kummer *et al.* 1999), *G. namibiensis* de solo na África (Brandão *et al.* 2001), *G. paraffinivorans* de um reservatório de óleo na China (Xue *et al.* 2003), *G. polyisoprenivorans* (Linos *et al.* 1999) e *G. westfalica* (Linos *et al.* 2002) de pneus deteriorados na Alemanha, entre outras. Os diferentes locais nos quais essas linhagens foram isoladas sugere, por sua vez, a grande diversidade metabólica característica da família *Gordoniaceae*, diversidade esta já comprovada em diversos estudos (Kummer *et al.* 1999; Lee *et al.* 2001; Linos *et al.* 1999; Xue *et al.* 2003).

Até então, seis linhagens de *G. polyisoprenivorans* foram isoladas de diferentes regiões geográficas do globo terrestre. Três linhagens apresentaram propriedade de degradar substratos de borracha: a linhagem VH2 (DSM 44266) que foi isolada a partir de solo de uma plantação de seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Vietnã (Linos & Steinbüchel 1998); a linhagem Kd2 (DSM 44302) que foi isolada a partir de água do interior de um pneu deteriorado na Alemanha (Linos & Steinbüchel 1998); e a linhagem Y2K que foi isolada de uma cultura mista, considerada anteriormente como sendo uma cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa*, degradadora de borracha (Linos *et al.* 2000), também isolada da água do interior

de um pneu deteriorado na Alemanha (Linos *et al.* 1999). A quarta linhagem foi isolada recentemente de amostra clínica (amostra de sangue do cateter de Hickman de paciente com septicemia após transplante de medula) (Kempf *et al.* 2004). A quinta, a linhagem Lg (*G. polyisoprenivorans* CCT 7137), isolada da água subterrânea adjacente ao antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (Brasil) (Fusconi & Godinho 2002) e cuja classificação taxonômica vai ser publicada em detalhes separadamente, ainda não teve seu potencial de degradação de borracha investigado. A sexta linhagem, caracterizada no presente trabalho (linhagem Lc), também foi isolada por Fusconi & Godinho (2002) do mesmo ambiente que *G. polyisoprenivorans* CCT 7137. Assim sendo, *G. polyisoprenivorans* CCT 7277 constitui a segunda linhagem de *G. polyisoprenivorans* detectada na água subterrânea em questão.

A linhagem Lc (CCT 7137) apresentou características morfológicas, bioquímicas e quimiotaxonômicas típicas de *Gordonia sp.*, e a análise das primeiras 500 bases do rDNA 16S revelou uma alta similaridade com a linhagem tipo de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T, sendo portanto, identificada como uma linhagem de *G. polyisoprenivorans*. *G. polyisoprenivorans* CCT 7277 é a sexta linhagem de *G. polyisoprenivorans* citada na literatura e a segunda isolada da água subterrânea em questão. Tendo em vista o potencial da família *Gordoniaceae* para aplicação biotecnológica, tanto para a biorremediação de contaminantes ambientais como para a síntese de compostos químicos, é de fundamental importância o isolamento destes organismos nos diferentes ambientes, a documentação de sua ocorrência e o estudo de suas propriedades metabólicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Brasil) e ao PPG-ERN (UFSCar, Brasil) pelo suporte financeiro; aos Doutores R.M. Kroppenstedt (DSMZ, Alemanha) e E.P. Gianotti (USP, Brasil), pela assistência nas metodologias utilizadas e à D.C.D. Javarotti, pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas

- Araújo, J.C. 1995 *Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado em esgoto sanitário sintético*. Dissertation, Hidráulica e Saneamento USP, São Carlos, Brazil.
- Arenskötter, M., Baumeister, D., Berekaa, M.M., Pötter, G., Kroppenstedt, R.M., Linos, A. & Steinbüchel, A. 2001 Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 277-282.
- Bendinger, B., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Moormann, M. & Klatte, S. 1995 *Gordonia hydrophobica* sp. nov., isolated from biofilters for waste-gas treatment. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 544-548.
- Brandão, P.F.B., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Bull, A.T. & Goodfellow, M. *Gordonia namibiensis* sp. nov., a novel nitrile metabolizing actinomycete recovered from an African sand. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 510-515.
- Bratbak, G. 1993 Microscope methods for measuring bacterial biovolume, epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, eds. Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. pp. 309-317. Boca Raton: Lewis Publishers. ISBN 0-873-715640
- Fusconi, R. & Godinho, M.J.L. 1999 Bacteria and protozoa populations in groundwater in a landfill area in São Carlos, SP. *Revista de Microbiologia*, **30**, 196-202.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J. L. 2002 Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 363-369.

- Kämpfer, P., Dott, W. & Kroppenstedt, R.M. 1990 Numerical classification and identification of some nocardioform bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **6**, 309-391.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R.M. 1996 Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 989-1005.
- Kempf, V.A.J., Schmalzing, M., Yassin, A.F., Schaal, K.P., Baumeister, D., Arenskötter, M. & Steinbüchel, A. 2004 *Gordonia polyisoprenivorans* septicemia in a bone marrow transplant patient. *European. Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **23**, 226-228.
- Kim, S.B., Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S.C. & Goodfellow, M. 1999 *Gordonia desulfuricans* sp. nov. a benzothiophene-desulphurizing actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1845-1851.
- Kim, S.B., Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S.C., Iliarionov, S. & Goodfellow, M. 2000 *Gordonia amicalis* sp. nov. a novel dibenzothiophene-desulphurizing actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 2031-2036.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R.M. & Rainey, F.A. 1994 *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus*-species. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 355-360.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Altendorf, K. & Rainey, F.A. 1996 *Gordonia hirsuta* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 876-880.
- Kondo, T., Yamamoto, D., Yokota, A., Suzuki, A., Nagasawa, H. & Sakuda, S. 2000 Gordonan, an acidic polysaccharide with cell aggregation-inducing activity in insect BM-N4 cells, produced by *Gordonia* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2388-2394.

- Kummer, C., Schumann, P. & Stackebrandt, E. 1999 *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**:1513-1522.
- Kyriacou, A., Balis, C. & Typas, M.A. 1997 Improvement of lysine production by analog-sensitive and auxotroph mutants of the acetylene-utilizing bacterium *Gordonia bronchialis* (*Rhodococcus bronchialis*). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **66**, 281-289.
- Lee, J.J., Rhee, S-K. & Lee, S-T. 2001 Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4342-4345.
- Linos, A. & Steinbüchel, A. 1998 Microbial degradation of natural and synthetic rubbers by novel bacteria belonging to the genus *Gordonia*. *Kautschuk Gummi Kunststoffstoffe* **51**, 496-499.
- Linos, A., Steinbüchel, A., Spröer, C. & Kroppenstedt, R.M. 1999 *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1785-1791.
- Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A. 2000 A Gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic *cis*-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters* **182**, 155-161.
- Linos, A., Berekaa, M.M., Steinbüchel, A., Kim, K.K., Spröer, C. & Kroppenstedt, R.M. 2002 *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 1133-1139.
- Miller, L.T. 1982 Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 584-586.

- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M. & Stackebrandt, E. 1996 The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage, proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 1088-1092.
- Sasser, M. 1990 Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsletters* **20**,1-6.
- Smibert, R.M. & Krieg, N.R. 1994 Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology*, eds. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. & Krieg, N.R. pp. 607-654. Washington: American Society for Microbiology Press. ISBN 1-555-81048-9
- Stackebrandt, E., Smida, J. & Collins, M.D. 1988 Evidence of phylogenetic heterogeneity within the Genus *Rhodococcus*, revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). *Journal of General and Applied Microbiology* **34**, 341-348.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. & Ward-Rainey, N.L. 1997 Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.
- Staneck, J.L. & Roberts, G.D. 1974 Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology* **28**, 226-231.
- Takeuchi, M. & Hatano, K. 1998 *Gordonia rhizosphaera* sp. nov. isolated from the mangrove rhizosphere. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 907-912.
- Tsukamura, M. 1971 Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. *Journal of General Microbiology* **68**, 15-26.
- Xue, Y., Sun, X., Zhou, P., Liu, R., Liang, F. & Ma, Y. 2003 *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon – degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1643-1646.

Yoon, J.-H., Lee, J.J., Kang, S.-S., Takeuchi, M., Shin, Y.K., Lee, S.T., Kang, K.H. & Park Y.-H. 2000 *Gordonia nitida* sp. nov., a bacterium that degrades 3-ethylpyridine and 3-methylpyridine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1203-1210.

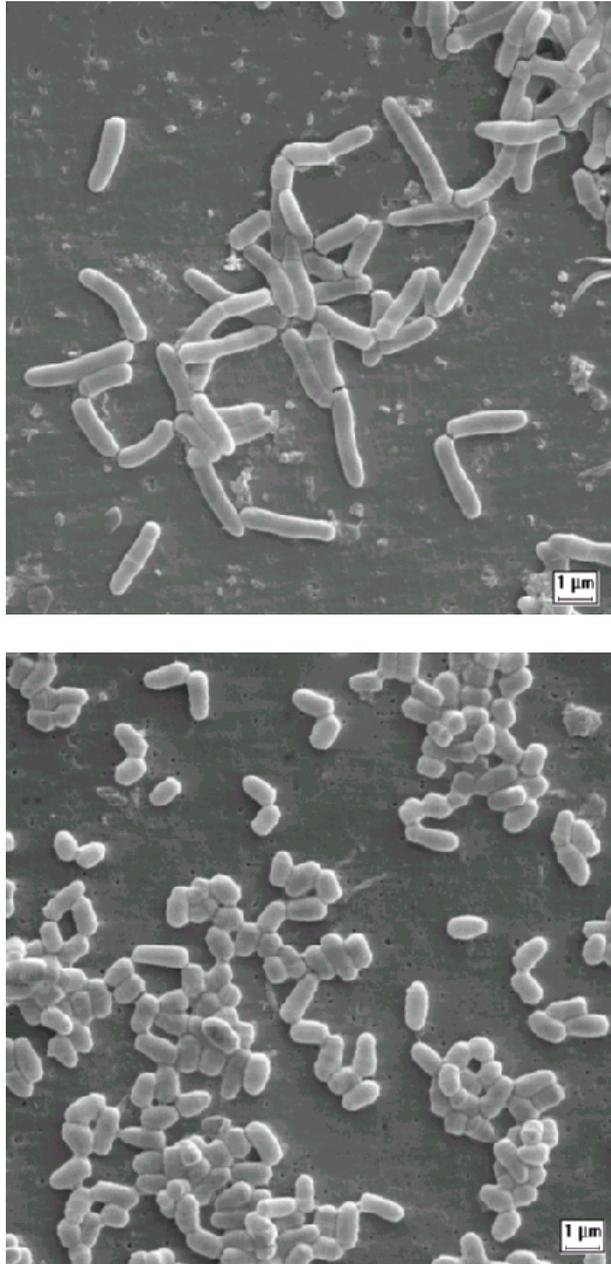


Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem Lc cultivada em caldo nutritivo a 25°C sob agitação constante de 137 rpm. A e B são provenientes de 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente.

Tabela 1. Características bioquímicas da linhagem Lc e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos et al. 2002).

Linhagens: 1, *G. aichiensis* DSM 43978^T; 2, *G. alkanivorans* DSM 44369^T; 3, *G. amarae* DSM 43392^T; 4, *G. amicalis* DSM 44461^T; 5, *G. bronchialis* DSM 43247^T; 6, *G. desulfuricans* DSM 44462^T; 7, *G. hirsuta* DSM 44140^T; 8, *G. hydrophobica* DSM 44015^T; 9, *G. nitida* DSM 44499^T; 10, *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T; 11, *G. rhizosphaera* DSM 44383^T; 12, *G. rubripertincta* DSM 43197^T; 13, *G. sputi* DSM 43896^T; 14, *G. terrae* DSM 43249^T; 15, *G. westfalica* DSM 44215^T; 16, linhagem Lc. CXY, *p*-nitrofenil- β -D-xilose; CCH, *p*-nitrofenilfosforil-cloro; CDP, 2-desoxitimidina-5-*p*-nitrofenil; nd, não determinado; v, reação variável.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Utilização de:																
N-Acetil-D-Glicosamina	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
D – Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Glucarato	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Gluconato	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Ácido D-Glicosamínico	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
L-Ramnose	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
D-Ribose	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
D-Sacarose	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Turanose	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Caprato	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	-	nd	-	v	+	-	+	-
D-Arabitól	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
I-Inositol	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Citrato	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
2-Hidroxivalerato	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2-Oxoglutarato	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
Pimelato	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
L-Alanina	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
4-Hidroxibenzoato	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
L-Aspartato	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
L-Leucina	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Prolina	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
L-Serina	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Valina	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Putrescina	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Tiroamina	-	+	nd	+	-	+	nd	nd	+	v	+	-	-	-	-	+
Acetamida	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Benzoato	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
3-Hidroxibenzoato	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
4-Aminobutirato	+	-	nd	-	-	+	nd	nd	-	nd	-	-	-	-	-	-
Fenilacetato	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Quinato	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Hidrólise de:																
CXY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CCH	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CDP	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 . Composição de ácidos micólicos da linhagem Lc e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 1999).

Strains: 1, *G. aichiensis* DSM 43978^T; 2, *G. amarae* DSM 43392^T; 3, *G. bronchialis* DSM 43247^T; 4, *G. hirsuta* DSM 44140^T; 5, *G. hydrophobica* DSM 44015^T; 6, *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T; 7, *G. rhizosphaera* DSM 44383^T; 8, *G. rubripertincta* DSM 43197^T; 9, *G. sputi* DSM 43896^T; 10, *G. terrae* DSM 43249^T; 11, linhagem Lc. Apenas os valores acima de 1% são mostrados. tr: traços.

Composição de ácidos micólicos (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C ₄₈		5									
C ₅₀		30									
C ₅₁		3									
C ₅₂		40									
C ₅₃		4									
C ₅₄		18						4		5	
C ₅₅								3		1	
C ₅₆					12			14		27	
C ₅₇					11			11		4	2
C ₅₈					30	8	7	23		36	8
C ₅₉					16	3	5	17		3	3
C ₆₀	14		8	19	26	30	26	18	8	19	39
C ₆₁	11		21	10	5	6	10	5	12	1	7
C ₆₂	47		25	31		47	34		48	4	36
C ₆₃	11		25	9		1	tr		14		2
C ₆₄	17		13	31		5	6		8		3

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos da linhagem Lc e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 1999).

Linhagens: 1, *G. aichiensis* DSM 43978^T; 2, *G. amarae* DSM 43392^T; 3, *G. bronchialis* DSM 43247^T; 4, *G. hirsuta* DSM 44140^T; 5, *G. hydrophobica* DSM 44015^T; 6, *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T; 7, *G. rhizosphaera* DSM 44383^T; 8, *G. rubripertincta* DSM 43197^T; 9, *G. sputi* DSM 43896^T; 10, *G. terrae* DSM 43249^T; 11, strain Lc.

Composição dos ácidos graxos (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C _{14:0}	2	1	1	2	1	2	3	2	2	2	3
C _{15:0}	1	1	1		4		4	2	2	1	
C _{16:1 cis-9}		3	11	1		1					1
C _{16:1 cis-10}	13	15	16	16	13	12	4	15		16	
C _{16:0}	34	29	23	30	27	29	27	25	44	32	33
C _{17:1 cis-9}	1	2	2	1	4	1	7	5	2	1	
C _{17:0}	1	1	1	1	4	1	13	3	2	1	1
C _{18:1}	17	24	10	30	14	21	27	24	29	26	36
C _{18:0}	2	1	1	3	1	4	11			2	6
TBSA	25	21	20	17	26	29	3	7	15	19	9
Valores somados											10

*grupos de dois ou três ácidos graxos que não puderam ser separados por GLC e que contém um ou mais dos ácidos graxos C_{16:1 cis-7} e C_{15:0 iso-2OH}.

Capítulo 5.

CARACTERIZAÇÃO E CULTIVO EM MELAÇO DE CANA -DE -AÇÚCAR DE *GORDONIA POLYISOPRENIVORANS* CCT 7137, UMA NOVA LINHAGEM ISOLADA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA CONTAMINADA

Roberta Fusconi^{1*}; Mirna Januária Leal Godinho¹; Nelma Regina Segnini Bossolan²

¹Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; ²Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

*Corresponding author: Mailing Address: Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luís Km 235, 13565-905. Caixa Postal 676. São Carlos, SP, Brasil. E-mail: rfusconi@iris.ufscar.br

Resumo

A linhagem Lg, isolada da água subterrânea contaminada pelo chorume de um antigo aterro controlado (São Paulo, Brasil) e produtora de exopolissacarídeos, foi caracterizada por taxonomia polifásica e teve seu crescimento analisado pelo monitoramento da densidade óptica (600 nm) em meio GYM e em diferentes concentrações de melação-de-cana de açúcar (2% a 10%). A linhagem apresentou reação Gram positiva, catalase positiva, oxidase negativa, não reduziu nitrato, não apresentou motilidade e não formou esporos. As análises morfológicas, bioquímicas, quimiotaxonômicas e moleculares mostraram que a linhagem Lg possui propriedades típicas de *Gordonia polyisoprenivorans* e foi denominada *G. polyisoprenivorans* CCT 7137. O crescimento da bactéria nos diferentes meios de cultura foi influenciado pela concentração do melação, sendo as concentrações 2% e 3% as que mais favoreceram o crescimento. A velocidade específica de crescimento máxima foi $0,157 \text{ h}^{-1}$ e $0,168 \text{ h}^{-1}$ nos meios melação 2% e 3%, respectivamente, superiores aos valores encontrados para o cultivo nas demais concentrações de melação e semelhantes ao do meio GYM ($0,175 \text{ h}^{-1}$). *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 é uma das cinco linhagens da espécie até então isoladas e registradas na literatura e uma de duas em água subterrânea. Este trabalho é o primeiro estudo sobre o crescimento de uma linhagem de *G. polyisoprenivorans* em meio GYM e em meio utilizando melação de cana-de-açúcar como única fonte de nutrientes e sugere o potencial da utilização do mesmo para o cultivo de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137.

Palavras chave: *Gordonia polyisoprenivorans*, melação de cana-de-açúcar, águas subterrâneas, aterro controlado

Introdução

O genero *Gordonia* (anteriormente chamado de *Gordona*) foi proposto por Tsukamura (1971) e faz parte do grupo de actinomicetos produtores de ácidos micólicos. Os actinomicetos produtores de ácidos micólicos são difíceis de serem diferenciados uns dos outros e das demais bactérias e, por este motivo, vem sendo empregada a taxonomia polifásica que integra dados fenotípicos e genotípicos (Chun *et al* 1996; Vandamme *et al* 1996). O gênero *Gordonia* possui amplo potencial biotecnológico no que se refere à degradação de contaminantes ambientais (Lee *et al.* 2001; Linos *et al.* 1998; Linos *et al.* 2002) e à síntese de compostos químicos, dentre os quais a lisina (Kyriacou *et al.* 1997) e um exopolissacarídeo (EPS) denominado gordonan (Kondo *et al.* 2000). Muitos microrganismos produzem EPS que estão associados à proteção contra a dessecação (Robertson & Firestone 1992), predadores e agentes antimicrobianos, e à captação e ao acúmulo de nutrientes (Costerton 1999). Vários EPS microbianos são amplamente aceitos como produtos biotecnológicos enquanto que outros estão em diferentes fases de desenvolvimento (Sutherland 1998).

O melaço de cana-de-açúcar, subproduto industrial de baixo custo e rico em açúcares fermentáveis, foi proposto como meio nutritivo para a produção de polímeros microbianos *in vitro* (Beaulieu *et al.* 1995; Patterson-Beedle *et al.* 2000) e para a produção de EPS em reservatórios para auxiliar na extração de óleo pelas técnicas de MEOR (“Microbial Enhanced Oil Recovery”) (Lazar 1993). Testes positivos de redução de permeabilidade utilizando linhagens produtoras de EPS injetadas em meios porosos, com posterior adição de nutrientes, mostram o potencial destas para uso em métodos como o das biobarreiras cujo objetivo é de separar áreas adjacentes impedindo que uma pluma contaminante se propague (Dennis & Turner 1998; Kim 2004).

Tendo em vista a importância do gênero *Gordonia* e visando futuros testes em meio poroso e posterior produção *in situ* de EPS, o presente trabalho teve como objetivos: (a) realizar a caracterização taxonômica pela abordagem polifásica de uma linhagem de *Gordonia* selecionada durante um programa de isolamento de linhagens produtoras de EPS a partir de amostras de água subterrânea contaminada pelo chorume de um antigo aterro controlado, visando confirmar a identificação preliminarmente realizada pelo sequenciamento parcial do 16S rDNA como *Gordonia polyisoprenivorans* (Fusconi & Godinho 2002) e (b) analisar o crescimento da linhagem em diferentes concentrações de melão de cana-de-açúcar.

Materiais e métodos

Linhagem bacteriana e meios de cultura

A linhagem Lg foi isolada, durante um projeto de triagem e seleção de bactérias produtoras de EPS (Fusconi & Godinho 2002), de água subterrânea contaminada pelo chorume proveniente do antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (São Paulo, Brasil) (Fusconi & Godinho 1999) e depositada junto à Coleção de Cultura Tropical (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello) com o número CCT 7137.

O cultivo em meios sólidos foi feito nos meios ágar nutritivo (g/l: peptona, 5,0; extrato de carne, 3,0; ágar, 15,0) e ágar GYM (Kondo *et al.* 2000) (g/l): glicose, 4,0; extrato de levedura, 4,0; maltose, 10,0; ágar, 15,0). O cultivo em meios líquidos foi realizado em caldo nutritivo, meio GYM (meio controle) e em meio melão. Antes da preparação do meio melão, o melão de cana-de-açúcar bruto foi clarificado para a eliminação dos resíduos sólidos interferentes (Mattos *et al.* 1997): o melão foi diluído em peso com água destilada (1:1), enriquecido com uma solução de fosfato de sódio monobásico (1,5 g/l), autoclavado a 121°C

por 30 minutos e decantado por 24 h. A fase líquida (melaço clarificado) foi sifonada e diluída de 2 a 10 % (v/v) em água destilada para obter o meio melaço com diferentes concentrações de açúcares: meio melaço 2% (M2) com 0,71% de açúcares, meio melaço 3% (M3) com 1,07% de açúcares, meio melaço 4% com 1,42% de açúcares, meio melaço 5% (M5) com 1,76% de açúcares, meio melaço 6% (M6) com 2,13% de açúcares, meio melaço 7% (M7) com 2,49% de açúcares, meio melaço 8% (M8) com 2,84% de açúcares, meio melaço 9% (M9) com 3,2% de açúcares e meio melaço 10% (M10) com 3,55% de açúcares. A concentração de açúcares do melaço bruto (71,2%) e clarificado (35,5%) foi medida com o auxílio de um refratômetro (Carl Zeiss, Zema). O pH foi ajustado em $7,0 \pm 0,2$ e o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Taxonomia

A morfologia celular foi analisada a partir de imagens feitas em microscopia eletrônica de varredura (Digital Scanning Microscope – DSM 960, Zeiss) após 24 e 48 h de cultivo em caldo nutritivo e 50 células medidas manualmente utilizando-se o software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). As amostras foram preparadas segundo Bratbak (1993) e Araújo (1995). Os aspectos culturais foram observados após 7 dias de incubação em ágar nutritivo e meio ágar GYM. Os testes microbiológicos (reação de Gram, redução de nitrato, oxidase, catalase, motilidade e formação de esporos) foram realizados segundo métodos padrão (Smibert & Krieg 1994). A análise da utilização de diferentes fontes de carbono, dos caracteres quimiotaxonômicos e o seqüenciamento do rDNA 16S foram realizados junto à DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha). A avaliação da utilização das fontes de carbono foi realizada em placas padrão de microtitulação (Greiner) segundo Kämpfer *et al.* (1990), modificado por Linos *et al.* (1999). Os aminoácidos da parede celular foram analisados segundo Stanek & Roberts (1974), os esteres metílicos dos

ácidos graxos segundo Miller (1982), Sasser (1990) e Kämpfer & Kroppenstedt (1996) e os ácidos micólicos segundo Klatte *et al.* (1994). A extração do DNA genômico e a amplificação por PCR foram realizadas segundo Rainey *et al.* (1996) e a seqüência parcial rDNA 16S da linhagem foi comparada com seqüências representativas de actinomicetos obtidas da EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

Cultivo da linhagem

A linhagem Lg foi repicada em ágar nutritivo, a partir de uma cultura estoque mantida a 4°C, e incubada durante 7 dias a 25°C. Uma alça padrão de massa celular foi retirada dessa cultura e ressuspensa em 10 ml de caldo nutritivo. Desta suspensão, 7,5 ml foram transferidos para erlenméiers de 500 ml contendo 142,5 ml de caldo nutritivo, obtendo-se assim a pré-cultura. Desta foi retirado o inóculo (11ml) durante a fase exponencial (26 a 28 h de crescimento) e transferido para erlenméiers de 1000 ml, contendo 209 ml de meio a ser utilizado (meio GYM e meio melaço de 2% a 10%). O inóculo, padronizado em 0,3 de absorbância (D.O.₆₀₀), apresentou 10⁷ UFC/ml. Os cultivos foram em aerobiose a 25°C, sendo que as culturas em meio líquido foram mantidas com agitação constante de 137 rpm, segundo (Kondo *et al.* 2000).

Análise do crescimento

O crescimento bacteriano foi avaliado pelo monitoramento da densidade óptica (D.O.₆₀₀), através da qual foram calculados: (a) a relação X/X_0 ou seja, entre a densidade óptica em cada tempo de amostragem (X) e a densidade óptica no início do experimento (X_0); (b) a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}) obtida por regressão linear de uma função gráfica

$\ln X/X_0 = f(t)$, utilizando quatro pontos experimentais consecutivos, e indicada pelo coeficiente de correlação r (Borzani 1993); (c) o tempo de geração (T_g) calculado a partir da equação $\mu_{\max} = \ln 2/T_g$. O número de células viáveis (UFC/ml), presentes no inóculo e em pontos amostrais selecionados durante o experimento, foi estimado pelo método de microgotas (Collins *et al* 1995). Os experimentos foram conduzidos com três repetições de cada meio e os resultados analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Resultados e discussão

As análises morfológicas, bioquímicas, quimiotaxonômicas e moleculares realizadas no presente trabalho, mostraram que a linhagem Lg apresenta propriedades típicas de *G. polyisoprenivorans* (Linos *et al.* 1999) confirmando a identificação preliminar realizada com base no sequenciamento parcial do 16S rDNA (Fusconi & Godinho 2002). passando a ser denominada *G. polyisoprenivorans* CCT 7137. De acordo com a classificação hierárquica proposta por (Stackebrandt *et al.* 1997) para os actinomicetos, o gênero *Gordonia* pertence à classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*, família *Gordoniaceae*.

G. polyisoprenivorans CCT 7137 apresentou colônias de superfície lisa e aspecto mucoso com coloração creme rosada, que se tornou alaranjada após exposição à luz por 7 dias, quando cultivada em ágar nutritivo e meio ágar GYM. As células apresentaram morfologia de bastonete, isoladas ou no formato de V, típico de bactérias corineformes, com tamanho médio de 2,40 x 0,58 μm após 24h de crescimento, e de 1,31 x 0,64 μm após 48h, mostrando uma redução na relação comprimento/largura de 4,18 para 2,07, respectivamente (Figura 1). A linhagem testada apresentou reação Gram positiva, catalase positiva, oxidase negativa, não

reduziu nitrato, não apresentou motilidade e não formou esporos e correspondeu à *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (Linos *et al.* 1999) na utilização de fontes de carbono, embora algumas diferenças possam ter sido encontradas (Tabela 1). Os hidrolizados celulares apresentaram ácidos *meso*-diaminopiméricos como os únicos ácidos do peptidoglicano. *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 sintetizou ácidos micólicos com cadeia de carbono de 58 a 64 átomos, sendo os principais C₆₀ e C₆₂, ou seja, dentro da faixa esperada para os membros do gênero *Gordonia* (Stackebrandt *et al.* 1988) e com perfil de eluição correspondente ao de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (Linos *et al.* 1999). Foram encontrados ácidos graxos saturados e insaturados não ramificados e ácido tuberculosteárico (TBSA), sendo que os principais foram C_{16:0} (ácido palmítico), *cis*-9 C_{18:1} (ácido oleico) e TBSA, correspondendo ao observado para *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (Linos *et al.* 1999). A análise das primeiras 500 bases do rDNA 16S da linhagem testada revelou uma similaridade de 100% com a linhagem tipo de *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (Linos *et al.* 1999).

G. polyisoprenivorans CCT 7137 é uma das seis linhagens de *G. polyisoprenivorans* descritas na literatura e, juntamente com a linhagem Lc (*G. polyisoprenivorans* CCT 7277) (Fusconi & Godinho 2002), representa uma de duas linhagens isoladas da água subterrânea adjacente ao antigo aterro controlado da cidade de São Carlos. As outras quatro linhagens foram isoladas do solo de uma plantação de seringueira (*Hevea brasiliensis*), no Vietnam (Linos & Steinbüchel 1998), da água do interior de pneus deteriorados, na Alemanha (Linos & Steinbüchel 1998; Linos *et al.* 1999) e de amostra clínica (amostra de sangue do cateter de Hickman de paciente com septicemia após transplante de medula) (Kempf *et al.* 2004).

A caracterização polifásica permitiu evidenciar diferenças morfológicas, bioquímicas e químicas entre as linhagens isoladas do mesmo ambiente (*G. polyisoprenivorans* CCT 7277 e CCT 7137). *G. polyisoprenivorans* CCT 7277 apresentou duas variantes morfológicas de colônias (uma de superfície lisa e aspecto mucoso e outra de superfície rugosa e aspecto seco)

enquanto que *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 desenvolveu apenas colônias de superfície lisa e aspecto mucoso, como relatado por Linos *et al.* (1999) na descrição da espécie, e utilizou 10 fontes de carbono a mais que a primeira. Assim, *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 utilizou maior número de fontes de carbono (71,88%) que *G. polyisoprenivorans* CCT 7277 (40,63%) e que *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T (63,33%) (Linos *et al.* 1999), mostrando uma maior versatilidade metabólica.

G. polyisoprenivorans tem sido estudada pela sua propriedade de degradar borracha e, portanto, cultivada em meio mineral enriquecido com substratos de borracha como fontes de carbono (Bereka *et al.* 2000). Desta forma, o presente trabalho constitui o primeiro estudo sobre o crescimento de uma linhagem da espécie em meio GYM e meio melaço visando futuros estudos de produção de EPS.

As curvas de crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios de cultura testados mostraram crescimento exponencial até 20h de cultivo no meio GYM (Figura 2a), entre 24h e 30h no meio melaço de 2% a 8% (Figura 2b), e entre 44h e 48h no meio melaço 9% e 10% (Figura 2c) sugerindo que, em maiores concentrações de melaço a linhagem entrou na fase estacionária em tempos incubação mais longos, provavelmente, devido à maior disponibilidade de açúcares no meio.

Os valores de μ_{\max} nos meios melaço 2% ($0,157h^{-1}$) e 3% ($0,168h^{-1}$) foram semelhantes aos encontrados no meio GYM ($0,175h^{-1}$) e superiores aos calculados para as demais concentrações de melaço (Figura 3a). O Tg da linhagem nos meios melaço 2%, 3%, 5%, 6%, 8% e 9% (de 4,2h a 4,8h) foi semelhante ao Tg encontrado no meio GYM (4,0h) e baixo quando comparado com o observado nas demais concentrações de melaço (Figura 3b). Em melaço 4% e 10% foram encontrados os valores mais baixos de μ_{\max} ($0,115h^{-1}$ e $0,113h^{-1}$) e mais altos de Tg (5,9h e 6,2 h).

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que o crescimento da bactéria no meio melaço foi influenciado pela concentração de melaço de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, pela concentração de açúcares presentes. Os meios melaço 2% e 3%, meios com a menor concentração inicial de açúcares, 0,71% e 1,07% respectivamente, foram os que mais favoreceram o crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137, indicado pela máxima velocidade específica de crescimento que foi superior àquela observada nas demais concentrações de melaço e semelhante àquela obtida no meio controle. Um decréscimo no valor de μ_{\max} e um aumento no valor do Tg foi observado no melaço 10% em relação ao melaço 9%, sugerindo que o crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 pode ser inibido por altas concentrações de melaço. Embora os dados de células viáveis não tenham sido utilizados para o cálculo de μ_{\max} e Tg, devido ao número insuficiente de pontos (Borzani 1993), eles serviram para subsidiar novos experimentos, visando análises mais detalhadas.

O melaço de cana-de-açúcar, sub-produto da indústria açucareira, foi selecionado como meio nutriente, potencialmente alternativo ao meio GYM, uma vez que é rico em açúcares fermentáveis e minerais e porque a maioria das linhagens produtoras de EPS já estudadas utiliza carboidratos como fonte de carbono e energia (Sutherland 1990). O melaço de cana-de-açúcar, que também é rico em vitaminas, foi utilizado como fonte de fatores de crescimento para a produção de polímeros microbianos como o polihidroxibutirato por *Alcaligenes eutrophus* (Beaulieu *et al.* 1995) e como meio nutriente para a produção de celulose por *Zoogloea* sp. (Patterson-Beedle *et al.* 2000).

O presente trabalho é o primeiro estudo sobre o crescimento de uma linhagem de *G. polyisoprenivorans* em meio GYM e em meio utilizando melaço de cana-de-açúcar como única fonte de nutrientes. Assim, ele representa a primeira etapa de estudo para a possível utilização do melaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de carbono para a produção de EPS pela linhagem. Uma vez que o melaço de cana-de-açúcar é a fonte de carbono de mais

baixo custo no Brasil (Sant'Anna & Torres 1988) é de grande interesse como substrato alternativo para o cultivo de microrganismos de interesse biotecnológico. Os dados apresentados sugerem o melaço de cana-de-açúcar como nutriente potencial para a linhagem estudada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Brasil) e ao PPG-ERN (UFSCar, Brasil) pelo suporte financeiro; aos Doutores R.M. Kroppenstedt (DSMZ, Alemanha), E.P. Gianotti (USP, Brasil) e D.G. Santana (UFU, Brasil) pela assistência nas metodologias utilizadas; à D.C. D. Javarotti (UFSCar, Brasil) pelo suporte técnico; ao Dr. G. Rodrigues Filho (UFU, Brasil) pela utilização do refratômetro e à Usina Santo Antônio (Brasil) pelo fornecimento do melaço de cana-de-açúcar.

Referências bibliográficas

- Araújo, J.C. 1995 *Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado em esgoto sanitário sintético*. Dissertation, Hidráulica e Saneamento USP, São Carlos, Brazil.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Mélinard, J., Pandian, S. & Goulet J. 1995 Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 165-169.
- Berekaa, M.M., Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A. 2000 Effect of pretreatment of rubber material on its biodegradability by various rubber degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **184**, 199-206.

- Borzani, W. 1993 Objective criteria to confirm the existence of the exponential growth phase in a batch microbial process. *Revista de Microbiologia* **24**, 278-280.
- Bratbak, G. 1993 Microscope methods for measuring bacterial biovolume, epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, eds. Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. pp. 309-317. Boca Raton: Lewis Publishers. ISBN 0-873-715640
- Chun, J., Kang, S.-O., Hah, Y.C. & Goodfellow, M. 1996 Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 205-213.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. & Grange, J.M. 1995 *Collin's and Lyne's Microbiological Methods*. p. 493. Oxford: Butterworth - Heinemann. ISBN 0-7506-0653-3.
- Costerton, J.W. 1999 The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **22**, 551-563.
- Dennis, M.L. & Turner, J.P. 1998 Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* **124**, 120-127.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J.L. 1999 Bacteria and protozoa populations in groundwater in a landfill area in São Carlos, SP. *Revista de Microbiologia*, **30**, 196-202.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J. L. 2002 Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 363-369.
- Kämpfer, P., Dott, W. & Kroppenstedt, R.M. 1990 Numerical classification and identification of some nocardioform bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **6**, 309-391.
- Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R.M. 1996 Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 989-1005.
- Kempf, V.A.J., Schmalzing, M., Yassin, A.F., Schaal, K.P., Baumeister, D., Arenskötter, M. & Steinbüchel, A. 2004 *Gordonia polyisoprenivorans* septicemia in a bone marrow

- transplant patient. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **23**, 226-228.
- Kim, G. 2004 Hydraulic conductivity change of bio-barrier formed in the subsurface by the adverse conditions including freeze-thaw cycles. *Cold Regions Science and Thecnology* **38**, 153-164.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R.M. & Rainey, F.A. 1994 *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus*-species. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 355-360.
- Kondo, T., Yamamoto, D., Yokota, A., Suzuki, A., Nagasawa, H. & Sakuda, S. 2000 Gordonan, an acidic polysaccharide with cell aggregation-inducing activity in insect BM-N4 cells, produced by *Gordonia* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2388-2394.
- Kyriacou, A., Balis, C. & Typas, M.A. 1997 Improvement of lysine production by analog-sensitive and auxotroph mutants of the acetylene-utilizing bacterium *Gordona bronchialis* (*Rhodococcus bronchialis*). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **66**, 281-289.
- Lazar, I. 1993 The microbiology of MEOR, practical experience in Europe. In *Biohydrometallurgical Technologies: Proceedings of an International Biohydrometallurgy Symposium Held in Jackson Hole, Wyoming, USA*, eds Torma, A.E., Apelo, M.L. & Brierley, C.L. pp. 329-338. The Minerals, Metals & Materials Society. ISBN 0-873-39252-3
- Lee, J.J., Rhee, S-K. & Lee, S-T. 2001 Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4342-4345.

- Linos, A. & Steinbüchel, A. 1998 Microbial degradation of natural and synthetic rubbers by novel bacteria belonging to the genus *Gordona*. *Kautschuk Gummi Kunststoffe* **51**, 496-499.
- Linos, A., Steinbüchel, A., Spröer, C. & Kroppenstedt, R.M. 1999 *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1785-1791.
- Linos, A., Reichelt, R., Keller, U. & Steinbüchel, A. 2000 A Gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic *cis*-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiology Letters* **182**, 155-161.
- Linos, A., Berekaa, M.M., Steinbüchel, A., Kim, K.K., Spröer, C. & Kroppenstedt, R.M. 2002 *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 1133-1139.
- Mattos, K.A., Volpon, A.G.T., Previato, L.M. & Previato, J.O. 1997 *Aplicação de microrganismos produtores de biopolímeros na recuperação de petróleo, avaliação do melão como fonte alternativa para a produção de biopolímeros*. Technical report CENPES/SEBIO, Rio de Janeiro, Brazil.
- Miller, L.T. 1982 Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 584-586.
- Patterson-Beedle, M., Kennedy, J.F., Melo, F.A.D., Lloyd, L.L. & Medeiros, V.A. 2000 Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers* **42**, 375-383.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M. & Stackebrandt, E. 1996 The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete

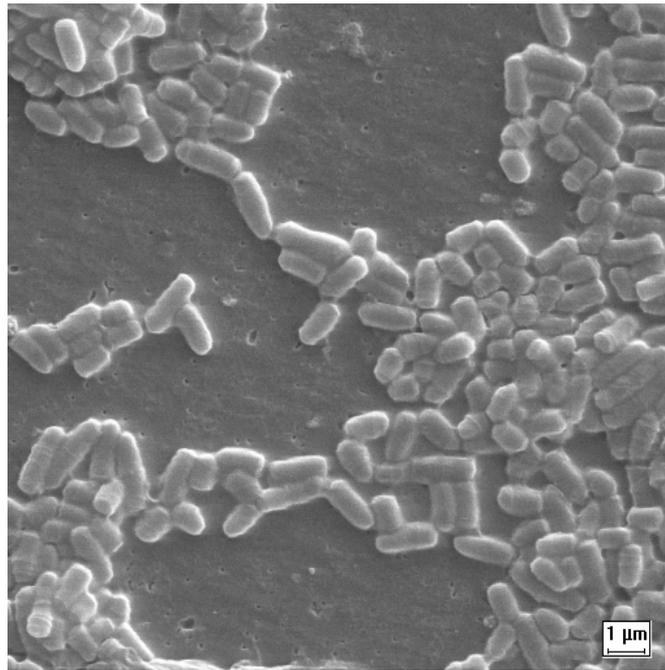
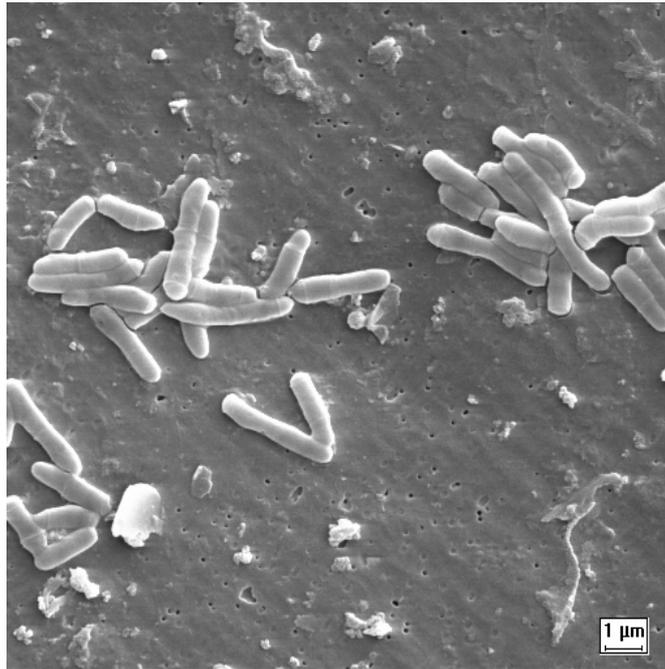
- lineage, proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 1088-1092.
- Robertson, E.B. & Firestone, M.K. 1992 Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1284-1291.
- Sant'Anna, E.S. & Torres, R.C.O. 1998 Growth of *Pediococcus acidilactici* on sugarcane blackstrap molasses. *Revista de Microbiologia* **29**, 202-207.
- Sasser, M. 1990 Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsletters* **20**,1-6.
- Smibert, R.M. & Krieg, N.R. 1994 Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology*, eds. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. & Krieg, N.R. pp. 607-654. Washington: American Society for Microbiology Press. ISBN 1-555-81048-9
- Stackebrandt, E., Smida, J. & Collins, M.D. 1988 Evidence of phylogenetic heterogeneity within the Genus *Rhodococcus*, revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). *Journal of General and Applied Microbiology* **34**, 341-348.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. & Ward-Rainey, N.L. 1997 Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.
- Staneck, J.L. & Roberts, G.D. 1974 Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology* **28**, 226-231.
- Sutherland, I.W. 1990 *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. pp. 70-88. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-36350-0.
- Sutherland, I.W. 1998 Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**, 41-46.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. 1996 Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**, 407-438.

Tabela 1. Características bioquímicas da linhagem Lg e das linhagens tipo do gênero *Gordonia* (Linos *et al.* 2002) quanto à utilização de fontes de carbono.

	Linhagens																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Utilização de:																	
N-Acetil-D-Glicosamina	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
D – Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glucarato	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Gluconato	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Ácido D-Glicosamínico	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
L-Ramnose	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
D-Ribose	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
D-Sacarose	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Turanose	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Caprato	+	+	nd	+	+	+	nd	nd	-	+	-	v	+	-	nd	-	-
D-Arabitól	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
I-Inositol	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
2-Hidroxicvalerato	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
2-Oxoglutarato	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Pimelato	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinato	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
L-Alanina	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
4-Hidroxicbenzoato	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
L-Aspartato	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
L-Leucina	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Prolina	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
L-Serina	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Valina	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Putrescina	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Tiroamina	-	+	nd	+	-	+	nd	nd	+	-	+	-	-	-	v	+	+
Acetamida	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Benzoato	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3-Hidroxicbenzoato	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
4-Aminobutirato	+	-	nd	-	-	+	nd	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	-
Fenilacetato	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Quinato	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Hidrólise de:																	
CXY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CCH	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CDP	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Linhagens: 1, *G. aichiensis* DSM 43978^T; 2, *G. alkanivorans* DSM 44369^T; 3, *G. amarae* DSM 43392^T; 4, *G. amicalis* DSM 44461^T; 5, *G. bronchialis* DSM 43247^T; 6, *G. desulfuricans* DSM 44462^T; 7, *G. hirsuta* DSM 44140^T; 8, *G. hydrophobica* DSM 44015^T; 9, *G. nitida* DSM 44499^T; 10, *G. westfalica* DSM 44215^T; 11, *G. rhizosphaera* DSM 44383^T; 12, *G. rubripertincta* DSM 43197^T; 13, *G. sputi* DSM 43896^T; 14, *G. terrae* DSM 43249^T; 15, *G. polyisoprenivorans* DSM 44302^T; 16, linhagem Lc; 17, linhagem Lg. CXY, *p*-Nitrofenil-β-D-Xilose; CCH, *p*-Nitrofenilfosforil Cloro; CDP, 2-Desoxitimidina-5-*p*-Nitrofenil; nd, não determinado; v, reação variável.



(b)

Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura da linhagem Lg cultivada em caldo nutritivo a 25°C sob agitação constante de 137 rpm. (a) e (b) são provenientes de 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente.

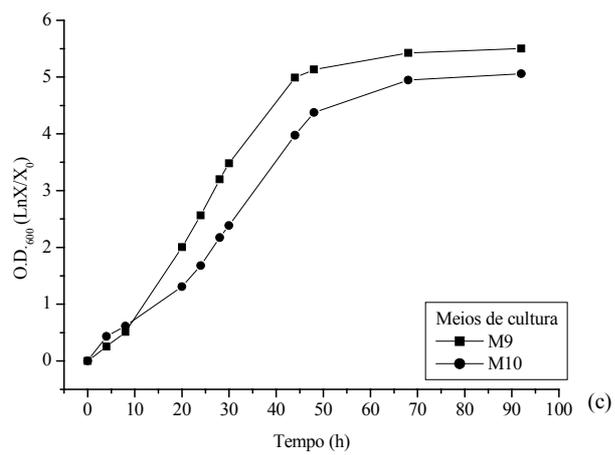
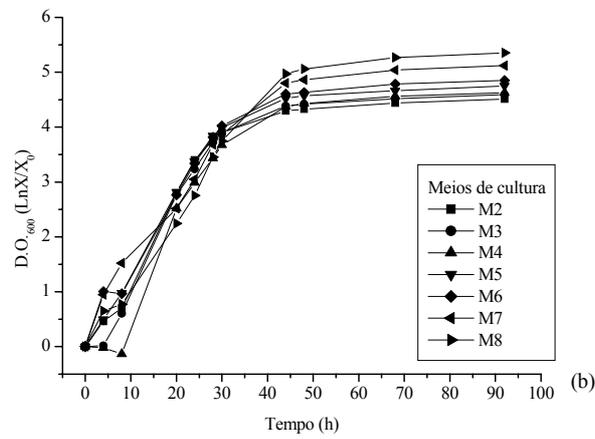
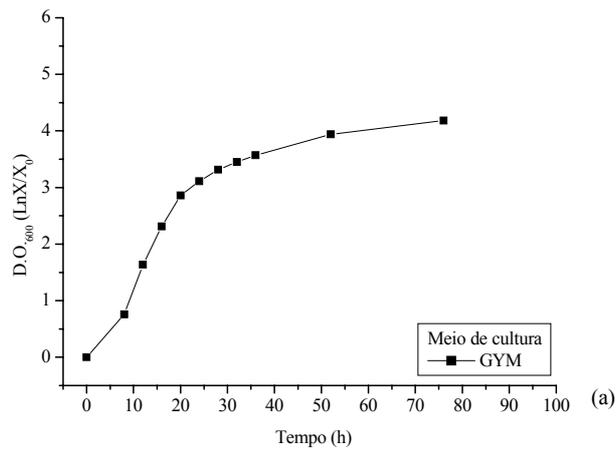


Figura 2. Crescimento (O.D.₆₀₀) da linhagem Lg em : (a) meio GYM, (b) meio melão de 2% a 8% (M2 a M8), e (c) meio melão 9% e 10% (M9 to M10). Os valores representam médias.

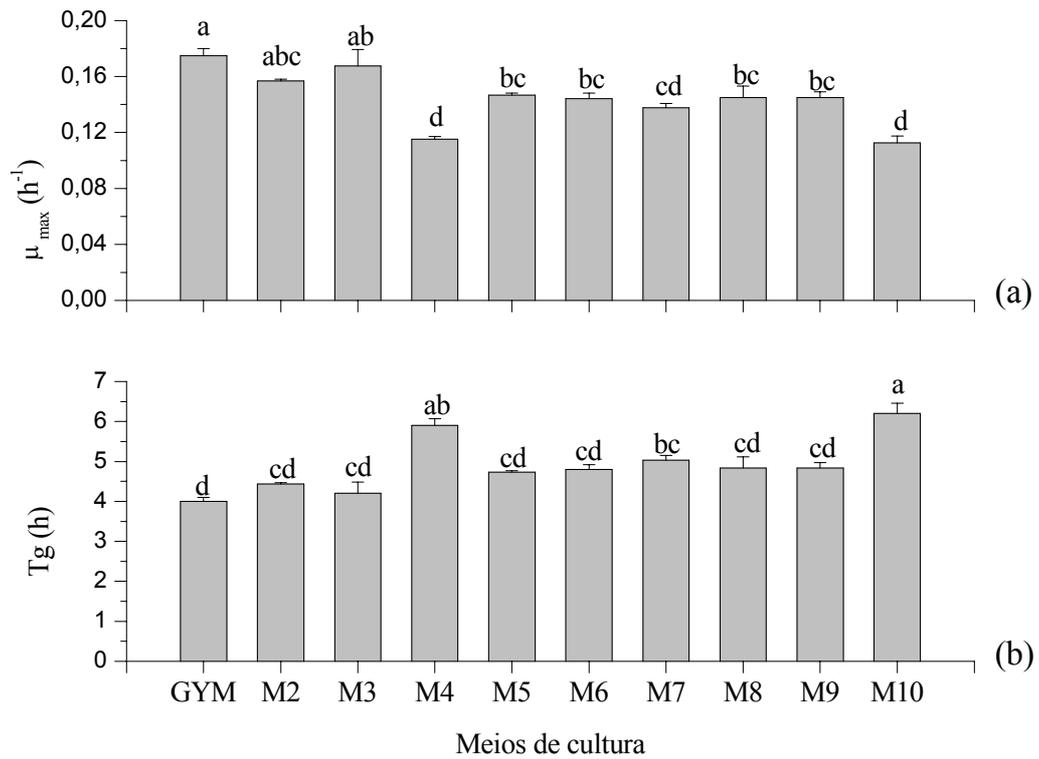


Figura 3. (a) Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e (b) tempo de geração (T_g) da linhagem Lg em meio GYM e meio melaço de 2% a 10% (M2 a M10). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Capítulo 6.

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR *GORDONIA POLYISOPRENIVORANS* CCT 7137, ISOLADA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA CONTAMINADA, USANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MEIO DE CULTURA

Roberta Fusconi^{1*}; Mirna Januária Leal Godinho¹; Nelma Regina Segnini Bossolan²

¹Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; ²Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

*Corresponding author: Mailing Address: Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luís Km 235, 13565-905. Caixa Postal 676. São Carlos, SP, Brasil. E-mail: rfusconi@iris.ufscar.br

Resumo

Gordonia polyisoprenivorans CCT 7137, isolada da água subterrânea contaminada pelo chorume de um antigo aterro controlado (São Paulo, Brasil), foi cultivada em meio GYM e em diferentes concentrações de melaço-de-cana de açúcar (2%, 6% e 10%). O crescimento da linhagem foi analisado pelo monitoramento da densidade óptica (600 nm) e de células viáveis (UFC/ml); a produção de EPS avaliada no final da fase exponencial e 24h após o final da mesma. A análise do número de células viáveis mostrou que o meio que mais favoreceu o crescimento da bactéria não foi o que favoreceu a produção de EPS. O meio controle (GYM) foi o que mais favoreceu o crescimento da linhagem, com uma velocidade específica de crescimento máxima de $0,232 \text{ h}^{-1}$. Não foram observadas diferenças no crescimento da bactéria quando cultivada nas três diferentes concentrações de melaço. A produção de EPS, em todos os meios de cultura, teve início durante a fase exponencial e continuou ao longo da fase estacionária de crescimento. A maior produção de EPS total, após 24h de fase estacionária, foi detectada nos meios melaço 6% (172,86 g/l) e 10% (139,47 g/l) e a produção de EPS total por unidade de concentração celular foi superior no meio melaço 10% ($39,03 \times 10^{-11} \text{ g/UFC}$). Após a fase exponencial, nos meios melaço 2%, 6% e 10% foi observada uma maior porcentagem de EPS livre, representando 88,37%, 62,4% e 64,22% do total, respectivamente, diferente do observado no meio padrão que apresentou EPS constituído por uma maior porcentagem de EPS capsular (66,4 % do total). Este trabalho é o primeiro estudo sobre a produção de EPS por uma linhagem de *G. polyisoprenivorans* em meio GYM e em meio utilizando melaço de cana-de-açúcar como única fonte de nutrientes e sugere o potencial da utilização do mesmo para a produção de EPS por *G. polyisoprenivorans* CCT 7137.

Palavras chave: *Gordonia polyisoprenivorans*, exopolissacarídeos, melaço de cana-de-açúcar, águas subterrâneas, aterro controlado

Introdução

Muitos microrganismos produzem exopolissacarídeos (EPS) que apresentam importância ecológica no que se refere à proteção contra a dessecação (Roberson & Firestone 1992), predadores e agentes antimicrobianos e à captação e acúmulo de nutrientes (Costerton 1999). Os EPS têm também importante papel estrutural nos biofilmes que constituem o habitat natural de muitas comunidades microbianas, tanto em ambientes naturais como artificiais, onde um substrato sólido permanece exposto à umidade (Sutherland 2001).

Os biofilmes propiciam o tamponamento e a consequente diminuição da permeabilidade tanto em meios porosos (solo) como em meios fraturados (rocha) (Shaw *et al.* 1985; Ross *et al.* 2001) e influenciam a biotransformação de contaminantes ambientais (Wolfaardt *et al.* 1995). Por isso, os microrganismos produtores de EPS vêm sendo estudados para serem utilizados na tecnologia de biobarreiras para a biorremediação *in situ* de áreas contaminadas (Blenkinsopp & Costerton 1991; Dennis & Turner 1998; Kim 2004). As biobarreiras propiciam uma barreira biológica, formada pelas bactérias e os EPS por elas produzidos, que separa áreas adjacentes do ambiente subterrâneo, impedindo que uma pluma contaminante se propague (Lappin-Scott & Costerton 1992).

O conhecimento da biossíntese dos EPS é incompleto, não sendo conhecido, por exemplo, os últimos estágios de polimerização e excreção destes polímeros (Sutherland 1996). Entretanto, é sabido que são semelhantes à biossíntese do peptidoglicano e dos lipopolissacarídeos (Sutherland 1990) e que pode ser controlada pela alteração de variáveis como temperatura, pH, oxigênio e fonte de carbono (Ricciardi *et al.* 2002; López *et al.* 2003; Nampoothiri *et al.* 2003). Estudos com bactérias produtoras de EPS, para diferentes aplicações industriais, mostraram a possibilidade de se utilizar sub-produtos agroindustriais, como por exemplo água de maceração de milho e melão, como substratos alternativos para a

produção de EPS, visando uma redução dos custos de produção de EPS e a utilização de tecnologias limpas (Sutherland 1996). Um exemplo são as técnicas de MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) que utilizam melaço ao invés de outros nutrientes para a produção *in situ* de metabólitos, tais como EPS, para auxiliar na extração de óleo dos reservatórios, pela alteração da permeabilidade dos mesmos. Entretanto, antes de uma aplicação em campo, é necessário o levantamento de aspectos da fisiologia do microrganismo a ser usado, a seleção de nutrientes, a caracterização ecológica e geológica da área e uma avaliação dos protocolos de injeção (Lazar 1993).

Assim, considerando a importância de linhagens produtoras de EPS e visando futuros testes em meio poroso para posterior produção *in situ* de EPS, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da utilização de melaço de cana - de - açúcar como substrato alternativo para a produção de EPS por *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137, linhagem produtora de EPS e que cresce em meio melaço de cana - de - açúcar como única fonte de nutrientes (Fusconi *et al.* 2005, no prelo).

Materiais e Métodos

Linhagem bacteriana

A bactéria utilizada foi isolada durante a triagem e seleção de bactérias produtoras de EPS de água subterrânea contaminada pelo chorume proveniente do antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (São Paulo, Brasil) (Fusconi & Godinho 1999, 2002) e depositada junto à Coleção de Cultura Tropical (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello) com o número CCT 7137.

Meios de cultura e condições de cultivo

O cultivo em meios sólidos foi feito nos meios ágar nutritivo, ágar GYM (Kondo *et al.* 2000) (g/l: glicose, 4,0; extrato de levedura, 4,0; maltose, 10,0; ágar, 15,0) e ágar melaço. O cultivo em meios líquidos foi realizado em caldo nutritivo, meio GYM (meio controle) e em meio melaço.

Para a preparação do meio melaço, o melaço de cana-de-açúcar bruto foi clarificado para a eliminação dos resíduos sólidos interferentes (Mattos 1997): o melaço foi diluído em peso com água destilada (1:1), enriquecido com uma solução de fosfato de sódio monobásico (1,5 g/l), autoclavado a 121°C por 30 minutos e decantado por 24 h. A fase líquida (melaço clarificado) foi sifonada e diluída 2 %, 6 % e 10 % (v/v) em água destilada para obter o meio melaço com diferentes concentrações de açúcares: meio melaço 2% (0,71% de açúcares), 6% (2,13% de açúcares) e 10% (3,55% de açúcares). A concentração de açúcares do melaço bruto (71,2%) e clarificado (35,5%) foi medida com um refratômetro (Carl Zeiss, Zema), o pH foi ajustado em $7,0 \pm 0,2$ e o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Os cultivos foram em aerobiose a 25°C e as culturas em meio líquido foram mantidas com agitação constante de 137 rpm.

Análise de fenótipo mucoso

A análise da mucosidade das colônias de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 foi feita em cultivo de 7 dias a 25°C, em meio ágar melaço 2%, 6% e 10%, meio ágar GYM e ágar nutritivo.

Cultivo em meio melaço

G. polyisoprenivorans CCT 7137 foi repicada em ágar nutritivo, a partir de uma cultura estoque mantida a 4°C, e incubada durante 7 dias a 25°C. Uma alça padrão de massa celular foi retirada dessa cultura e ressuspensa em 10 ml de caldo nutritivo. Desta suspensão, 7,5 ml foram transferidos para erlenméiers de 500 ml contendo 142,5 ml de caldo nutritivo, obtendo-se uma pré-cultura, da qual foi retirado o inóculo, durante a fase exponencial (26 a 28 h de crescimento).

Os experimentos nos meios GYM e melaço 2%, 6% e 10% foram divididos em duas etapas, ou seja, 1) a análise do crescimento da linhagem e 2) a investigação da produção de EPS pela mesma. Em ambos os casos o inóculo (11 ml), que apresentou 10^7 UFC/ml, foi padronizado em 0,3 (D.O.₆₀₀), transferido para erlenméiers de 1000 ml, contendo 209 ml de meio melaço nas diferentes concentrações e incubado a 25°C sob agitação constante de 137 rpm. Os experimentos foram conduzidos com três repetições de cada meio.

Na primeira etapa, foram retiradas, periodicamente, alíquotas para avaliar o crescimento celular e medir o pH, que não foi controlado. Na segunda etapa, foram retiradas alíquotas para o monitoramento do crescimento celular e para a quantificação dos EPS em três pontos amostrais, selecionados a partir da análise dos resultados da primeira etapa: ponto 1 - início do experimento (tempo zero); ponto 2 - final da fase exponencial; ponto 3 - fase estacionária (24 horas após a retirada no ponto 2).

Análise do crescimento

O crescimento bacteriano foi avaliado pelo monitoramento da densidade óptica (D.O.₆₀₀), e pelo número de células viáveis (UFC/ml), estimado pelo método de microgotas (Collins *et al* 1995). As placas com ágar nutritivo, contendo 6 microgotas de 5µl para cada diluição testada,

foram incubadas a 25°C de 48 a 72 horas, após o que foram contadas as microcolônias presentes em cada microgota. Para a leitura da D.O.₆₀₀ amostras provenientes do cultivo em meio melaço 10% foram diluídas em 50%. Pelo número de células viáveis foram calculados (a) a relação X/X_0 ou seja, entre a densidade de células viáveis em cada tempo de amostragem (X) e a densidade de células viáveis no início do experimento (X_0), (b) a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{\max}), obtida por regressão linear de uma função gráfica $\ln X/X_0 = f(t)$, utilizando quatro pontos experimentais consecutivos, e indicada pelo coeficiente de correlação r (Borzani 1992) e (c) o tempo de geração (T_g) calculado a partir da equação $\mu_{\max} = \ln 2/T_g$. Os experimentos foram conduzidos com três repetições de cada meio e os resultados analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Análise dos exopolissacarídeos

A quantificação dos EPS foi realizada na segunda etapa dos experimentos, conduzidos nos meios GYM e melaço 2%, 6% e 10%. As amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm de porosidade para a retirada das células, e dializadas em membranas de celulose (peso molecular entre 12000 a 16000 Daltons) durante 48 horas em água destilada, trocada três vezes ao dia para a eliminação dos açúcares residuais do meio de cultura. Os carboidratos totais das amostras foram analisados pelo método do ácido sulfúrico-fenol (Dubois *et al.* 1956), a fim de estimar a quantidade de EPS total, livre e capsular. Para a determinação do EPS total as amostras permaneceram em banho-maria a 98°C durante 1 hora para a liberação do EPS capsular. Os EPS livre e capsular foram quantificados diretamente pelo método do ácido sulfúrico-fenol, sendo que o EPS capsular foi determinado pela subtração da concentração de EPS livre do EPS total (Hannemann 1994). Os valores de EPS

foram calculados pela subtração da quantidade de carboidratos totais interferentes encontrados no meio de cultura sem inóculo, das quantidades encontradas no meios de cultivo (Kimmel & Roberts 1998; Bergmaier *et al.* 2003). A quantidade de EPS foi expressa em g/l utilizando glicose como padrão e a produção por unidade de concentração celular de EPS foi calculada com base na contagem de células viáveis e expressa em g/UFC. Os experimentos foram conduzidos com três repetições de cada meio e os resultados analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Resultados e Discussão

Análise de fenótipo mucoso

G. polyisoprenivorans CCT 7137 desenvolveu colônias com superfície lisa e aspecto mucoso quando cultivada em todos os meios testados, sendo que em meio ágar GYM e ágar melaço 2%, 6% e 10% a linhagem desenvolveu aspecto extremamente mucoso .

O fenótipo mucoso de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 diferiu daquele apresentado por outra linhagem isolada do mesmo ambiente (*G. polyisoprenivorans* CCT 7277) que, em todos os meios de cultura testados, produziu dois fenótipos de colônias, uma de superfície rugosa e aspecto seco e outra de superfície lisa e aspecto mucoso (dados não publicados). Por esta razão a linhagem em questão foi selecionada para estudos de produção de EPS, utilizando, segundo Chan *et al.* (1984), Junkins & Doyle (1992) e Dupont *et al.* (2000) o desenvolvimento recorrente da mucosidade das colônias como indicador de produção de EPS.

As linhagens com um fenótipo mucoso mais estável são as preferidas em termos de utilização industrial de linhagens produtoras de EPS (Dupont *et al.* 2000). Entretanto , é sabido que em fenótipos originalmente secos de *Pseudomonas aeruginosa* foi detectado o

desenvolvimento de mucosidade dependendo das condições de cultivo (Chan *et al.* 1984) e que a produção de EPS ocorreu em linhagens originalmente secas de *Burkholderia cepacia* (Cérantola *et al.* 2000).

Crescimento e produção de EPS em meio melaço

Os meios GYM e melaço de cana-de-açúcar foram utilizados em uma etapa anterior do trabalho como meios nutrientes para *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 (Fusconi *et al.* 2005, no prelo). O meio GYM, escolhido como meio controle, já foi utilizado para a produção de EPS por *Gordonia* sp. (Kondo *et al.* 2000); o melaço cana-de-açúcar, um subproduto da indústria açucareira, é rico em açúcares fermentáveis, e é sabido que a maioria das linhagens produtoras de EPS estudadas utilizam carboidratos como fonte de carbono e energia (Sutherland 1990). Além disso, na tentativa de reduzir os custos de produção, o melaço é um dos substratos utilizados para a produção industrial de exopolissacarídeos (Sutherland 1996).

Considerando os resultados da etapa anterior deste trabalho, que sugerem a utilização de melaço de cana-de-açúcar como nutriente potencial para a linhagem (Fusconi *et al.* 2005, no prelo), e a seleção de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 pelo fenótipo mucoso, na presente etapa da investigação foi analisada a produção de EPS pela bactéria em meio melaço de cana-de-açúcar 2%, 6% e 10% e comparada com a produção no meio GYM.

As curvas de crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137, baseadas nos dados de D.O., mostraram crescimento exponencial até 23h de cultivo em meio GYM, 20h no meio melaço de 2%, 35h no meio melaço 6% e 30h no meio melaço 10% (Figura 1). O valor da máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}) no meio melaço 2% ($0,159\text{ h}^{-1}$) foi semelhante ao encontrado no meio GYM ($0,174\text{ h}^{-1}$) e superior ao calculado para os meios melaço 6% ($0,131\text{ h}^{-1}$) e 10% ($0,146\text{ h}^{-1}$) (Figura 2a). O tempo de geração (T_g) da linhagem

no meio melação 2% (4,4 h) também foi semelhante ao Tg encontrado no meio GYM (4,0h), porém baixo quando comparado com o observado em melação 6% (5,3 h) e 10% (4,8 h) (Figura 2a). As curvas de crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137, baseadas nos dados de células viáveis, mostraram crescimento exponencial até 39 h de cultivo no meio GYM, 20 h no meio melação de 2%, 43 h no meio melação 6% e até 40 h no meio melação 10% (Figura 1). O cultivo sempre iniciou com 10^6 UFC/ml sendo que, no final da fase exponencial, foram observadas 10^8 UFC/ml nos meios GYM, melação 2% e 10% e 10^9 UFC/ml no meio melação 6%. O valor de μ_{\max} da linhagem nos meios melação 2% ($0,171 \text{ h}^{-1}$), 6% ($0,140 \text{ h}^{-1}$) e 10% ($0,161 \text{ h}^{-1}$) foram semelhantes entre si e inferiores ao valor calculado para o meio GYM ($0,232 \text{ h}^{-1}$) (Figura 2b). O Tg da linhagem nos meios melação 2% (4,1 h), 6% (4,97 h) e 10% (4,07 h) foi superior e distinto ao observado no meio GYM (3,03h) (Figura 2b). O pH do caldo não apresentou acidificação no decorrer do cultivo (dados não apresentados). No meio GYM o pH passou de 6,72 (0h) para 7,23 (65h, final do experimento), no meio melação 2% passou de 6,30 (0h) para 6,98 (76h, final do experimento), no meio melação 6% passou de 6,24 (0h) para 7,46 (99h, final do experimento) e, no meio 10% passou de 6,25 (0h) para 7,07 (55h, final do experimento).

A análise da D.O. mostrou que o melação 2% foi o que mais favoreceu o crescimento de linhagem, indicado pela μ_{\max} que foi semelhante ao do meio controle (GYM) e superior àquela observada nas demais concentrações de melação, como ocorreu na análise preliminar do crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 em meio melação de 2% a 10% (Fusconi *et al.* 2005, no prelo). A análise do número de células viáveis mostrou que o meio controle (GYM) foi o que mais favoreceu o crescimento da linhagem, não tendo sido observadas diferenças no crescimento entre as três concentrações de melação testadas. As diferenças observadas com os dados de D.O. e do número de células viáveis podem ter sido em função de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 ser uma linhagem produtora de EPS. A presença de EPS

no meio de cultura pode ter ocasionado uma superestimação dos valores de D.O. e a produção de EPS pela linhagem pode ter levado a uma subestimação do número de células viáveis. A observação microscópica das amostras revelou a presença de agregados celulares formados, provavelmente, pela produção de EPS. A produção de EPS favorece a adesão entre as células e dificulta a contagem baseada em unidades formadoras de colônias por assumir que uma colônia é originada a partir de uma célula (Kimmel & Roberts 1998). Levando em consideração as duas metodologias, foi observado que, para o cultivo de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios testados, o número de células viáveis e a D.O. estão linearmente correlacionados até 27 h de cultivo no meio GYM, quando foi observado 0,685 de D.O. e $51,13 \times 10^6$ UFC/ml ($Y = -0,1078 + 0,0156 X$, onde Y = densidade óptica e X = número de células viáveis); até 24h em meio melão 2%, quando foi observado 0,532 de D.O. e 220×10^6 UFC/ml ($Y = 0,004 + 0,0023 X$); até 27h em meio melão 6%, quando foi observado 0,338 de D.O. e $123,33 \times 10^6$ UFC/ml ($Y = -0,0048 + 0,0027 X$); até 45h de cultivo no meio melão 10%, quando foi observado 0,803 de D.O. e 820×10^6 UFC/ml ($Y = 0,0122 + 0,0001 X$). A análise da produção de EPS pela linhagem foi feita utilizando-se os dados de células viáveis.

As figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, a produção de EPS (total, livre e capsular) e a produção por unidade de concentração celular de EPS (total, livre e capsular) por *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios GYM, melão 2%, 6% e 10%.

G. polyisoprenivorans CCT 7137 produziu EPS no meio GYM e nas três concentrações de melão testadas sendo que, em todos os meios, a produção iniciou durante a fase exponencial e continuou ao longo da fase estacionária de crescimento. É de fundamental importância conhecer a fase de produção EPS de microrganismos específicos, tendo em vista o controle da produção desses polímeros. No planejamento de processos que visam a produção de EPS, deve-se levar em consideração que a fase de crescimento na qual ocorre a

produção de EPS varia de microrganismo para microrganismo e que linhagens da mesma espécie nem sempre seguem o mesmo comportamento (Sutherland 1990).

A produção de EPS até o final da fase exponencial foi destaque no meio melaço 6%, onde a quantidade de EPS total (56,77 g/l) foi semelhante àquela detectada no meio GYM (51,18 g/l), superior à produzida nos meios melaço 2% (17,85 g/l) e 10% (13,85 g/l) e onde a produção de EPS total por unidade de concentração celular ($16,17 \times 10^{-11}$ g/UFC) foi superior e distinta à encontrada nos demais meios. Os EPS produzidos quando a linhagem foi cultivada em melaço 6% foram constituídos por uma maior quantidade de EPS capsular (52,45 g/l) que representou 92,4% do total. Considerando o intervalo de tempo de cultivo até o final do experimento, ou seja, também as 24 horas de fase estacionária, a maior produção de EPS total foi detectada meios melaço 6% (172,86 g/l) e 10% (139,47 g/l), onde a produção de EPS total foi superior e distinta à detectada nos meios GYM (91,12 g/l) e melaço 2% (82,86 g/l). A produção de EPS total por unidade de concentração celular foi superior no meio melaço 10% ($39,03 \times 10^{-11}$ g/UFC). Após a fase exponencial, ao contrário do observado no meio padrão que apresentou EPS constituído por uma maior porcentagem de EPS capsular ou seja, 66,4 % do total (60,50 g/l), nos meios melaço 2%, 6% e 10% foi observada uma maior porcentagem de EPS livre, representando 88,37% (73,22 g/l), 62,4% (62,40 g/l) e 64,22% (64,22 g/l) do total, respectivamente.

A biossíntese de EPS é um processo que ainda não foi totalmente elucidado. Existem evidências de que o crescimento e a produção de EPS sejam dois processos competitivos, uma vez que os precursores para a síntese de EPS são os mesmos usados para funções celulares primárias; entretanto, o que ocasiona o desvio de carbono do metabolismo central para a síntese de EPS ainda não está completamente compreendido (Ramos *et al.* 2001). Segundo Sutherland (1990) é necessário um excesso de açúcares para a produção de EPS e, tanto em escala laboratorial como industrial, são utilizados meios com uma alta relação

carbono/nitrogênio. Assim como foi observado na produção *in vitro* de EPS, a produção de exopolissacarídeos em meio poroso (*in situ*) pode ser controlada alterando a composição do meio de cultura (Vandevivere & Beveye 1992).

Enquanto que o meio controle, GYM, apresenta glicose e maltose como principais carboidratos, o melaço de cana-de-açúcar apresenta sacarose, glicose e frutose como açúcares, com a sacarose em maior porcentagem (Rajakylä & Paloposki 1983). Assim, observou-se que o meio que mais favoreceu o crescimento não foi o que favoreceu a produção de EPS por *G. polyisoprenivorans* CCT7137. O meio GYM, de menor concentração de carboidratos (1,4%) foi o que mais favoreceu o crescimento da linhagem. Os meios melaço 6% e 10%, de maior concentração de açúcares, 2,13% e 3,55%, respectivamente, foram os que mais favoreceram a produção de EPS por *G. polyisoprenivorans* CCT7137, sugerindo o uso potencial do melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo para a produção de EPS pela linhagem.

Digno de destaque foi a maior produção de EPS livre em relação ao capsular nos meios melaço. Vandevivere & Baveye (1992) observaram uma maior influência do EPS livre produzido por uma linhagem de *Pseudomonas* no tamponamento de meios porosos. Os EPS, ao serem sintetizados, podem permanecer aderidos à superfície celular formando uma cápsula ou serem liberados no meio adjacente como um material amorfo (Sutherland 1990). Algumas linhagens produzem apenas um dos dois tipos e outras, ambos (De Vuyst *et al.* 2001), como foi observado em *G. polyisoprenivorans* CCT7137.

Enquanto que bactérias produtoras de EPS como bactérias lácticas (De Vuyst *et al.* 2001), *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas* (Sutherland 1998) vêm sendo extensivamente investigadas afim de serem utilizadas em diferentes segmentos industriais, a literatura sobre a produção de EPS por *Gordonia* é incipiente. Um único trabalho, Kondo *et al.* (2000), relata a caracterização de um EPS denominado gordonan, produzido por *Gordonia sp.* quando cultivada em meio GYM.

O presente trabalho constitui o primeiro estudo sobre a produção de EPS por uma linhagem de *G. polyisoprenivorans* em meio GYM e em meio utilizando melaço de cana-de-açúcar como meio nutriente. Os EPS podem ser sintetizados a partir de produtos químicos puros, com gastos consideráveis, ou podem ser produzidos utilizando substratos fermentáveis de origem local e de fácil obtenção (Sutherland 1996). Uma vez que o melaço de cana-de-açúcar é a fonte de carbono de mais baixo custo no Brasil (Sant'Anna & Torres 1998), é de grande interesse seu uso como substrato alternativo para o cultivo de microrganismos de interesse biotecnológico, como *G. polyisoprenivorans* CCT7137. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam o potencial do melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo a produtos químicos puros para a produção de EPS por *G. polyisoprenivorans* CCT7137.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Brasil) e ao PPG-ERN (UFSCar, Brasil) pelo suporte financeiro; ao Dr. G. Rodrigues Filho (UFU, Brasil) pela utilização do refratômetro, à Dra. D.G. Santana (UFU, Brasil) pela assistência nas análises estatísticas; à D.C.D. Javarotti (UFSCar, Brasil) pelo suporte técnico e à Usina Santo Antônio (Brasil) pelo fornecimento do melaço de cana-de-açúcar.

Referências Bibliográficas

Bergmaier, D., Champagne, C.P. & Lacroix, C. 2003 Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1049-1057.

- Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W. 1991 Understanding bacterial biofilms. *Trends in Biotechnology* **9**, 138-143.
- Borzani, W. 1993 Objective criteria to confirm the existence of the exponential growth phase in a batch microbial process. *Revista de Microbiologia* **24**, 278-280.
- Cérantola, S., Bounéry, J-D, Segonds, C., Marty, N. & Montrozier H. 2000 Exopolysaccharide production by mucoid and non-mucoid strains of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiology Letters* **185**, 243-246.
- Chan, R., Lam, J.S., Costerton, J.W. 1984 Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* **19**, 8-16.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. & Grange, J.M. 1995 *Collin's and Lyne's Microbiological Methods*. p. 493. Oxford: Butterworth - Heinemann. ISBN 0-7506-0653-3.
- Costerton, J.W. 1999 The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **22**, 551-563.
- Degeest, B., Vaningelgem, F. & De Vuyst, L. 2001 Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic and acid bacteria. *International Dairy Journal* **11**, 747-757.
- Dennis, M.L. & Turner, J.P. 1998 Hydraulic conductivity of compacted soil treated with biofilm. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* **124**, 120-127.
- Dubois, M., Gilles, L.A., Hamilton, J.K., Reberes, P.A. & Smith, F. 1956 Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Dupont, I., Roy D. & Lapointe, G. 2000 Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically

- defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **24**, 251-255.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J.L. 1999 Bacteria and protozoa populations in groundwater in a landfill area in São Carlos, SP. *Revista de Microbiologia*, **30**, 196-202.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J. L. 2002 Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 363-369.
- Fusconi, R., Godinho, M.J.L. & Bossolan, N.R.S. Characterization and culture on sugarcane molasses of *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137, a new strain isolated from contaminated groundwater in Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, In press.
- Hannemann, T.F. 1994 *Effects of carbon source on bacterial exopolysaccharide production under denitrifying conditions*. Dissertação, Department of Civil and Environmental Engineering, Washington State University, Washington, EUA.
- Junkins, A.D. & Doyle, M.P. 1992 Demonstration of exopolysaccharide production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **25**, 9-17.
- Kim, G. 2004 Hydraulic conductivity change of bio-barrier formed in the subsurface by the adverse conditions including freeze-thaw cycles. *Cold Regions Science and Thecnology* **38**, 153-164.
- Kimmel, S.A. & Roberts, F.R. 1998 Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 87-92.
- Kondo, T., Yamamoto, D., Yokota, A., Suzuki, A., Nagasawa, H. & Sakuda, S. 2000 Gordonan, an acidic polysaccharide with cell aggregation-inducing activity in insect BM-N4 cells, produced by *Gordonia* sp. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **64**, 2388-2394.

- Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1992 Ultramicrobacteria and their biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* **3**, 283-285.
- Lazar, I. 1993 The microbiology of MEOR, practical experience in Europe. In *Biohydrometallurgical Technologies: Proceedings of an International Biohydrometallurgy Symposium Held in Jackson Hole, Wyoming, USA*, eds Torma, A.E., Apelo, M.L. & Brierley, C.L. pp. 329-338. The Minerals, Metals & Materials Society. ISBN 0-873-39252-3
- López, E., Ramos, I. & Sanromán, M.A. 2003 Extracellular polysaccharides production by *Arthrobacter viscosus*. *Journal of Food Engineering* **60**, 463-467.
- Mattos, K.A., Volpon, A.G.T., Previato, L.M. & Previato, J.O. 1997 *Aplicação de microrganismos produtores de biopolímeros na recuperação de petróleo, avaliação do melão como fonte alternativa para a produção de biopolímeros*. Technical report CENPES/SEBIO, Rio de Janeiro, Brazil.
- Nampoothiri, K.M., Singhanian, R.R., Sabarinath, C. & Pandey, A. 2003 Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry* **38**, 1513-1519.
- Rajakylä, E. & Paloposki, M. 1983 Determination of sugars (and betaine) in molasses by high-performance liquid chromatography. Comparison of the results with those obtained by the classical Lane-Eynon method. *Journal of Chromatography* **282**, 595-602.
- Ramos, A., Boels, I.C., De Vos, W.M. & Santos, H. 2001 Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 33-41.
- Ricciardi, A., Parente, E., Crudele, M.A., Zanetti, F., Scolari, G. & Mannazzu, I. 2002 Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and

- preliminary characterization of the polymer. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 297-308.
- Robertson, E.B. & Firestone, M.K. 1992 Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1284-1291.
- Ross, N., Villemur, R., Deschênes, L. & Samson, R. 2001 Clogging of a limestone fracture by stimulating groundwater microbes. *Water Research* **35**, 2029-2037.
- Sant'Anna, E.S. & Torres, R.C.O. 1998 Growth of *Pediococcus acidilactici* on sugarcane blackstrap molasses. *Revista de Microbiologia* **29**, 202-207.
- Shaw, J.C., Bramhill, B., Wardlaw, N.C., Costerton, J.W. 1985 Bacterial fouling in a model core system. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 693-701.
- Sutherland, I.W. 1990 *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. pp. 70-88. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-36350-0.
- Sutherland, I.W. 1996 Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. *International Biodeterioration & Biodegradation* **38**, 249-261.
- Sutherland, I.W. 1998 Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**, 41-46.
- Sutherland, I.W. 2001 The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Biotechnology* **9**, 222-227.
- Vandevivere, P. & Baveye, P. 1992 Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1690-1698.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D. & Caldwell, D.E. 1995 Bioaccumulation of the herbicide diclofop in extracellular polymers and its utilization by a biofilm community during starvation. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 152-158.

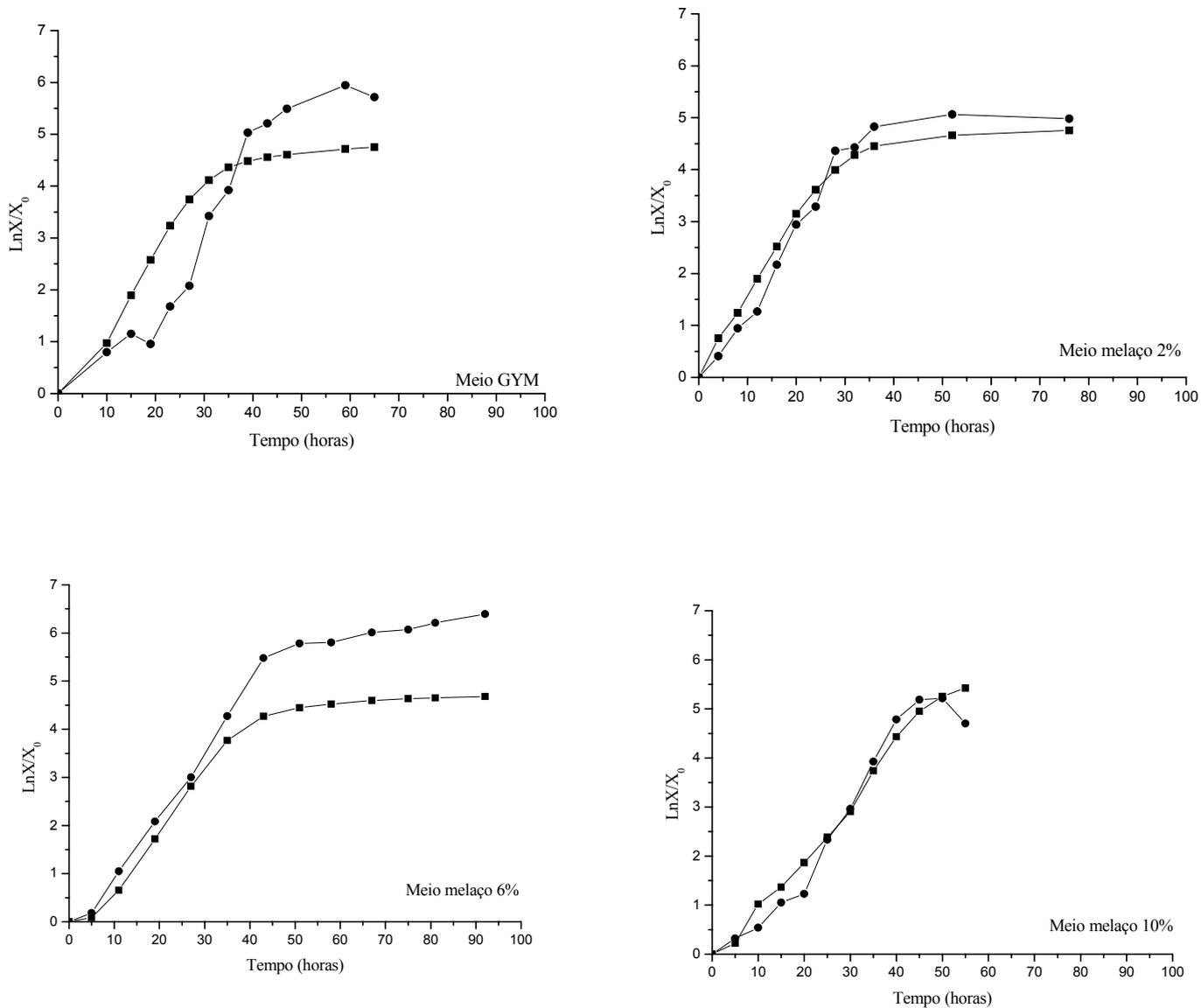
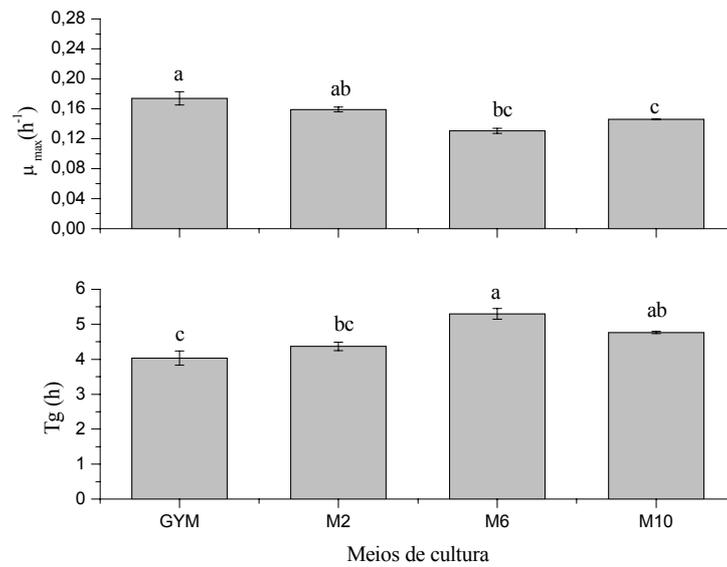
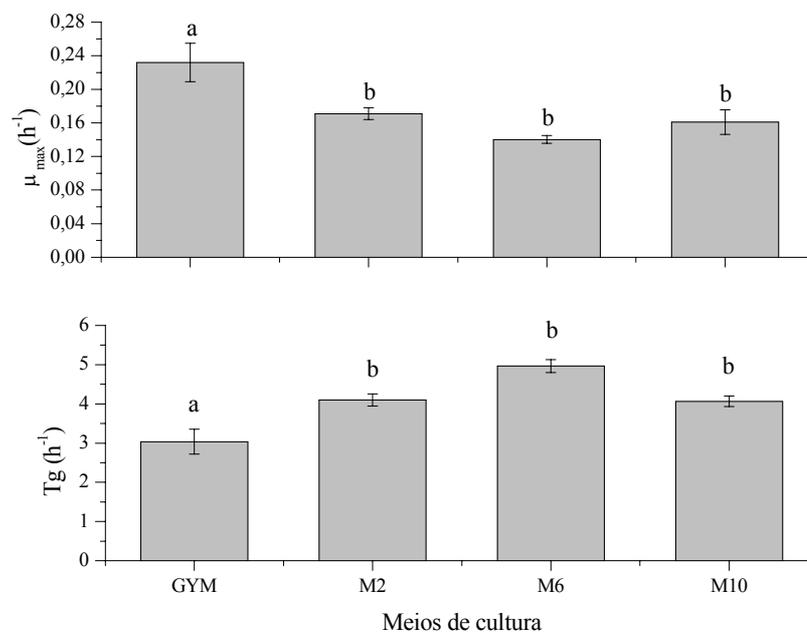


Figura 1. Crescimento (UFC/mL, ●; D.O.₆₀₀, ■) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 em meio GYM, meio melaço 2%, 6% e 10%. Os valores representam médias.

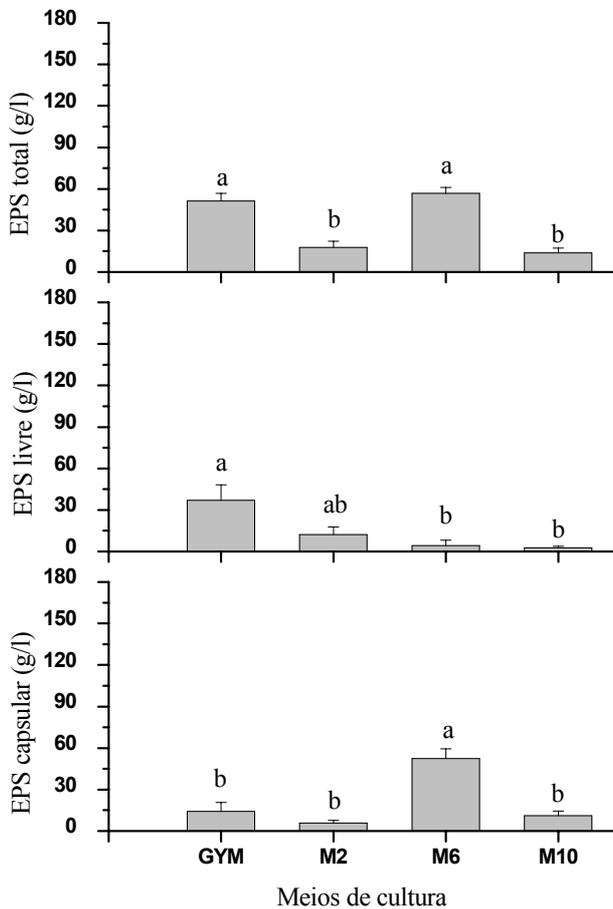


(a)

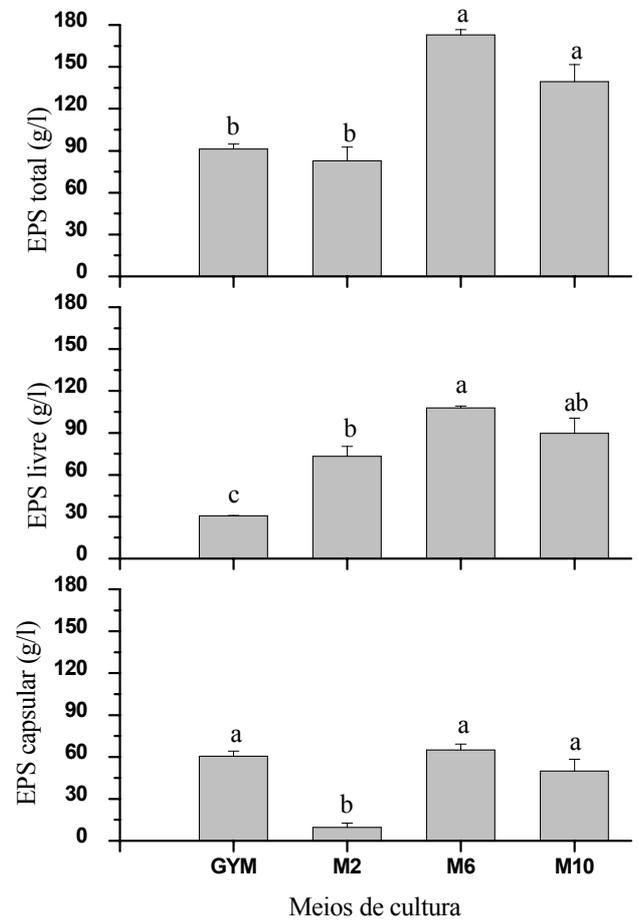


(b)

Figura 2. Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e tempo de geração (Tg) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 em meio GYM e meio melaço de 2%, 6% e 10% (M2 , M6 e M10), calculados a partir dos dados de densidade óptica (D.O.₆₀₀) (a) e de células viáveis (UFC/ml) (b). As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.



(a)



(b)

Figura 3. Exopolissacarídeos (EPS) (total, livre e capsular) produzidos por *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios GYM, melão 2% (M2), melão 6% (M6) e melão 10% (M10). (a) do início do experimento até o final da fase exponencial (b) do início do experimento até 24 h de fase estacionária. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

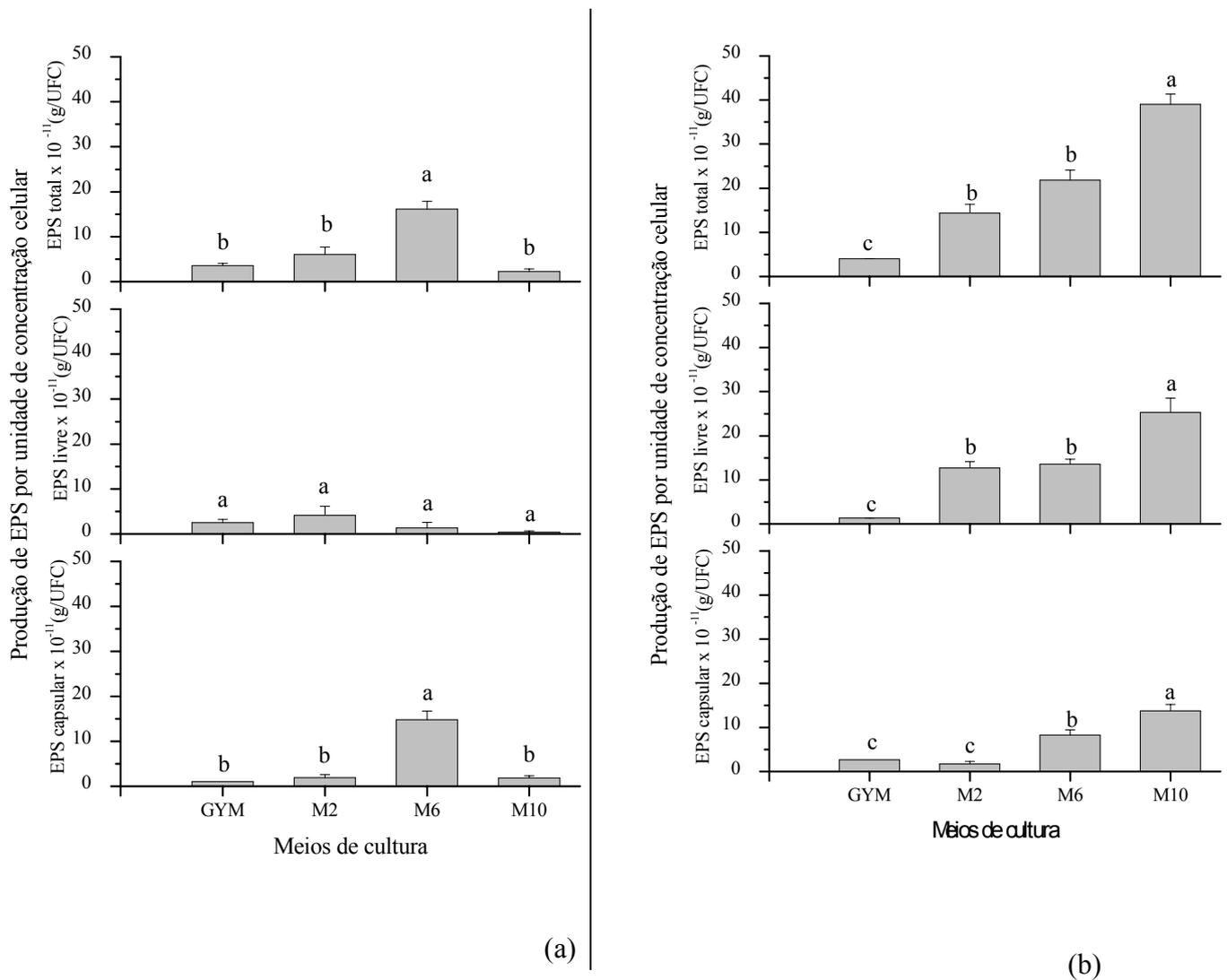


Figura 4. Exopolissacarídeos (EPS) (total, livre e capsular) produzidos por unidade de concentração celular de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 nos meios GYM, melão 2% (M2), melão 6% (M6) e melão 10% (M10). (a) do início do experimento até o final da fase exponencial (b) do início do experimento até 24 h de fase estacionária. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Capítulo 7.

SOBREVIVÊNCIA À DESNUTRIÇÃO DE *GORDONIA POLYISOPRENIVORANS* CCT 7137 ISOLADA DE ÁGUA SUBTERRÂNEA CONTAMINADA

Roberta Fusconi^{1*}; Mirna Januária Leal Godinho¹; Nelma Regina Segnini Bossolan²

¹Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; ²Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

*Corresponding author: Mailing Address: Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. Via Washington Luís Km 235, 13565-905. Caixa Postal 676. São Carlos, SP, Brasil. E-mail: rfusconi@iris.ufscar.br

RESUMO

Gordonia polyisoprenivorans CCT7137, isolada da água subterrânea contaminada pelo chorume de um antigo aterro controlado (São Paulo, Brasil) e produtora de exopolissacarídeos, foi submetida à desnutrição em PBS durante 56 dias a fim de avaliar o seu comportamento quanto à viabilidade e morfologia celular. *G. polyisoprenivorans* CCT7137 apresentou, como respostas de sobrevivência à desnutrição, redução da densidade de células cultiváveis, redução no tamanho celular e alteração da forma celular. O número inicial de células cultiváveis foi $1,51 \times 10^7$ UFC/ml sendo que, após 7 dias de desnutrição, a viabilidade diminuiu para 13,7% ($2,07 \times 10^6$ UFC/ml) e, após 56 dias, para 3,25% ($4,93 \times 10^5$ UFC/ml). Foi observado também que após 7 dias de desnutrição o tamanho celular apresentou uma redução média nos valores de comprimento, razão comprimento/largura, volume e área de 50%, 58%, 40% e 42%, respectivamente, com comprimento médio de $1,15 \mu\text{m}$ e volume de $0,33 \mu\text{m}^3$. Após 7 dias, largura foi a única medida que apresentou um leve aumento (18%) no valor médio. A distribuição das células em classes de comprimento mostrou que a forma celular passou de bastonete para cocobacilar. Após o 7º dia de desnutrição não ocorreram mudanças significativas nas medidas celulares e na distribuição das células em classes. Os resultados obtidos indicam que não é necessário desnutrir a linhagem por mais de uma semana para a obtenção de ultramicrobactérias de *G. polyisoprenivorans* CCT7137 e mostram o potencial de utilização de formas desnutridas da mesma em futuros testes em meio poroso para estudar a produção de exopolissacarídeos *in situ*.

Palavras chave: *Gordonia polyisoprenivorans*, desnutrição bacteriana, ultramicrobactéria, águas subterrâneas, aterro controlado

Introdução

As bactérias respondem à alterações ambientais lançando mão de mecanismos adaptativos que visam à sobrevivência. Assim, as bactérias que não formam esporos ou cistos sobrevivem em baixas condições nutricionais adotando respostas de sobrevivência à desnutrição, tais como a redução do tamanho celular, a utilização de produtos de armazenamento, alterações na viabilidade, a degradação de proteínas, a redução do RNA, entre outras (Lappin-Scott & Costerton 1990). A redução de tamanho celular, em muitas espécies bacterianas, leva à formação de ultramicrobactérias (UMB), definidas por Torella & Morita (1981) como células de 0,3 μm e, posteriormente, por Morita (1993) como células abaixo de 1,0 μm ou mesmo células com tamanho inferior às encontradas em meio rico.

Durante o processo de desnutrição a célula utiliza reservas de energia endógena e, dependendo da espécie, o metabolismo endógeno pode degradar diversas enzimas, com exceção das associadas à capacidade de utilizar energia. Quando a energia volta a ser disponibilizada, o processo metabólico retorna ao normal e as enzimas degradadas são novamente sintetizadas, desde que o DNA esteja presente (Morita 1988). Desta forma, a condição de UMB é reversível e, quando as condições nutricionais são restabelecidas, a célula aumenta de tamanho e volta a crescer (Lappin-Scott & Costerton 1992).

O estado de sobrevivência à desnutrição de bactérias, com a conseqüente redução do tamanho celular, pode ser induzido *in vitro* e apresenta grande interesse biotecnológico. A redução do tamanho celular melhora a penetração de inóculos bacterianos para o tamponamento seletivo de meios porosos e fraturados utilizado nas técnicas de MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) (Lappin-Scott *et al.* 1988; MacLeod *et al.* 1988; Lappin-Scott & Costerton 1992), para a biorremediação de áreas contaminadas (Herman & Costerton

1993; Caccavo *et al.* 1996) e para a formação de biobarreiras subterrâneas. As biobarreiras são formadas pelas bactérias e os exopolissacarídeos (EPS) por elas produzidos visam separar áreas adjacentes, impedindo que uma pluma contaminante se propague (Lappin-Scott & Costerton 1992).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de uma linhagem de *G. polyisoprenivorans*, produtora de EPS frente à desnutrição com vistas à sua aplicabilidade em processos de formação de biobarreiras. Para atingir o objetivo proposto foram analisadas a viabilidade, o tamanho e a forma celular ao longo do processo de desnutrição da linhagem.

Materiais e métodos

Linhagem bacteriana

Gordonia polyisoprenivorans CCT 7137 foi isolada durante a triagem e seleção de bactérias produtoras de EPS (Fusconi & Godinho 2002), de água subterrânea contaminada pelo chorume proveniente do antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (São Paulo, Brasil) (Fusconi & Godinho 1999) e depositada junto à Coleção de Cultura Tropical (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello) com o número CCT 7137.

Meios de cultura e condições de cultivo

O cultivo em meio líquido para preparação do inóculo foi realizado em caldo nutritivo. O cultivo foi em aerobiose a 25°C, com agitação constante de 137 rpm. A bactéria foi desnutrida em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril (g/l: NaCl, 8,5; K₂HPO₄, 1,23;

KH₂PO₄, 0,4). Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) com agitação constante. O cultivo em meio sólido foi realizado em ágar nutritivo, em aerobiose a 25°C.

*Desnutrição de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137*

Antes da desnutrição, *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 foi cultivada em em caldo nutritivo até a fase exponencial de crescimento (26 a 28 h). Desta pré-cultura foi retirado o inóculo para a desnutrição. As células foram separadas do meio de cultura e lavadas antes de serem inoculadas nos frascos contendo a solução para a desnutrição. Para a separação das células, duas alíquotas de 50 ml foram centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram lavadas três vezes. Em cada lavagem, as células sedimentadas foram ressuspensas em 50 ml de PBS estéril e centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C (Centrífuga Sorval, RC5C Plus). Após a terceira lavagem, as células de cada tubo foram ressuspensas em 50 ml de solução PBS estéril, e o conteúdo de cada tubo, transferido para um erlenmeyer estéril contendo uma barra magnética. O inóculo assim preparado foi agitado até o desaparecimento dos grumos de células. Duas alíquotas de 50 ml do inóculo foram transferidas, respectivamente, para dois erlenmeyers de 1000 ml contendo 450 ml de solução PBS estéril e uma barra magnética. Estes frascos foram mantidos à temperatura ambiente com agitação constante e foram amostrados periodicamente para a avaliação da viabilidade, tamanho e forma celular.

Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela análise da densidade de células cultiváveis (UFC/ml) estimada pelo método de microgotas (Collins *et al.* 1995). As placas com ágar

nutritivo, contendo 6 microgotas de 5µl para cada diluição testada, foram incubadas a 25°C de 48 a 72 horas, após o que foram contadas as microcolônias presentes em cada microgota.

Avaliação do tamanho celular

O tamanho celular foi analisado a partir de imagens feitas em microscopia eletrônica de varredura, segundo técnica descrita adiante, no início (T₀) e após 7 (T₇), 28 (T₂₈), 42 (T₄₂) e 56 (T₅₆) dias de desnutrição. O comprimento e a largura de 50 células de cada réplica foram medidas manualmente utilizando-se o software Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics). Para análise do tamanho das células, além das medidas de comprimento e largura, foi calculada a razão comprimento/largura, o volume e a área.

Para o cálculo do volume e a área foi utilizada a fórmula matemática que representa a morfologia de bastonetes, ou seja, cilindro com lados paralelos e as correspondentes calotas nas extremidades.

Volume do cilindro: $V = (\pi/4) \cdot L^2 \cdot (C - L/3)$ (Bolter *et al.* 1993)

Área do cilindro: $A = \pi \cdot C \cdot L$ (Sun & Liu 2003)

Onde, C representa o comprimento e L a largura da célula.

Os resultados foram analisados pela análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Avaliação da forma celular

A forma celular foi definida pela razão comprimento/largura segundo Racy (2004): a) entre 1,0 e 1,25 para cocos; b) entre 1,26 e 1,75 para cocobacilos; c) entre 1,76 e 5,0 para bastonetes e d) maior que 5,0 para filamentos.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras para as análises em microscopia eletrônica de varredura foram preparadas segundo Araújo (1995) e Bratbak (1993):

1. As amostras foram fixadas, a uma concentração final de 2,5% (v/v), com uma solução estoque de glutaraldeído 10% (v/v) diluída em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 gelado. Após a fixação, as amostras foram deixadas 6 horas na geladeira (4°C) e, em seguida, filtradas em membranas de polycarbonato de 0,22µm de porosidade;
2. As células retidas nas membranas foram lavadas três vezes com 3 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,3 gelado que foi deixado 10 minutos sobre as membranas antes de ser filtrado;
3. As células lavadas foram desidratadas com 3 ml de uma série de soluções de etanol (v/v: etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol 100%) que foram deixadas durante 10 minutos sobre as membranas antes da filtração. O procedimento com a solução de etanol 100% foi repetido três vezes;
4. As membranas foram retiradas do conjunto de filtração, cortadas e coladas com esmalte incolor no suporte apropriado para a análise e, em seguida, foram transferidas para a estufa de secagem a 37 ± 1 °C por 12 a 14 horas;
5. As amostras foram recobertas com ouro (Sputter Coater, Balzers SCD – 050) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (Digital Scanning Microscope – DSM 960, Zeiss).

Resultados e Discussão

A utilização de UMB para a formação de biobarreiras envolve a seleção de bactérias capazes de reduzir de tamanho e de produzir EPS. As bactérias são desnutridas, as UMB formadas são inoculadas na área em questão e, ressuscitadas por nutrientes injetados posteriormente. Assim,

as bactérias retomam seu tamanho normal, o crescimento e a produção de EPS são restabelecidos e, uma biobarreira é formada na área em questão (Lappin-Scott & Costerton 1992).

O comportamento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 frente à desnutrição foi avaliado e, para isso, a bactéria foi mantida em PBS estéril durante 56 dias. Durante o processo de desnutrição, observou-se uma redução acentuada na viabilidade e nas medidas celulares ao final dos primeiros 7 dias, período após o qual as variações ocorridas nestas medidas foram pequenas.

O processo de desnutrição iniciou com $1,51 \times 10^7$ UFC/ ml (T_0) sendo que, durante os primeiros 7 dias, foi observada uma diminuição acentuada na densidade de bactérias cultiváveis que passou para $2,07 \times 10^6$ UFC/ ml (T_7), ou seja, uma viabilidade de 13,7 % em relação ao T_0 (Figura 1). Entre o 7° e o 35° dia a densidade de bactérias cultiváveis se manteve constante na ordem de 10^6 e 13,7% de viabilidade; após o 35° dia a densidade diminuiu gradualmente até atingir $4,93 \times 10^5$ UFC/ml (3,3% de viabilidade) ao final da desnutrição (T_{56}).

Amy & Morita (1983) e Morita (1988) definiram quatro padrões de respostas à desnutrição, que são: a) aumento inicial do número de células viáveis seguido por uma redução até um valor constante; b) o número de células viáveis permanece constante; c) aumento do número de células viáveis até um valor constante; d) redução no número de células viáveis até atingir um valor constante. A análise da densidade de bactérias cultiváveis de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 mostrou que, em relação à viabilidade celular, a bactéria apresentou um padrão de resposta à desnutrição semelhante ao padrão 'd' mas que, até o período observado (56 dias), as células não haviam atingido um valor constante.

A porcentagem de viabilidade de 13,7% observada após 28 dias de desnutrição de *G. polyisoprenivorans* CCT 7131 foi inferior à observada em 10 espécies de *Arthrobacter*, em

um estudo sobre desnutrição de bactérias corineformes, onde a viabilidade variou de 17% em *A. variabilis* a 87% em *A. atrocyaneus*, para o mesmo período (Boylen & Mulks 1978).

Além da redução da viabilidade celular frente à desnutrição é sabido que algumas bactérias, como resposta à determinados estresses ambientais (ie desnutrição), podem perder a capacidade de crescer em meios nos quais são rotineiramente cultivadas, mas permanecem metabolicamente ativas. Tais bactérias são chamadas de bactérias viáveis mas não cultiváveis (VBNC, *viable but nonculturable cells*) (Oliver 1993) e são de grande preocupação no monitoramento da potabilidade da água (Leclerc & Moreou 2002). Assim, embora não hajam registros na literatura sobre VBNC em *Gordonia*, é necessário levar em consideração que a viabilidade celular apresentada por *G. polyisoprenivorans* CCT7137 pode ser superior à detectada pela análise da densidade de bactérias cultiváveis.

O aspecto das células de *G. polyisoprenivorans* CCT7137 durante o processo de desnutrição pode ser visto na Figura 2. A avaliação do tamanho celular da linhagem mostrou que os valores médios das medidas de comprimento, razão comprimento/largura, volume e área, a partir do 7º dia, foram inferiores e distintos aos do T₀, indicando uma redução do tamanho das células da linhagem (Figura 3). O comprimento passou de 2,34 µm (T₀) para 1,15 µm (T₇), a razão comprimento/largura de 4,14 (T₀) para 1,73 (T₇), o volume de 0,55 µm³ (T₀) para 0,33 µm³ (T₇) e a área de 4,17 µm² (T₀) para 2,41 µm² (T₇), representando uma redução nos valores de 50%, 58%, 40% e 42%, respectivamente. A largura foi a única medida que apresentou um leve aumento (18%) no valor médio do início do experimento para o 7º dia de desnutrição. Entre o 7º e o 56º dia não houve diferença nos valores médios das medidas das células, em relação aos registrado no 7º dia.

A distribuição das células medidas em classes de comprimento e largura (Figura 4) mostrou uma maior porcentagem de células com comprimento entre 2,0 e 2,5 µm (37%), no início da desnutrição (T₀), enquanto que, no T₇ e T₅₆ foram observadas uma maior

porcentagem de células entre 0,7 e 0,9 μm (36%) e 0,9 e 1,1 μm (39%), respectivamente. Em relação à largura, foi observada uma maior porcentagem de células (22%) entre 0,55 e 0,57 μm no T_0 e, entre 0,65 e 0,7 μm (39%) e 0,6 e 0,65 μm (31%), no T_7 e T_{56} , respectivamente.

A distribuição das células medidas em classes da razão comprimento/largura (Figura 5) revelou que no T_0 ocorreu uma maior porcentagem de células entre 4,0 e 4,5 (18%) e no T_7 e T_{56} , uma maior porcentagem de células entre 1,4 e 1,6 (26% e 25%, respectivamente). Esses dados revelam que, durante o processo de desnutrição de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 ocorreu uma alteração na distribuição da forma das células medidas. No início da desnutrição (T_0) a maior porcentagem de células apresentou forma de bastonetes enquanto que após o 7º dia de desnutrição foi detectada uma maior porcentagem de cocobacilos.

A distribuição em classes das medidas de volume mostrou ainda que no T_0 ocorreu maior porcentagem de células medidas entre 0,4 e 0,5 μm^3 (25%) enquanto que no T_7 e T_{56} foi observada uma maior porcentagem de células entre 0,2 e 0,3 μm^3 (50% e 42%, respectivamente). Da mesma forma a distribuição em classes das medidas de área mostrou que no T_0 ocorreu maior porcentagem de células medidas entre 3,5 e 4,0 μm^2 (21%) enquanto que no T_7 e T_{56} foi observada uma maior porcentagem de células entre 2,0 e 2,5 μm^2 (33% e 39%, respectivamente).

A redução do tamanho celular e a alteração na forma celular observadas em *G. polyisoprenivorans* CCT7137 são respostas que já foram observadas por diversos autores durante o processo de desnutrição *in vitro* de várias espécies bacterianas. Após serem submetidas à desnutrição, células de *Shewanella alga* BrY apresentaram uma redução de 50% no volume e arredondamento das células (Caccavo *et al.* 1996), células de um actinomiceto degradador de p-nitrofenol apresentaram fragmentação dos filamentos em células isoladas de 1,7 x 0,7 μm (Herman & Costerton 1993), e isolados de águas doces apresentaram alteração na

forma de bastonete ou vibrio para cocos e redução no tamanho celular entre 40% e 79% (Amy & Morita 1983).

O presente trabalho constitui o primeiro estudo sobre a desnutrição *in vitro* de uma linhagem de *G. polyisoprenivorans*. *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 foi selecionada para estudos de desnutrição visando sua aplicabilidade em processos de formação de biobarreiras ambientais, uma vez que é uma linhagem não esporulante (Fusconi & Godinho 2002) e que cresce (Fusconi *et al.* 2005, no prelo) e produz EPS a partir de melação de cana-de açúcar como única fonte de nutrientes (dados não publicados). Além disso, Blenkinsopp & Costerton (1991) propuseram a associação de UMB degradadoras de contaminantes às biobarreiras e *G. polyisoprenivorans* foi originalmente descrita como degradadora de borracha (Linos *et al.* 1999).

G. polyisoprenivorans CCT7137 apresentou três respostas de sobrevivência à desnutrição: redução da densidade de células cultiváveis, redução no tamanho celular formando ultramicrobactérias e alteração da forma celular de bastonetes para cocobacilos. Após 7 dias de desnutrição não foram observadas mudanças no tamanho celular e na alteração da forma celular; por outro lado, tempos maiores de desnutrição (56 dias) levaram a uma redução drástica da densidade de células cultiváveis. Assim, os resultados indicam que, para futuros estudos, não seria necessário desnutrir a linhagem por mais de uma semana, sendo a viabilidade mantida em 13,7% com células já com tamanho reduzido. Tendo em vista a possível aplicação da linhagem testada para a formação de biobarreiras, a redução do tamanho celular é de fundamental importância uma vez que melhora a penetração de bactérias em meios porosos (Lappin-Scott & Costerton 1990; Lappin-Scott & Costerton 1992). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram o potencial de *G. polyisoprenivorans* CCT7137 para ser utilizada como UMB em testes em meio poroso para estudar a produção *in situ* de EPS.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES (Brasil) e ao PPG-ERN (UFSCar, Brasil) pelo suporte financeiro, à Dra. E.P. Gianotti (USP, Brasil) pela assistência na preparação das amostras para a microscopia eletrônica, à D.C. D. Javarotti (UFSCar, Brasil) pelo suporte técnico e ao Grupo de Biofísica Molecular (IFSC – USP) pela possibilidade de utilizar a centrífuga Sorval, RC5C Plus.

Referências Bibliográficas

- Amy P.S., Morita, R.Y. 1983 Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1109-1115.
- Araújo, J.C. 1995 *Caracterização e evolução de biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado em esgoto sanitário sintético*. Dissertation, Hidráulica e Saneamento USP, São Carlos, Brazil.
- Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W. 1991 Understanding bacterial biofilms. *Trends in Biotechnology* **9**, 138-143.
- Boylen, C.W. & Mulks, M.H. 1978 The survival of coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *Journal of General Microbiology* **105**, 323-334.
- Bratbak, G. 1993 Microscope methods for measuring bacterial biovolume, epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, eds. Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. pp. 309-317. Boca Raton: Lewis Publishers. ISBN 0-873-715640
- Bolter, M., Möller, R. & Dzomla, W. 1993 Determination of bacterial biovolume with epifluorescence microscopy: comparison of size distributions from image analysis and size classifications. *Micron* **24**, 31-40.

- Caccavo, Jr. F., Ramsing, N.B. & Costerton, J.W. 1996 Morphological and metabolic responses to starvation by the dissimilatory metal-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 4678-4682.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. & Grange, J.M. 1995 *Collin's and Lyne's Microbiological Methods*. p. 493. Oxford: Butterworth - Heinemann. ISBN 0-7506-0653-3.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J.L. 1999 Bacteria and protozoa populations in groundwater in a landfill area in São Carlos, SP. *Revista de Microbiologia*, **30**, 196-202.
- Fusconi, R. & Godinho, M.J. L. 2002 Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian Journal of Biology* **62**, 363-369.
- Fusconi, R., Godinho, M.J.L. & Bossolan, N.R.S. Characterization and culture on sugarcane molasses of *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137, a new strain isolated from contaminated groundwater in Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, In press.
- Herman, D.C. & Costerton, J.W. 1993 Starvation-survival of a p-nitrophenol-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 340-343.
- Lappin-Scott, H.M., Cusack, F. & Costerton, J.W. 1988 Nutrient resuscitation and growth of starved cells in sandstone cores: a novel approach to enhanced oil recovery. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**, 1373-1382.
- Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1990 Starvation and penetration of bacteria in soils and rocks. *Experientia* **46**, 807-812.
- Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1992 Ultramicrobacteria and their biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology* **3**, 283-285.
- Leclerc, H. & Moreau, A. 2002 Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews* **26**, 207-222.

- Linos, A., Steinbüchel, A., Spröer, C. & Kroppenstedt, R.M. 1999 *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1785-1791.
- MacLeod, F.A., Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. 1988 Plugging of a model rock system by using starved bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1365-1372.
- Morita, R.Y. 1988 Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation in nature. *Canadian Journal of Microbiology* **34**, 436-440.
- Morita, R.Y. 1993 Bioavailability of energy and starvation state. In *Starvation in Bacteria*, ed Kjelleberg, S. pp. 1-23. New York: Plenum Press. ISBN 0-306-44430-5
- Oliver, J.D. 1993 Formation of viable but nonculturable cells. In *Starvation in Bacteria*, ed Kjelleberg, S. pp. 239-272. New York: Plenum Press. ISBN 0-306-44430-5
- Racy F.P.P. 2004 *Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios*. Dissertação, PPG-ERN, 63, UFSCar, São Carlos, Brasil.
- Sun, J. & Liu, A.D. 2003 Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal Of Plankton Research* **25**, 1331–1346.
- Torella, F. & Morita, R.Y. 1981 Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 518-527.

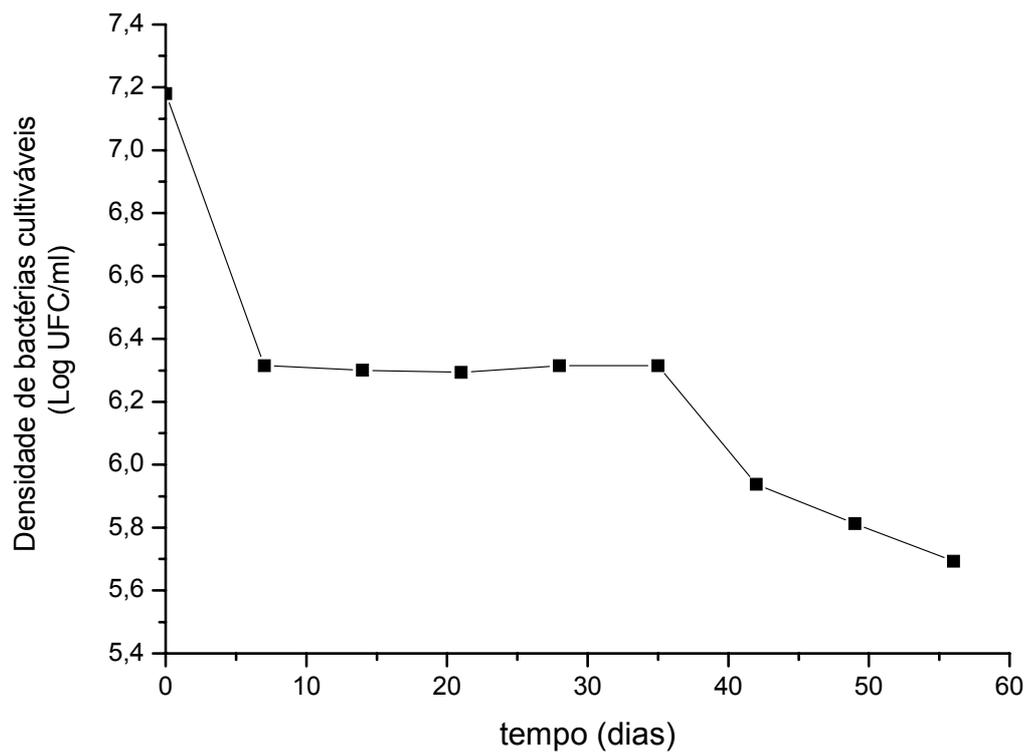
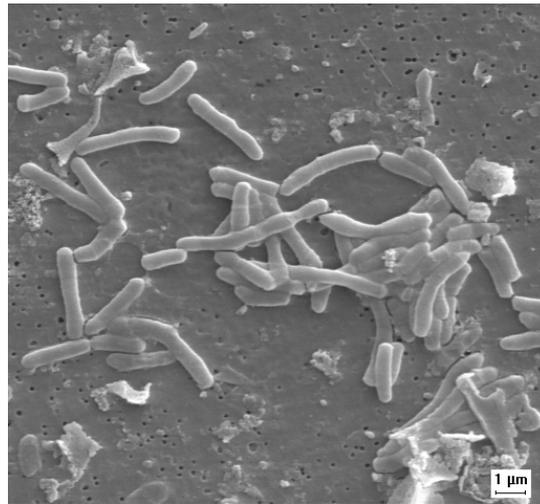
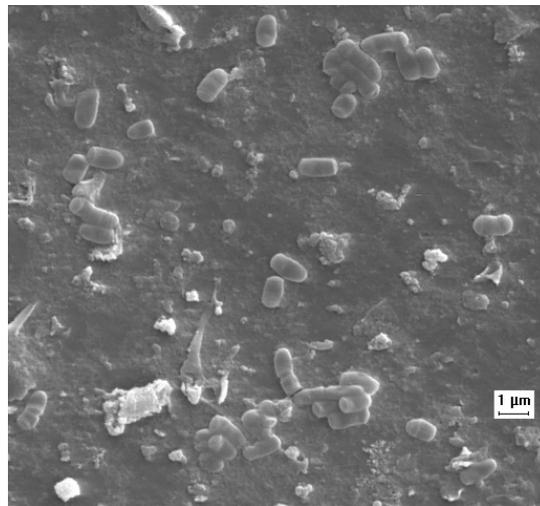


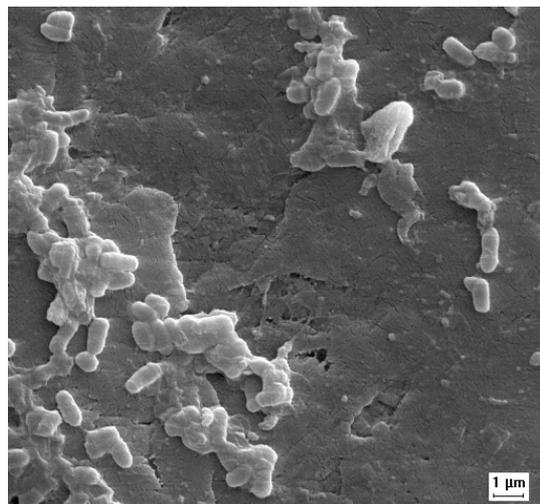
Figura 1. Viabilidade celular durante o processo de desnutrição de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137. Os valores representam médias.



T₀



T₇



T₅₆

Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137 durante o processo de desnutrição.

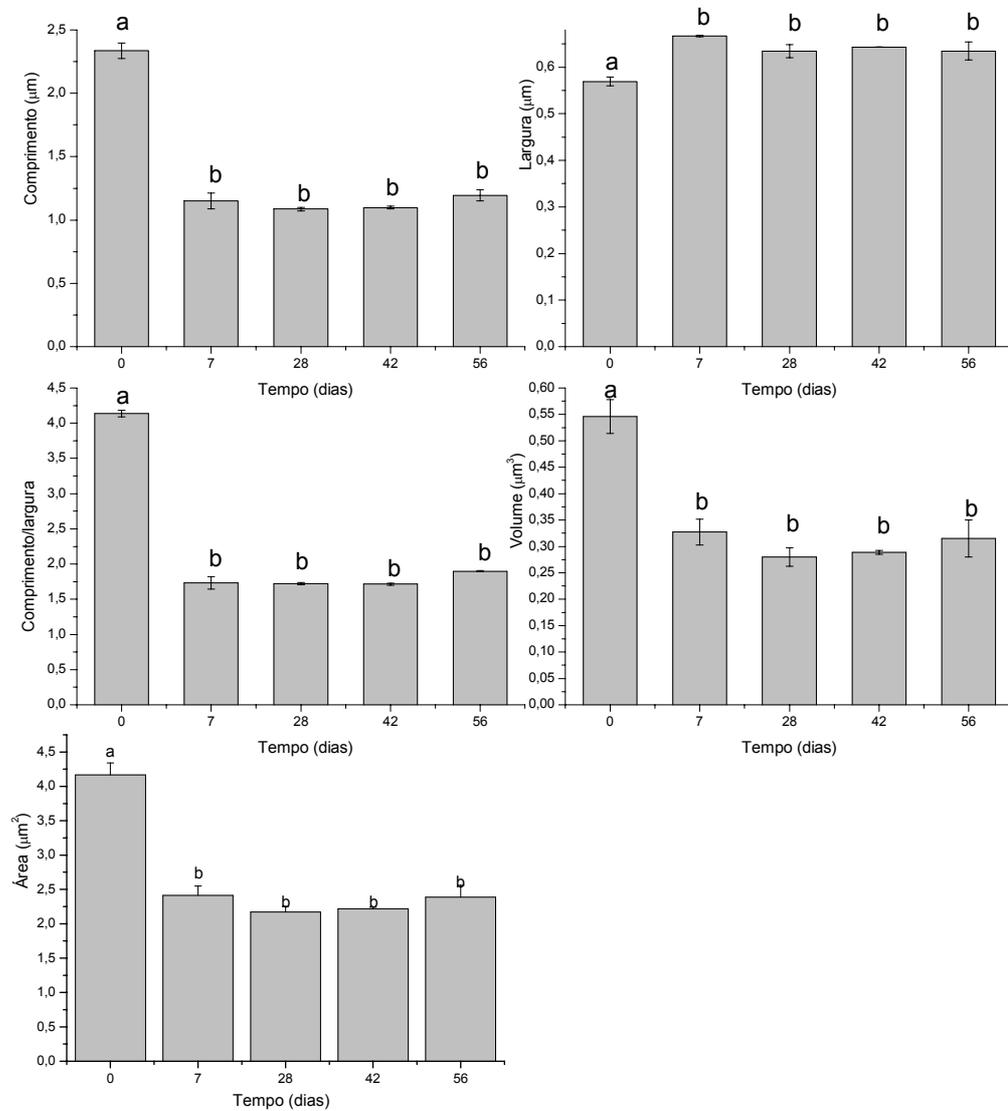
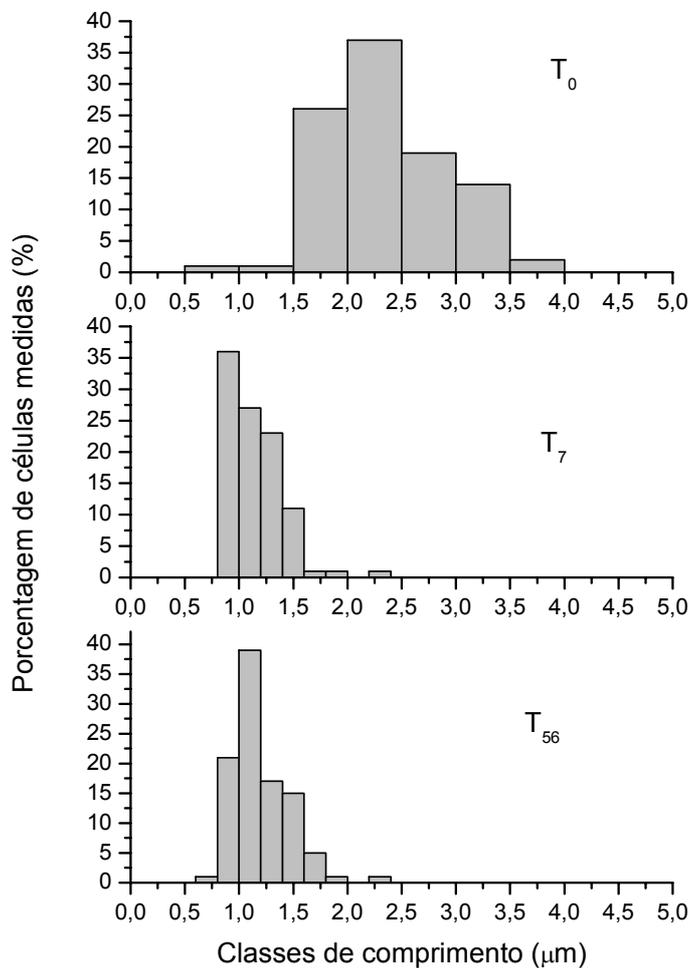
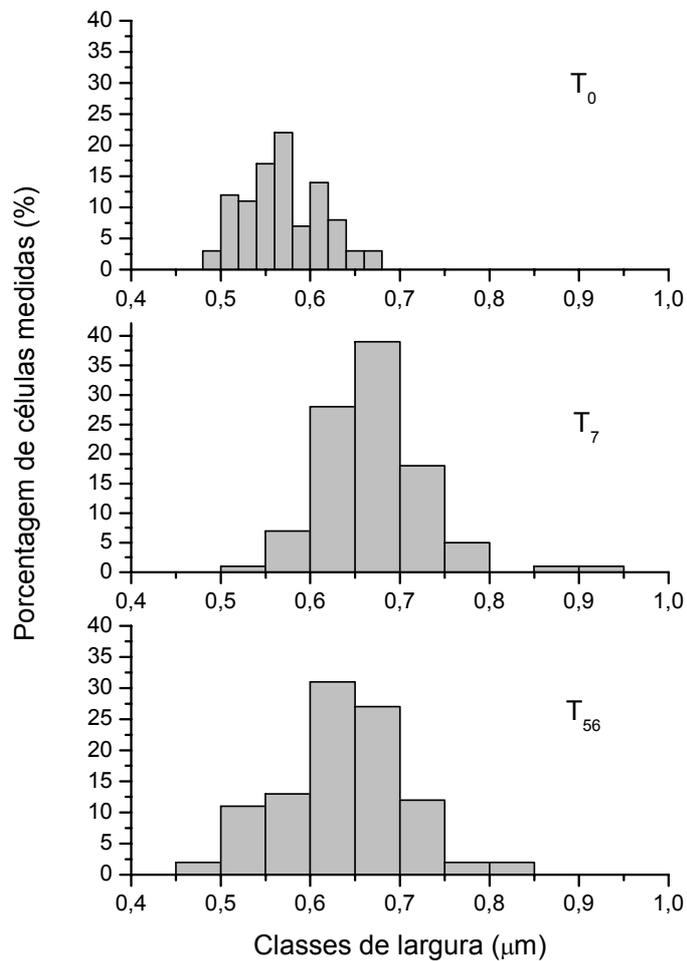


Figura 3 . Medidas das células de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT7137 durante o processo de desnutrição. As médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.



(a)



(b)

Figura 4. Classes de comprimento (a) e largura (b) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 durante o processo de desnutrição (0, 7 e 56 dias). Valores baseados na medida de 100 células.

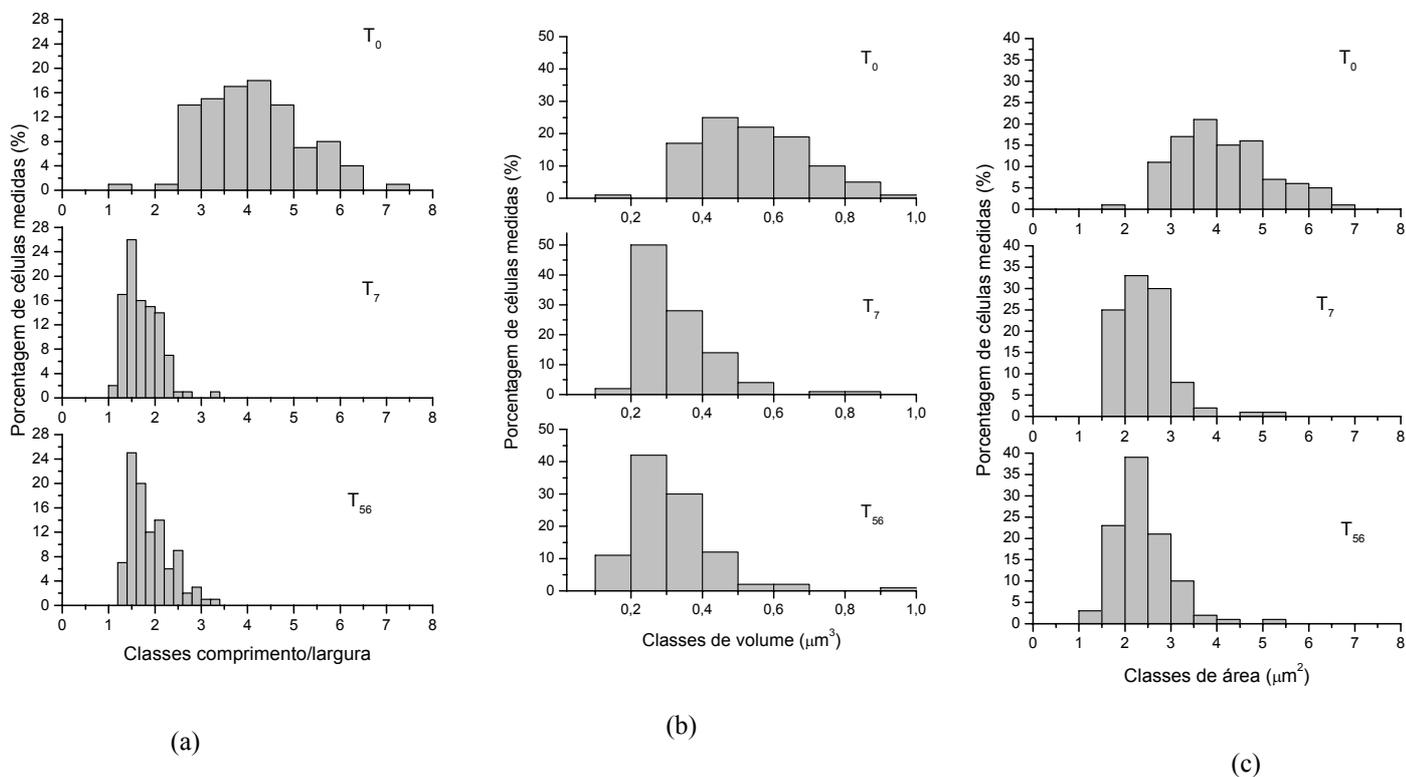


Figura 5. Classes da relação comprimento/largura (a), volume (b) e área (c) de *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137 durante o processo de desnutrição (0, 7 e 56 dias). Valores baseados na medida de 100 células.

8. CONCLUSÕES

- A linhagem Lc, *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7277, e a linhagem Lg, *G. polyisoprenivorans* CCT 7137, provenientes das águas subterrâneas na área do antigo aterro controlado da cidade de São Carlos (SP), constituem duas das seis linhagens de *G. polyisoprenivorans* até então isoladas e as primeiras isoladas de ecossistema brasileiro;
- *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 apresentou crescimento com bom rendimento celular e produção de EPS quando cultivada em meio melaço de cana-de-açúcar, mostrando que o mesmo apresenta potencial para ser utilizado como meio nutriente para a linhagem, alternativo à produtos químicos puros;
- *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 apresentou diminuição da viabilidade celular, redução de tamanho celular e alteração da forma celular, como respostas à desnutrição *in vitro*. Estas características são favoráveis ao seu uso em testes de redução de permeabilidade em meio poroso com a utilização de melaço de cana-de-açúcar com vistas à aplicação da tecnologia de biobarreiras.

9. SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Estudar a biodegradação de substratos de borracha por *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7277 e *G. polyisoprenivorans* CCT 7137;
- Modelar o crescimento de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 em meio contendo melaço de cana-de-açúcar;
- Estudar a cinética de produção de EPS por *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 em melaço de cana-de-açúcar;
- Caracterizar os EPS produzidos por *G. polyisoprenivorans* CCT 7137;
- Verificar a formação de células viáveis mas não cultiváveis por *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 durante o processo de desnutrição;
- Realizar testes em meio poroso com células vegetativas e UMB de *G. polyisoprenivorans* CCT 7137 para estudar a produção *in situ* de EPS, fornecendo melaço de cana-de-açúcar como meio nutriente, e verificar o potencial de tamponamento da mesma para a formação de biobarreiras.