

Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu

Paulo Ivan Fernandes Júnior⁽¹⁾, João Pedro da Silva Almeida⁽²⁾, Samuel Ribeiro Passos⁽³⁾,
Paulo Jansen de Oliveira⁽²⁾, Norma Gouvêa Rumjanek⁽⁴⁾ e Gustavo Ribeiro Xavier⁽⁴⁾

⁽¹⁾Embrapa Semiárido, BR 428, km 152, CEP 56302 Petrolina, PE. E-mail: paulo.ivan@cpatsa.embrapa.br ⁽²⁾Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, BR 465, km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: joao.p.sa@hotmail.com, pjansen@ufrj.br ⁽³⁾UFRRJ, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos. E-mail: passos.samuel@gmail.com ⁽⁴⁾Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: norma@cnpab.embrapa.br, gustavo@cnpab.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e o comportamento reológico de exopolissacarídeos (EPS) produzidos por rizóbios isolados de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], e a similaridade desses isolados, pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado. As bactérias foram cultivadas em meio YM líquido e os EPS foram obtidos por precipitação com etanol gelado a partir do caldo de cultivo. Em seguida, eles foram recuperados por centrifugação, secados a vácuo, pesados e ressuspensos em água para avaliações reológicas. Os três isolados avaliados apresentaram diferenças na produção e na eficiência relativa da produção de EPS, com destaque para o isolado 8.1c. Os EPS demonstraram comportamento não newtoniano e pseudoplástico, porém também apresentaram diferenças na viscosidade aparente em uma mesma taxa de cisalhamento. Na taxa de cisalhamento de 1 s^{-1} , os três isolados foram diferentes, enquanto na taxa de cisalhamento de 40 s^{-1} , os isolados 53.5 e 30.6a2 foram iguais e diferiram do isolado 8.1c. A similaridade dos isolados foi condizente com os resultados de reologia dos EPS, em que bactérias que sintetizaram EPS com menor viscosidade aparente apresentaram maior similaridade.

Termos para indexação: *Cajanus cajan*, ARDRA, biopolímeros, fixação biológica de nitrogênio, inovação tecnológica, reologia.

Production and rheological behavior of exopolysaccharide synthesized by pigeonpea rhizobia isolates

Abstract – The objective of this work was to evaluate the production and the rheological behavior of exopolysaccharides (EPS) produced by pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] rhizobia isolates, as well as to evaluate the similarity of these isolates through amplified ribosomal DNA restriction analysis technique. The bacteria were cultured in YM liquid media and the EPS were precipitated with cold ethanol from culture broth. After that, they were vacuum dried, weighted, stored and resuspended in water to rheological evaluations. The three evaluated isolates showed differences on the production and productivity of EPS, and the isolate 8.1c stood out, with higher relative efficiency. The evaluated EPS showed non-newtonian and pseudoplastic behavior, however they also presented differences as to the apparent viscosity at the same shear rate. At the shear rate of 1 s^{-1} all isolates were different, while at the shear rate of 40 s^{-1} the isolates 53.5 and 30.6a2 were the same, differing from the isolate 8.1c. Genetic similarity of the isolates was in agreement with the rheology results, where bacteria that synthesized EPS with lower apparent viscosity presented the higher similarity.

Index terms: *Cajanus cajan*, ARDRA, biopolymers, biological nitrogen fixation, technological innovation, rheology.

Introdução

Os exopolissacarídeos (EPS) bacterianos desempenham um importante papel na ecologia de bactérias, como as dos gêneros *Sinorhizobium* (Rinaudi et al., 2010), *Mesorhizobium* (Wang et al., 2008) e *Rhizobium* (Fujishige et al., 2008). Além disso, participam da sinalização molecular no processo de simbiose com

plantas e de mecanismos de "quorum sensing" e de formação de biofilme (Rumjanek et al., 2004; Fujishige et al., 2008; Rinaudi & Giordano, 2010). Os EPS de bactérias do solo também podem apresentar importantes aplicações voltadas para diversos setores da indústria (Sutherland, 2001). No setor farmacêutico, os EPS já são utilizados como veículos para a administração oral de medicamentos (Billa et al., 2000); enquanto no setor

alimentício, eles são utilizados como espessantes, com a função de contribuir para o aumento da viscosidade de alimentos, como iogurtes (Rinaudo, 2008).

O EPS bacteriano mais bem estudado e caracterizado é a goma xantana, produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Diversas estirpes de *Xanthomonas* spp. são capazes de produzir grandes quantidades de goma xantana com características específicas, o que permite alta aplicabilidade dessas macromoléculas (Rinaudo, 2008; Rottava et al., 2009). Porém, *Xanthomonas* é um gênero que apresenta diversas espécies fitopatogênicas, responsáveis por doenças como murcha, necrose e crestamento (Bergamin Filho et al., 1995), entre outras. Alguns rizóbios são capazes de produzir grandes quantidades de EPS (Duta et al., 2006; Kumari et al., 2009). A produção de EPS por isolados de rizóbios depende das condições de cultivo das culturas bacterianas (Duta et al., 2006). Dessa forma, pesquisas sobre a produção de EPS em condições rotineiras de laboratório podem representar uma alternativa para a obtenção de EPS com baixo custo de produção. Nesse contexto, a obtenção de EPS de rizóbios, sob condições de cultivo de rotina, pode representar uma atividade alternativa para empresas produtoras de inoculantes, principalmente na entressafra da soja, período em que a produção de inoculantes é muito baixa no Brasil (Fernandes Júnior et al., 2010).

A caracterização dos EPS microbianos é importante na determinação da aplicabilidade desses biopolímeros. Entre as metodologias adotadas na caracterização dos EPS, a avaliação reológica destaca-se por fornecer informações a respeito da estrutura molecular e de possíveis aplicações biotecnológicas (Kaci et al., 2005). Estudos sobre avaliação de EPS de isolados de rizóbio têm demonstrado que esses biopolímeros geralmente apresentam comportamento não newtoniano e pseudoplástico (Kaci et al., 2005; Aranda-Selverio et al., 2010). Contudo, apesar do comportamento pseudoplástico, a viscosidade de soluções de EPS de diferentes estirpes de rizóbios pode variar em uma mesma taxa de cisalhamento (Aranda-Selverio et al., 2010), o que sugere diferentes aplicações biotecnológicas a esses biopolímeros.

Estudos que avaliam as características de EPS produzidos por rizóbios de origem tropical podem auxiliar a entender o papel dessas moléculas na interação com as plantas hospedeiras (Kaci et al., 2005; Barreto, 2008), e indicar possíveis aplicações biotecnológicas

(Kaci et al., 2005; Barreto, 2008; Aranda-Selverio et al., 2010)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção e o comportamento reológico de exopolissacarídeos (EPS) produzidos por rizóbios isolados de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], e a similaridade desses isolados, pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado.

Material e Métodos

Três rizóbios isolados em nódulos de guandu foram cultivados em meio de cultura YM (Fred & Waksman, 1928), sob agitação constante de 150 rpm, a 28°C, em um agitador orbital. Para a inoculação no meio de cultura líquido, as bactérias foram cultivadas previamente em placas de Petri contendo meio YMA (Fred & Waksman, 1928), por tempo de crescimento adequado a cada isolado. Os isolados de rizóbio foram obtidos em estudos prévios (Fernandes Júnior, 2009). As características culturais dos isolados bacterianos utilizados estão descritas na Tabela 1.

O caldo de cultivo foi centrifugado a 8.000 g para separação das células rizobianas da solução contendo o EPS. O precipitado foi separado, seco em estufa e pesado. Três volumes de etanol 95° GL gelado foram adicionados ao sobrenadante que foi centrifugado novamente. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e os EPS precipitados foram lavados várias vezes com etanol gelado (adaptado de Castellane & Lemos, 2007). Os EPS foram secos a vácuo, pesados e armazenados em temperatura ambiente. A recuperação dos EPS foi realizada aos três dias, para os isolados 53.5 e 8.1c, enquanto que, para o isolado 30.6a2, a recuperação foi realizada aos seis dias de cultivo, conforme o tempo necessário para o crescimento de cada isolado.

O EPS seco foi ressuspenso em água destilada estéril, à temperatura de 50°C sob agitação constante de 1.400 rpm, com a utilização de um Thermomixer Compact-Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Tabela 1. Características culturais dos rizóbios isolados de nódulos de guandu utilizados neste estudo.

Isolado	Tempo de crescimento	Alteração de pH	Produção de muco	Diâmetro da colônia
8.1c	3 dias	Ácida	Elevada	5 mm
53.5	3 dias	Ácida	Elevada	5 mm
30.6a2	6 dias	Alcalina	Mediana	3 mm

As soluções aquosas foram preparadas nas concentrações de 5 e 10% (p/v). Os ensaios de reologia foram realizados em um reômetro Haake, Rheostress 1 (Thermo-Haake, Karlsruhe, Alemanha). A análise de tensão em rampa foi realizada por meio de um acessório de placa paralela, modelo PP35Ti, quando a viscosidade aparente e a taxa de cisalhamento foram determinadas em temperatura ambiente de 25°C, controlada por banho termostatizado, modelo HAAKE, utilizando-se o programa Rheowin3.2 (Thermo-Haake, Karlsruhe, Alemanha). Todas as análises foram realizadas em triplicata e em conformidade com metodologias previamente estabelecidas (Fernandes Júnior, 2009). A análise de variância foi realizada com a utilização do software Sisvar, da Universidade Federal de Lavras. O teste de comparação de médias utilizado foi o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A similaridade dos isolados rizobianos e das estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foi avaliada pela técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA). Foram utilizadas as estirpes de rizóbio BR 10016 (*Rhizobium tropici* II), BR 113 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR 114 (*Bradyrhizobium japonicum*) e BR 10026 (*Rhizobium etli*). Essas estirpes foram obtidas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi dimensionada para volume final de 35 µL contendo tampão de reação 1X, MgCl₂ 1,5 mmol L⁻¹, *Taq* DNA polimerase 1,75U, Invitrogen cat. N° 11615-010 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) BSA 0,3 µg µL⁻¹, dNTP 250 µmol L⁻¹ e 0,2 µmol L⁻¹ de cada iniciador. Os iniciadores utilizados foram 27F (5'AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG3') e 1492R (5'TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT3') (Weisburg et al., 1991). A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 93°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2 min, e extensão final a 72°C por 10 min (Leite et al., 2009).

A análise de restrição foi realizada com a utilização das endonucleases de restrição *Dde* I, *Msp* I e *Hinf* I, além de 5µL de DNA amplificado de acordo com as orientações do fabricante. O DNA clivado foi analisado em gel horizontal a 3% de agarose, em tampão TAE 1X, por 3 horas, a uma voltagem constante de 75 V, em que se utilizou, nas laterais do gel, o marcador de peso molecular ΦX174, Invitrogen cat. N° 10488-037, (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os fragmentos

clivados do DNA foram analisados no programa Gel Compar 2.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), com base na matriz de similaridade gerada por meio do coeficiente de Jaccard. O agrupamento foi feito utilizando-se o algoritmo "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean" (UPGMA) para a construção do dendrograma de similaridade.

Resultados e Discussão

A produção de EPS pelos isolados 8.1c e 53.5 foi maior do que a do isolado 30.6a2 (Tabela 2). No entanto, a produção de biomassa celular no meio de cultura do isolado 30.6a2 foi maior, e não diferiu do produzido pelo isolado 53.5. Ao avaliar a eficiência relativa na produção de EPS, dada pela relação entre o total de EPS e a biomassa celular, o isolado 8.1c apresentou o melhor resultado. Em bactérias, é comum encontrar produção variável de EPS, mesmo em bactérias do mesmo gênero cultivadas nas mesmas condições, conforme demonstrado em *Rhizobium* (Tavernier et al., 1997; Kumari et al., 2009) e *Xanthomonas* (Antunes et al., 2003; Rottava et al., 2009), o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo.

A avaliação do comportamento reológico das soluções de EPS produzidas pelos três isolados rizobianos revelou que todas as soluções estudadas apresentaram comportamento não newtoniano, pseudoplástico (Figura 1). Os fluidos não newtonianos apresentam a característica de variar a viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Os fluidos pseudoplásticos são fluidos não newtonianos, em que o aumento da taxa de cisalhamento resulta em decréscimo da viscosidade (Bretas & Scuracchio, 2003). O comportamento pseudoplástico foi observado

Tabela 2. Produção de exopolissacarídeos (EPS) e de biomassa celular no meio de cultura por rizóbios isolados de nódulos de *Cajanus cajan*, e eficiência relativa de produção de EPS⁽¹⁾.

Isolado	Produção (mg L ⁻¹)		Eficiência relativa (EPS/Biomassa)
	EPS	Biomassa	
8.1c	145a	46b	3,15a
53.5	132a	136ab	0,97b
30.6a2	98b	203a	0,48b
CV (%)	12,5	9,8	7,2
EPM	10,2	8,6	0,7

⁽¹⁾Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. EPM, erro-padrão da média.

em EPS de *Rhizobium* spp., em estudos com avaliação de diversos microrganismos do solo (Kaci et al., 2005; Barreto, 2008; Aranda-Selverio et al., 2010), em bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (Rottava et al., 2009) e também bactérias rizosféricas do gênero *Pseudomonas* (Hilliou et al., 2009).

Na avaliação da viscosidade aparente em uma mesma taxa de cisalhamento, as soluções de EPS apresentaram comportamento reológico pseudoplástico, porém distinto entre os três isolados. Na concentração de 10% (p/v) do isolado 8.1c, a solução de EPS apresentou viscosidade aparente de 0,16 Pa, com uma taxa de cisalhamento inicial de 1 s^{-1} (Figura 2). Entretanto, as soluções preparadas com os EPS dos isolados 53.5 e 30.6a2, na mesma concentração e taxa de cisalhamento inicial, apresentaram, respectivamente, viscosidades aparentes de 1,35 e 3,20 Pa. Na taxa de cisalhamento de 40 s^{-1} , as soluções de EPS dos isolados 8.1c, 53.5 e 30.6a2 apresentaram viscosidades aparentes de 0,02, 0,15 e 0,25 Pa, respectivamente. Na taxa de cisalhamento inicial (1 s^{-1}), a viscosidade aparente dos EPS sintetizados pelos três isolados de rizóbio foi diferente. Contudo, na taxa de cisalhamento de

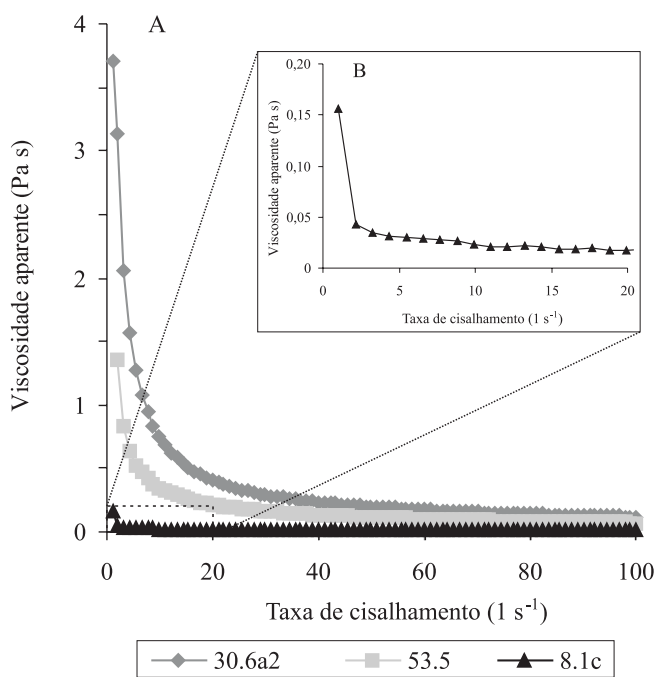


Figura 1. Reograma da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento, em soluções aquosas de exopolissacarídeos (10% p/v) produzidos por três isolados rizobianos, oriundos de nódulos de guandu (A). No detalhe (B), reograma da solução aquosa de EPS produzido pelo isolado 8.1c, até a taxa de cisalhamento de $20 \text{ (s}^{-1}\text{)}$.

40 s^{-1} as soluções de EPS dos isolados 30.6a2 e 53.5 apresentaram viscosidades aparentes semelhantes, mas diferentes da apresentada pelo isolado 8.1c. Isso indica que, nesta taxa de cisalhamento, as moléculas presentes na solução aquosa de EPS do isolado 30.6a2 apresentam arranjo tridimensional similar ao observado na solução do isolado 53.5, o que resulta na mesma resistência ao escoamento.

O comportamento reológico de soluções de EPS também foi avaliado para bactérias do gênero *Sphingomonas* (Berwanger et al., 2007), e diferentes viscosidades em uma mesma taxa de cisalhamento também puderam ser observadas. O comportamento reológico de soluções de EPS de *Rhizobium* spp. apresentou diferenças na viscosidade aparente, em uma mesma taxa de cisalhamento (Barreto, 2008; Aranda-Selverio et al., 2010). Resultados semelhantes também foram observados na reologia de goma xantana (Antunes et al., 2003; Rottava et al., 2009). Rottava et al. (2009) observaram, ainda, diferença entre a viscosidade aparente das soluções de goma xantana produzida por diferentes isolados de *Xanthomonas*, em uma mesma taxa de cisalhamento, resultados similares aos obtidos no presente estudo.

Observou-se, também, influência da concentração de EPS sobre a viscosidade aparente das soluções aquosas. A Figura 3 exemplifica esse resultado com reogramas da solução de EPS do isolado 30.6a2. A influência da concentração na viscosidade aparente de soluções de EPS de bactérias dos gêneros *Rhizobium* (Aranda-Selverio

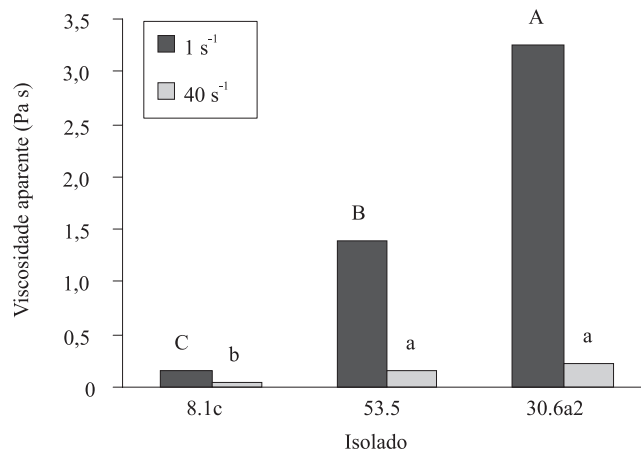


Figura 2. Viscosidade aparente de soluções aquosas de exopolissacarídeos (10% p/v) produzidos por isolados rizobianos, nas taxas de cisalhamento de 1 e $40 \text{ (s}^{-1}\text{)}$. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

et al., 2010) e *Xanthomonas* (Antunes et al., 2003), e do fungo basidiomiceto *Aureobasidium pullulans* (Furuse et al., 2002), é característica do comportamento de polissacarídeos e pode ser observada em soluções aquosas diluídas de amido e celulose (Mano & Mendes, 2004).

Foi possível constatar que as diferenças encontradas no comportamento reológico nas soluções de EPS estiveram relacionadas com o agrupamento dos isolados de acordo com sua similaridade genética, avaliada pela técnica ARDRA. O polimorfismo gerado pela técnica de ARDRA demonstrou 90% de similaridade para os isolados 53.5 e 30.6a2, que também apresentaram viscosidades aparentes iguais na taxa de cisalhamento

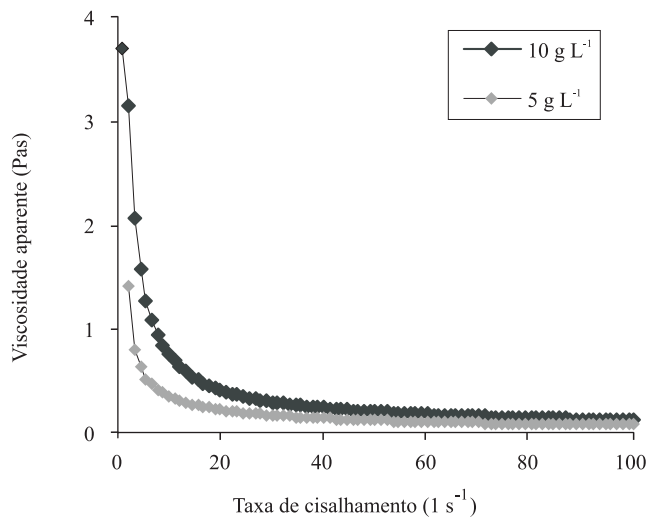


Figura 3. Reograma da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento, em soluções aquosas de exopolissacarídeos produzidos pelo isolado 30.6a2, nas concentrações 10 e 5% p/v.

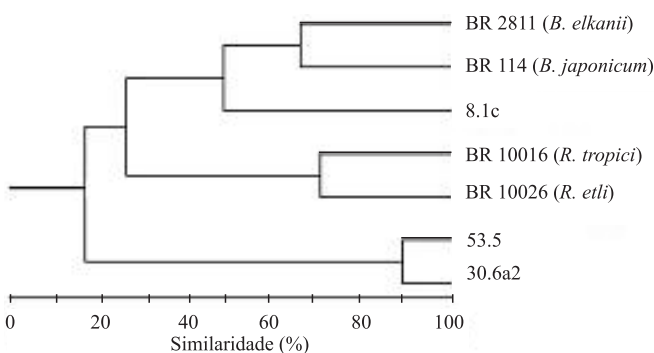


Figura 4. Dendrograma de similaridade construído a partir do polimorfismo gerado pela clivagem com as endonucleases *Dde* I, *Hinf* I e *Msp* I do 16S rDNA, em três isolados de rizóbio de guandu e estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

de 40 s⁻¹ (Figura 4). Este grupo, formado exclusivamente pelos isolados 30.6a2 e 53.5, apresentou 20% de similaridade com o isolado 8.1c e com as estirpes de rizóbio. Leite et al. (2009) constataram, com uso da técnica ARDRA, que bactérias de crescimento rápido e de crescimento lento estavam presentes em um mesmo agrupamento de rizóbios, o que sugere ampla diversidade desse grupo de bactérias.

Rottava et al. (2009) observaram diferenças no comportamento reológico de goma xantana sintetizada por dez isolados de *Xanthomonas* spp. com elevado grau de polimorfismo avaliado pela técnica de RAPD. Porém, a correlação encontrada entre comportamento reológico e similaridade dos isolados não foi observada. Poucos estudos relatam a relação entre a variabilidade de isolados rizobianos e as características do EPS produzido por essas bactérias.

Mandal et al. (2007) observaram que as características do EPS de *Rhizobium* spp. isolado de *Vigna mungo* eram muito distintas das encontradas em EPS de rizóbios de origem temperada. A avaliação da produção de biopolímeros por isolados de rizóbio de guandu foi demonstrada recentemente em condições rotineiras de cultivo da bactéria, sem utilização de fermentadores ou biorreatores (Fernandes Júnior et al., 2010). Esses autores demonstraram também que o isolado 8.1c apresenta alta capacidade de produção de EPS, com a substituição do manitol por amido ou xilose como fonte de carbono do meio YM. Dessa forma, a otimização das condições de cultivo das bactérias avaliadas neste estudo é desejável, com vistas ao incremento da produção de polímeros e redução no custo de produção.

Conclusão

1. Os isolados de rizóbio de guandu apresentam diferenças na produção e na eficiência relativa da produção de exopolissacarídeos.
2. Os isolados de rizóbio de guandu que sintetizam exopolissacarídeos com maior viscosidade aparente, em uma mesma taxa de cisalhamento, apresentam maior similaridade genética.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Embrapa Agrobiologia e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo

da Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro, pelo suporte financeiro e infraestrutura.

Referências

- ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.317-322, 2003.
- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS-SÁS, L.F.; SANTOS JÚNIOR, O. dos; VASCONCELOS, A.F.D.; SILVA, M. de L.C. da; LEMOS, E.G.M.; CAPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M.S. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v.33, p.895-899, 2010.
- BARRETO, M.C.S. **Inovação tecnológica baseada na produção de biopolímeros com viabilidade para inoculante rizobiano**. 2008. 97p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, 919 p.
- BERWANGER, A.L. da S.; SCAMPARINI, A.R.P.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.177-183, 2007.
- BILLA, N.; YUEN, K.-H.; KHADER, M.A.A.; OMAR, A. Gamma-scintigraphic study of the gastrointestinal transit and in vivo dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v.201, p.109-120, 2000.
- BRETAS, R.E.S.; SCURACCHIO, C.H. Reometria de placas paralelas e cone placa. In: CANEVAROLLO JÚNIOR, S.V. (Coord.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003. p.385-404.
- CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G. de M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1503-1506, 2007.
- DUTA, F.P.; FRANCA, F.P. de; LOPES, L.M.D. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.391-399, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I. **Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]**. 2009. 167p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; OLIVEIRA, P.J. de; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Poly- β -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] root nodules. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-9055-4>
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S. **Yeast extract-mannitol agar for laboratory: manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145p.
- FUJISHIGE, N.A.; LUM, M.R.; DE HOFF, P.L.; WHITELEGGE J.P.; FAULL K.F.; HIRSCH A.M. *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.67, p.504-515, 2008.
- FURUSE, H.; AMARI, T.; MIYAWAKI, O.; ASAKURA, T.; TODA, K. Characteristic behavior of viscosity and viscoelasticity of *Aureobasidium pullulans* culture fluid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.93, p.411-415, 2002.
- HILLIOU, L.; FREITAS, F.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M.; LESPINEUX, D.; GRANDFILS, C.; ALVES, V.D. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.526-532, 2009.
- KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from and soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, v.156, p.522-531, 2005.
- KUMARI, B.S.; RAM, M.R.; MALLAIAH, K.V. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, p.10-14, 2009.
- LEITE, J.; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1215-1226, 2009.
- MANDAL, S.M.; RAY, B.; DEY, S.; PATI, B.R. Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1271-1275, 2007.
- MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2004. 191p.
- RINAUDI, L.V.; GIORDANO, W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v.304, p.1-11, 2010.
- RINAUDI, L.V.; SORROCHE, F.; ZORREGUIETA, Á.; GIORDANO, W. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS Microbiology Letters**, v.302, p.15-21, 2010.
- RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v.57, p.397-430, 2008.
- ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.65-71, 2009.

- RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C. da; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.35-50, 2004.
- SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from gram negative bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.663-674, 2001.
- TAVERNIER, P.; PORTAIS, J.; SAUCEDO, J.E.N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J.N. Exopolysaccharide and poly- β -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.21-26, 1997.
- WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. **Archives of Microbiology**, v.189, p.525-530, 2008.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

Recebido em 3 de maio de 2010 e aprovado em 23 de novembro de 2010