

RODRIGO VASSOLER SERRATO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ESTRUTURAL DE EXOPOLISSACARÍDEOS E
LIPOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-Orientadores: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki
Prof. Dr. Leonardo M. Cruz

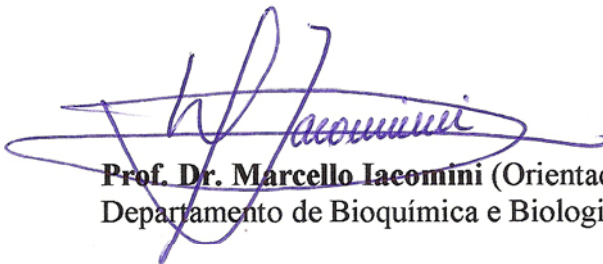
**– CURITIBA –
2008**

TERMO DE APROVAÇÃO

RODRIGO VASSOLER SERRATO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DE EXOPOLISSACARÍDEOS E LIPOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora:




Prof. Dr. Marcello Iacomini (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR




Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Eliana Barreto Bergter
Departamento de Microbiologia Geral – UFRJ



Prof. Dr. Helio Kiyoshi Takahashi
Departamento de Bioquímica – UNIFESP



Prof. Dr. Carlos Kimmelmeier
Departamento de Bioquímica – UEM

Curitiba, 12 de Maio de 2008

“Não importa se é pesquisa básica ou aplicada.
O importante é que seja pesquisa de qualidade!”

Prof^a. Dra. Glaci Zancan

A Universidade não é a minha segunda casa, é
a minha primeira casa. Passo mais tempo aqui
do que com minha família!”

Prof^a. Dra. Maria Benigna (Binha)

Agradeço profundamente aos alicerces da minha formação, meus pais, pelo apoio, compreensão e pelo esforço despendido para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela confiança e conselhos durante o desenvolvimento desta nova linha de pesquisa e pelo privilégio de trabalhar ao seu lado nos últimos anos.

Aos meus amigos e co-orientadores, Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki e Prof. Dr. Leonardo M. Cruz, por toda a ajuda, conselhos, piadas e momentos de descontração.

Ao querido Prof. Dr. Philip A. J. Gorin, pelas inúmeras vezes em que precisei e sempre fui atendido, e por ser um pesquisador exemplar e uma pessoa de caráter inabalável. Mais do que um professor, um grande amigo!!!

Agradeço especialmente a Prof. Dra. Rose Adele Monteiro pelo fornecimento das estirpes mutantes utilizadas neste trabalho, mas, principalmente, por ser uma grande amiga pra todas as horas.

Ao Prof. Dr. Russell W. Carlson, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, e pela ajuda dos meus novos amigos do CCRC, Artur Muszyński, Biswa Choudhury e Christine Leoff. Thank you very much guys!!!

Ao Prof. Dr. Fábio O. Pedrosa e Prof. Dr. Emanuel M. Souza pela oportunidade de iniciar uma colaboração fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

À Roseli Prado pela ajuda incondicional no preparo de litros e litros de meio de cultura.

Ao Prof. Dr. Hugo Verli da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo auxílio nas análises conformacionais *in silico*.

À Prof. Dra. Fany Reicher, pelo valioso período em que dividimos as aulas durante minha passagem como professor substituto.

Aos meus irmãos de laboratório Lauro, Thales e Faria pelo exemplo de companheirismo e pela amizade cultivada ao longo dos anos.

Às três grandes amigas Fernanda, Juliana e Rosiane, pelos momentos de alegria e por terem me aturado por muitas, muitas vezes!

Ao amiiiiiiigo Adriano, pelas inúmeras vezes em que precisei de ajuda e fui recebido de braços abertos, pelas incontáveis horas de riso e alegria, e pela amizade inestimável.

À minha amiga Larissa pelas oportunidades por ela me oferecidas e pela recente amizade que foi criada.

Aos grandes amigos, companheiros e irmãos Renato e Reis... sem comentários!!! Agora vocês vão ter que me aturar por um bom tempo... Valeu mesmo meus camaradas!!!

Aos colegas do departamento Ricardo, Marcelo, Graciele, Elaine, Lucimara, Carol, Ana Helena, Luciana, Alexandre, Alan, Eduardo, Luciano, Dani, Stefan, Lillian, e todos os demais que de alguma forma influenciaram na minha caminhada.

Um agradecimento especial cabe à minha querida Lillian, que sempre me apoiou nas minhas decisões e esteve ao meu lado em todos os momentos de alegria e de tristeza. Sem você tudo teria sido mais difícil... Te amo!!!

Aos meus grandes amigos de longa data, Coelho, Shinji, Adriano e Nino, por todos os momentos de alegria, descontração e pela amizade sincera e incondicional.

Ao Dr. Ricardo Augusto Valle Pinto Coelho pelas oportunidades oferecidas e pelos ensinamentos que ficarão para toda a vida.

À Prof. Dra. Glaci Zancan e à Prof. Dra. Maria Benigna (Binha), ícones que viveram em defesa da pesquisa e educação no Brasil. Que o legado de ambas nos sirva de exemplo para continuarmos em defesa da universidade pública!!!

À coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica e à todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
ABRAVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)	2
1.1.1 Diazotrofos Associativos	4
1.1.1.1 Gênero <i>Burkholderia</i>	5
1.1.1.2 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	7
1.1.2 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	7
1.2 EXOPOLISSACARÍDEOS	8
1.2.1 Exopolissacarídeos Bacterianos	9
1.2.2 Envolvimento dos EPS na Interação Planta-Bactéria	12
1.3 PAREDE CELULAR BACTERIANA	19
1.3.1 Lipopolissacarídeos	22
1.3.2 Estrutura de LPS em Diazotrofos	26
1.3.3 Envolvimento dos LPS na Interação Planta-Bactéria	31
2. OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVOS GERAIS	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	36
3.1.1 Construção das Estirpes Mutantes	37
3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS BACTERIANAS	37
3.2.1 Meios de Cultura	37
3.2.2 Condições de Crescimento	38

3.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE EPS E LPS	38
3.3.1 Crescimento em Meio Sólido Contendo Calcofluor	38
3.3.2 Crescimento em Meio Líquido Contendo Flavonóides	39
3.3.3 Microscopia de Fluorescência	39
3.4 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DOS EPS E LPS	40
3.4.1 Obtenção dos Exopolissacarídeos	40
3.4.2 Extração dos Lipopolissacarídeos	40
3.5 MÉTODOS QUÍMICOS	41
3.5.1 Hidrólise Parcial dos Exopolissacarídeos	41
3.5.2 Hidrólise Branda dos Lipopolissacarídeos	41
3.5.3 De-O-Acilação da Porção Lipídeo-A	42
3.5.4 De-Fosforilação da Porção Lipídeo-A	42
3.5.5 Métodos de Derivatização	43
3.5.5.1 Derivados Alditol Acetato (AA)	43
3.5.5.2 Derivados per-O-Trimetilsililados (per-O-TMS)	43
3.5.5.3 Derivados Metil Ésteres de Ácidos Graxos (FAME)	43
3.5.5.4 Derivados Alditol Acetato Parcialmente Metilados (PMAA)	44
3.6 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS LPS POR DOC-PAGE	44
3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	45
3.7.1 Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	45
3.7.2 Cromatografia de Gel Filtração	46
3.7.2.1 Fracionamento de Oligossacarídeos em BioGel-P2	46
3.7.2.2 Fracionamento de LPS em Sephacryl S-200 HR	46
3.7.2.3 Fracionamento de Oligossacarídeos em Sephacryl S-100	46
3.7.3 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS)	47
3.8 DINÂMICA MOLECULAR DO EPS PRODUZIDO POR <i>B. TROPICA</i> PPE8	48
3.8.1 Cálculo do Contorno de Energia dos Diedros Isolados da Estrutura	48
3.8.2 Dinâmica do Pentassacarídeo Repetitivo da Estrutura	48
3.9 “MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME OF FLIGHT” (MALDI-TOF)	49

3.10 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS E LPS	52
4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS DE <i>B. TROPICA</i> PPE8	58
4.3 MODELAGEM MOLECULAR DO EPS PRODUZIDO POR <i>B. TROPICA</i> PPE8	65
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS DE <i>H. RUBRISUBALBICANS</i> AB7	73
4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPS DE <i>H. RUBRISUBALBICANS</i> BA10 E BA16	83
4.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS LPS DE <i>HERBASPIRILLUM</i> SPP.	91
4.7 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LPS DE <i>H. SEROPEDICAE</i> SMR1 E DOS MUTANTES RAMEBB E RAMEBC	94
4.7.1 Caracterização Estrutural da Porção Lipídeo-A Isolada dos LPS de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e dos Mutantes RAMEBB e RAMEBC	100
4.7.2 Caracterização Estrutural dos Oligossacarídeos Isolados dos LPS de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e dos Mutantes RAMEBB e RAMEBC	110
4.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
5. CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXOS	140

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Estrutura secundária do alginato. M) β -D-ácido manurônico; G) α -L-ácido gulurônico	10
FIGURA 02 - Estrutura da succinoglucana (EPS I) e da galactoglucana (EPS II) produzidos por <i>Rhizobium meliloti</i>	14
FIGURA 03 - Estrutura do EPS Cepaciana sintetizado por <i>Burkholderia cepacia</i>	16
FIGURA 04 - Estrutura geral dos peptidoglicanos de <i>Escherichia coli</i> . AMA: ácido acetilmurâmico (MurNAc), AGA: acetilglicosamina (GlcNAc)	20
FIGURA 05 - Representação esquemática da estrutura de parede celular das bactérias Gram-positivas	21
FIGURA 06 - Representação esquemática da estrutura de parede celular das bactérias Gram-negativas	22
FIGURA 07 - Estrutura do lipídeo-A e do núcleo interno do LPS de <i>Escherichia coli</i> , estirpe K-12	24
FIGURA 08 - Estrutura do LPS completo (LPS I) de <i>Rhizobium etli</i> CE3	27
FIGURA 09 - Estrutura das unidades de YerA (3,6-dideoxi-4-C-(4'-hidroxietil)-D-xylo-hexose) e de BacNAc (4-acetamido-2-amino-2,4,6-trideoxi-D-glucose)	28
FIGURA 10 - Crescimento de diazotrofos dos gêneros <i>Herbaspirillum</i> e <i>Burkholderia</i> em placas contendo calcofluor (200 μ g/mL)	53
FIGURA 11 - Efeito da concentração de flavonóides na produção de EPS por de <i>H. seropedicae</i> SmR1	54
FIGURA 12 - Microscopia de fluorescência de <i>H. seropedicae</i> SmR1 contendo uma proteína vermelha fluorescente (DsRed) após crescimento na presença de calcofluor (100 μ g/mL)	57
FIGURA 13 - Perfil cromatográfico em BioGel-P2 dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8..	59
FIGURA 14 - Espectro de massa MALDI-TOF modo positivo dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8	61
FIGURA 15 - Espectro parcial de TOCSY mostrando correlações $^1\text{H}/^1\text{H}$ da região anomérica do EPS ácido produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8....	64
FIGURA 16 - Estrutura do pentassacarídeo repetitivo que forma o EPS ácido produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8	65
FIGURA 17 - Gráficos de contorno de energia ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) dos ângulos de torção das ligações glicosídicas de cada dissacarídeo que forma a estrutura do EPS produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8	67

FIGURA 18 -	Avaliação da população dos ângulos de torção Φ (preto) e Ψ (vermelho) das ligações glicosídicas em cada dissacarídeo que forma o EPS em relação ao tempo de simulação em solução aquosa	69
FIGURA 19 -	Comparação da população ângulos Φ e Ψ das ligações glicosídicas durante as simulações de dinâmica molecular dos dissacarídeos isolados (vermelho) e das quatro diferentes conformações simuladas do EPS na forma de pentassacarídeo (verde, marrom, laranja e roxo)	70
FIGURA 20 -	Estruturas geradas a partir da dinâmica dos diferentes conformeros possíveis para o pentassacarídeo repetitivo do EPS produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8	71
FIGURA 21 -	Representação esquemática do EPS de <i>B. tropica</i> Ppe8 contendo três unidades pentassacarídicas repetitivas	72
FIGURA 22 -	^{13}C -RMN do EPS solúvel produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7. O inserto mostra o espectro parcial de DEPT-135	74
FIGURA 23 -	^1H -RMN do EPS solúvel produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7....	74
FIGURA 24 -	Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC do EPS solúvel produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7.....	75
FIGURA 25 -	Espectro de MALDI-TOF em modo positivo dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7	76
FIGURA 26 -	Perfil cromatográfico em BioGel-P2 dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7	77
FIGURA 27 -	^1H -RMN das frações oligossacarídicas isoladas em coluna BioGel-P2 após hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7. A região anomérica da fração IV é mostrada em detalhe com os valores de $J_{\text{H}/\text{H}}$ (em Hz)	80
FIGURA 28 -	Espectros de correlação homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY das frações oligossacarídicas II e IV obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7	81
FIGURA 29 -	^{13}C -RMN da fração IV obtida após eluição em BioGel-P2 do hidrolisado parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7.	82
FIGURA 30 -	Espectro de MALDI-TOF em modo positivo dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial dos EPS produzidos por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA10 e BA16	84
FIGURA 31 -	Perfil de eluição em BioGel-P2 dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial dos EPS produzidos por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA16	85

FIGURA 32 - ^1H -RMN das frações oligossacarídicas isoladas em coluna BioGel-P2 após hidrólise parcial dos EPS produzidos por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA16	87
FIGURA 33 - ^{13}C -RMN das frações oligossacarídicas obtidas após eluição em BioGel-P2 do hidrolisado parcial dos EPS produzidos por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA16	88
FIGURA 34 - RMN bidimensionais de correlação homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ da fração IV obtida após eluição em BioGel-P2 do hidrolisado parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA16	89
FIGURA 35 - DOC-PAGE 18% das frações aquosas (A) e fenólicas (B) obtidas após extração ϕ/w das diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> (SmR1, Z76, Z78, ZA95 e M2) e <i>H. rubrisubalbicans</i> (M1 e M4).....	92
FIGURA 36 - DOC-PAGE 18% das frações aquosas (w) e fenólicas (Φ) obtidas após extração ϕ/w das células de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e dos mutantes RAMEBB e RAMEBC. A) coloração com alcian blue; B) coloração com alcian blue seguida de coloração com AgNO_3	95
FIGURA 37 - Cromatogramas dos derivados per-O-TMS obtidos das frações aquosas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC, mostrando diferenças na composição monossacarídica e de ácidos graxos em cada estirpe	97
FIGURA 38 - Cromatogramas dos derivados per-O-TMS obtidos das frações fenólicas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC, mostrando diferenças na composição monossacarídica e de ácidos graxos em cada estirpe	98
FIGURA 39 - Cromatografia de camada delgada da porção lipídeo-A das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de <i>H. seropedicae</i>	102
FIGURA 40 - Espectro de MALDI-TOF no modo negativo do lipídeo-A de <i>H. seropedicae</i> SmR1. O inserto mostra em detalhes a diferença de massa no grupamento de íons correspondente ao lipídeo-A hexa-acetilado	104
FIGURA 41 - Espectro de MALDI-TOF no modo negativo do lipídeo-A das estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> (RAMEBB e RAMEBC). O inserto mostra a diferença de massa molecular, indicando a variabilidade de estruturas de lipídeo-A presente para os mutantes.....	105
FIGURA 42 - Cromatograma dos derivados per-O-TMS mostrando a composição monossacarídica e de ácidos graxos das frações lipídeo-A de-O-acilado da estirpe SmR1 e de ambos os mutantes de <i>H. seropedicae</i>	106
FIGURA 43 - Espectro de MALDI-TOF em modo negativo do lipídeo-A de-O-acilado da estirpe SmR1 de <i>H. seropedicae</i>	107
FIGURA 44 - Estrutura de-O-acilada do lipídeo-A produzido por <i>H. seropedicae</i> SmR1	108

FIGURA 45 - Espectro de MALDI-TOF em modo negativo do lipídeo-A de-O- acilado da estirpe mutantes RAMEBB de <i>H. seropedicae</i>	109
FIGURA 46 - Espectro de MALDI-TOF em modo negativo do lipídeo-A de-O- acilado e desfosforilado de <i>H. seropedicae</i>	110
FIGURA 47 - Cromatogramas dos derivados per-O-TMS obtido da porção oligossacarídica do LPS de SmR1 e dos mutantes de <i>H.</i> <i>seropedicae</i>	111
FIGURA 48 - Perfil cromatográfico em coluna Sephacryl S-100 dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise branda dos LPS de SmR1 e do mutante RAMEBB de <i>H. seropedicae</i>	112
FIGURA 49 - Espectro de MALDI-TOF em modo positivo da fração II dos oligossacarídeos de SmR1 isolados em coluna Sephacryl S-100...	114
FIGURA 50 - Espectro de MALDI-TOF em modo positivo da fração IV dos oligossacarídeos de SmR1 isolados em coluna Sephacryl S-100...	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Exopolissacarídeos produzidos por alguns microrganismos	11
TABELA 02 - Composição química de exopolissacarídeos produzidos por bactérias envolvidas em interações com plantas	18
TABELA 03 - Estrutura da porção O-antígeno descrita para diversas espécies de bactérias Gram-negativas	29
TABELA 04 - Lista de estirpes de diazotrofos utilizados neste trabalho e características genóticas e fenóticas relevantes	36
TABELA 05 - Composição monossacarídica dos EPS produzidos por diazotrofos dos gêneros <i>Herbaspirillum</i> e <i>Burkholderia</i>	56
TABELA 06 - Composição monossacarídica e análise de ligação do EPS ácido e carboxireduzido (EPS-CR) de <i>Burkholderia tropica</i> Ppe8.	59
TABELA 07 - Composição monossacarídicas e análise de ligação glicosídica dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>B. tropica</i> Ppe8	60
TABELA 08 - Análise de ligação glicosídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7	73
TABELA 09 - Composição monossacarídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7	78
TABELA 10 - Análise de ligação glicosídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> AB7	79
TABELA 11 - Composição monossacarídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA16	85
TABELA 12 - Análise de ligação glicosídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por <i>H. rubrisubalbicans</i> BA16	86
TABELA 13 - Rendimento das frações aquosas e fenólicas após extração ϕ/w das diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	91
TABELA 14 - Derivados per-O-TMS das frações fenólicas obtidas após extração ϕ/w das células de diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	93
TABELA 15 - Peso seco das frações aquosa e fenólica obtidas após extração ϕ/w da estirpe selvagem e de ambos os mutantes de <i>H. seropedicae</i>	94

TABELA 16 - Composição monossacarídica e de ácidos graxos obtida através dos derivados per-O-TMS das frações aquosas e fenólicas extraídas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de <i>H. seropedicae</i>	99
TABELA 17 - Composição monossacarídica dos LPS extraídos de SmR1, RAMEBB e RAMEBC, obtida através de derivados alditol acetato..	100
TABELA 18 - Derivados per-O-TMS obtidos para a porção lipídeo-A dos LPS extraídos na fração fenólica das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de <i>H. seropedicae</i>	101
TABELA 19 - Derivados FAME obtidos para a porção lipídeo-A dos LPS extraídos na fração fenólica das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de <i>H. seropedicae</i>	102
TABELA 20 - Composição por derivados AA e per-O-TMS dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise branda dos LPS de SmR1 e dos mutantes de <i>H. seropedicae</i>	111
TABELA 21 - Derivados per-O-TMS dos oligossacarídeos obtidos após fracionamento em Sephacryl S-100 da porção O-antígeno dos LPS extraídos na fração fenólica das células de SmR1, RAMEBB e RAMEBC	113

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

% – Porcentagem

α – Alfa

β – Beta

δ – Delta (p.p.m.)

γ – Gama

λ – Comprimento de Onda

ϕ/w – Fenol/Água

4-N-Ara – 4-Amino-4-Desoxi-Arabinose

AA – Alditol Acetato

Ac – Acetil

AcOH – Ácido Acético

ADP – Adenosina Difosfato

AGA – N-Acetil Glucosamina

AMA – Ácido N-Acetil Murâmico

Ara – Arabinose

atm – Atmosfera

ATP – Adenosina Trifosfato

BacNAc – N-Acetil Bacilosamina

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

COSY – “*Correlation Spectroscopy*”

CPS – Polissacarídeo Capsular

D – Série Estereoquímica D

DEPT – “*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*”

Dha – Ácido 3-Deoxi-D-Lixo-Heptulosárico

DHB – Ácido 2,5-Dihidrobencóico

d.i. – Diâmetro Interno

DMF – Dimetil Formamida

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

D.O.₆₀₀ – Absorbância em 600 nm
DOC – Ácido Desoxicólico
e⁻ – Elétron
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPS – Exopolissacarídeo
EPS-CR – Exopolissacarídeo Carboxi-Reduzido
EtOH – Alcool Etílico
f – Furanosídico
FAME – Ácido Graxo Metil Éster
FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio
Fuc – Fucose
Gal – Galactose
GalANAc – Ácido N-Acetil Galactosaminurônico
GalNAc – N-Acetil Galactosamina
GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
Glc – Glucose
GlcA – Ácido Glucurônico
GlcN3N – 2,3-Diamino-2,3-Didesoxi-D-Glucose
GlcNAc – N-Acetil Glucosamina
GlcNato – Gluconato
GulA – Ácido Gulurônico
H⁺ – Próton
Hep – L-Glicero-D-Mano-Heptose
HMQC – “*Heteronuclear Multi Quantum Coherence Spectroscopy*”
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
Kdo – Ácido D-Glicero-D-Talo-3-Desoxi-Cetooctulosônico
Km^R – Resistência à Kanamicina
Ko – Ácido D-Glicero-D-Talo-Cetooctulosônico
L – Série Estereoquímica L
LCO – Lipoquitooligossacarídeo
LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF – “*Matrix Assisted Laser Dessorption Ionization – Time of Flight*”

Man – Manose

ManA – Ácido Manurônico

ManNAc – N-Acetil Manosamina

Me – Metil

MeOH – Álcool Metílico

MurNAc – Ácido N-Acetil Murâmico

MWCO – “*Molecular Weight Cut-Off*”

m/z – Relação Massa/Carga

Nif⁺ – Fenótipo Fixador de Nitrogênio

p – Piranosídico

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PBS – Solução Fosfato-Salina

pEtN – Fosfoetanolamina

P_i – Fosfato Inorgânico

PMAA – Alditol Acetato Parcialmente Metilado

Qui – Quinovose

QuiNAc – N-Acetil Quinovosamina

RAMEBB – Mutante *rmIB*.:EZ:TNTM de *Herbaspirillum seropedicae*

RAMEBC – Mutante *rmIC*.:EZ:TNTM de *Herbaspirillum seropedicae*

Rha – Rhamnose

Rib – Ribose

RNA – Ácido Ribonucléico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

r.p.m. – Rotações por Minuto

Sm^R – Resistente à Streptomicina

Tal – Talose

Tc^R – Resistente à Tetraciclina

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina

TFA – Ácido Trifluoracético

THAP – 2,4,6-Tetrahidroxiacetofenona

TMS – Trimetilsilil

TOCSY – “*Total Correlation Spectroscopy*”

TRIS – Aminometilidenotrimetanol

UDP – Uridina Difosfato

UV – Ultra Violeta

YerA – Yersiniose

RESUMO

O processo de fixação biológica de nitrogênio, realizado por diversos microrganismos, é um importante passo no ciclo biogeoquímico do nitrogênio. Este processo consiste na redução do nitrogênio atmosférico (N_2) em amônio (NH_4^+) que pode ser então disponibilizado para as plantas. Esse fenômeno é observado na simbiose ou associação de bactérias diazotróficas com algumas plantas de interesse econômico. Bactérias da família Rhizobiaceae são as mais bem estudadas em seus processos de fixação de nitrogênio e simbiose com leguminosas. A interação desses diazotrofos com seus hospedeiros é dependente de uma complexa comunicação molecular planta-bactéria, onde os exopolissacarídeos (EPS), lipopolissacarídeos (LPS) e lipoquitooligossacarídeos (LCO) produzidos pela bactéria têm papéis específicos em cada estágio do processo simbiótico até a formação dos nódulos funcionais que abrigam os bacterióides fixadores de nitrogênio na raiz da planta hospedeira. Por outro lado, os diazotrofos associativos endofíticos dos gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, entre outros, não formam nenhum tipo de estrutura especializada nas plantas e a fixação de nitrogênio ocorre dentro dos vasos condutores ou nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais. Nestes casos, os mecanismos de comunicação planta-bactéria ainda não estão definidos, mas especula-se que EPS e LPS bacterianos sejam fundamentais nesse processo. A composição química e estrutura dessas moléculas foram determinadas nesse trabalho, tendo como objeto de estudo diferentes estirpes dos diazotrofos *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A estrutura fina do EPS produzido pela estirpe Ppe8 de *B. tropica* foi descrita, bem como análises de sua conformação tridimensional *in silico*. Três estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram analisadas segundo a composição de seus EPS e a comparação entre suas estruturas é discutida. As diferentes porções do LPS de *H. seropedicae* SmR1 foram comparadas com a estrutura dos LPS de dois mutantes deficientes na biossíntese de rhamnose, uma vez que estes mutantes apresentam menor capacidade de associação com raízes de milho.

Palavras-chave: Exopolissacarídeo, Lipopolissacarídeo, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, Bactérias Diazotróficas, Fixação de Nitrogênio, Interação Planta-Bactéria.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation (BNF) process is carried out by several microorganisms and is an important step on the biogeochemical cycle of nitrogen. The BNF consists in the reduction of atmospheric nitrogen (N_2) into ammonium (NH_4^+), which may then be utilized by plants. This phenomenon is commonly observed in symbiosis or association between diazotrophic bacteria with various plants of economical importance. Bacteria of the Rhizobiaceae family are the most extensively studied in the process of nitrogen fixation and symbiosis with leguminous plants. The interaction between these diazotrophs with their hosts is determined by a complex plant-bacterium molecular interaction in which exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS) and lipochitooligosaccharides (LCO) play specific roles in each stage of the symbiotic process until the formation of the nodules that contain the nitrogen-fixing bacterioids on the roots of host plants. On the other hand, endophytic associative diazotrophs that belong to the genera *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, among others, do not form specialized structures in their host plants, and the nitrogen fixation occurs inside the plant vessels and in the intercellular spaces of the plant tissues. In these cases, the mechanism of plant-bacterium communication is not yet understood. Nevertheless, the role of bacterial EPS and LPS in this process is thought to play a fundamental role. The chemical composition and structural analysis of these molecules are now discussed, the subjects being the study of different strains of the diazotrophs *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. The fine structure of the EPS produced by strain Ppe8 of *B. tropica* is described, as well as its *in silico* spatial conformation. Three strains of *H. rubrisubalbicans* were analyzed according to the composition of each EPS and a comparison of their structures is discussed. Different portions of the LPS of *H. seropedicae* SmR1 were compared to those of two mutants deficient in the biosynthesis of rhamnose. Changes in the composition of the LPS impaired the capacity to associate with maize roots.

Keywords: Exopolysaccharide, Lipopolysaccharide, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, Diazotrophic Bacteria, Nitrogen Fixation, Plant-Bacterium Interaction.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A importância da química de carboidratos, em especial dos polissacarídeos, tem sido revigorada nos últimos anos pela necessidade de encontrar novos biopolímeros, modificar suas propriedades naturais e estender suas aplicações tradicionais. Há não muito tempo atrás, a importância dessas moléculas foi enfatizada devido às novas descobertas nas quais os carboidratos foram implicados na expressão da identidade biológica e nos processos de comunicação e reconhecimento celular, além das já amplamente conhecidas funções estruturais e de reserva. Tendo em vista que essas moléculas vem sendo cada vez mais utilizadas no estudo das diversas áreas da biologia, o conhecimento detalhado da estrutura primária de um polissacarídeo é fundamental para que tenha um completo entendimento de suas propriedades, funções e aplicações.

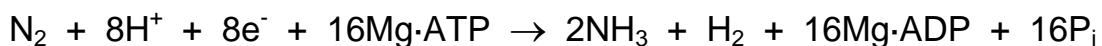
Haja vista a necessidade de obterem-se informações estruturais de diferentes polissacarídeos, com potencial atividade biológica ou que possuam funções específicas de comunicação celular, este trabalho abordou o estudo estrutural de duas classes de polissacarídeos extracelulares em algumas bactérias envolvidas no ciclo biogeoquímico do nitrogênio. A descoberta da estrutura primária dessas moléculas pode ser fundamental para o entendimento do íntimo processo de comunicação celular que há entre esses microrganismos e suas plantas hospedeiras. Os resultados aqui mostrados representam um pequeno passo para a atrativa diversidade de fontes bacterianas que geram diversidade na exploração biotecnológica de polissacarídeos, e principalmente, no entendimento do processo de interação planta-bactéria.

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

Com exceção da água, o nitrogênio é normalmente considerado o nutriente mais limitante para o desenvolvimento vegetal em seu ambiente natural (FRANCO & DÖBEREINER, 1994). Aproximadamente 80% da atmosfera terrestre é composta por nitrogênio molecular, ou dinitrogênio (N_2). Entretanto, mesmo mergulhados numa atmosfera rica em N_2 , a maioria dos organismos não

consegue captá-lo e utilizá-lo metabolicamente. É necessário que o nitrogênio esteja disponível numa forma mais reduzida, como amônio (NH_4^+), para que possa ser utilizado na biossíntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos nitrogenados.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o N_2 atmosférico inerte é transformado em NH_3 biologicamente útil para os organismos. Este processo é realizado na natureza apenas por um seleto grupo de procariotos que consegue converter enzimaticamente o dinitrogênio em amônia. Em condições ótimas, o complexo da nitrogenase presente nestes organismos é capaz de realizar esta conversão segundo a reação estequiometricamente balanceada mostrada abaixo (SIMPSON & BURRIS, 1984):



As bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas de diazotróficas, são a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que é constantemente reciclado, voltando à atmosfera pela ação de outros organismos decompositores de matéria orgânica no solo. Estima-se que sejam fixados por ano aproximadamente 180×10^6 toneladas de nitrogênio através do processo de fixação biológica realizada pelos diazotrofos no mundo, correspondente a pelo menos duas vezes mais do que aquela que compreende a fixação química e industrial (PEOPLES & CRASWELL, 1992). Estes números demonstram a importância ambiental e econômica desses microrganismos, uma vez que a FBN mantém o ecossistema em equilíbrio, evitando a contaminação das águas e do solo por resíduos nitrogenados indesejáveis que são liberados no processo industrial de fixação de nitrogênio.

Segundo dados da EMBRAPA¹ (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), a utilização de inoculantes somente na cultura da soja no Brasil, proporciona uma economia em fertilizantes nitrogenados de aproximadamente R\$ 8 bilhões/ano. A relevância econômica da FBN é ainda maior se forem consideradas outras culturas de leguminosas que também usam inoculantes, e seria maior ainda se fossem aprovados os inoculantes para as culturas de

¹ www.embrapa.br (dados de 2006).

gramíneas de importância comercial como milho, trigo, sorgo, entre outras. Além da enorme importância econômica, a FBN também contribui para a redução do consumo energético no país uma vez que a síntese de fertilizantes nitrogenados depende do uso de energia fóssil na razão de 78,1 MJ/Kg de nitrogênio fixado.

As bactérias fixadoras de nitrogênio são comumente classificadas em três grupos: (i) diazotrofos de vida livre, que fixam N_2 para seu próprio consumo, (ii) diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento de plantas sem a formação de estruturas diferenciadas, e os (iii) diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma íntima relação com a planta hospedeira formando estruturas especializadas denominadas de nódulos onde ocorre a conversão do N_2 em NH_3 (EVANS & BURRIS, 1992). Dentre estes organismos, muitos são heterotróficos, necessitando de um suplemento de carbono reduzido, o que depende indiretamente da energia da luz e em geral requer uma simbiose com um hospedeiro eucarioto, ou são de vida livre, competindo com outros microrganismos pela matéria orgânica disponível no ambiente. Outros diazotrofos são autotróficos, sendo capazes de reduzir o CO_2 na presença de luz (SPRENT & SPRENT, 1990). Entre os vários grupos de procariotos que fixam nitrogênio podem ser citadas algumas espécies estudadas, tais como *Rhodospirillum rubrum* (fotossintética), *Clostridium spp.* (anaeróbica), *Azotobacter spp.* e *Derxia spp.* (ambas aeróbicas), *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp.* e *Burkholderia spp.* (microaeróbicas), além de alguns representantes das cianobactérias e actinomicetos (*Frankia sp.*). (STACEY et al., 1992). Além destes destacam-se ainda os diazotrofos descritos dos gêneros *Beijerinckia* (DOBEREINER, 1961), *Klebsiella* (LADHA et al, 1983), *Pseudomonas* (BARRAQUIO et al., 1983), *Campylobacter* (McCLUNG & PATRIQUIN, 1980), *Enterobacter* (HAAHTELA et al., 1981) e *Paenibacillus* (ASH et al, 1993).

1.1.1 Diazotrofos Associativos

Algumas das bactérias que fazem parte dos diazotrofos associativos podem também ser denominadas de diazotrofos endofíticos por colonizarem o interior das plantas (DÖBEREINER et al., 1988). Em geral estas bactérias colonizam os

espaços intercelulares dos tecidos vegetais, sendo raramente intracelulares (QUADT-HALLMANN et al., 1997). Os diazotrofos endofíticos podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com sua ecologia, sendo eles endofíticos facultativos, podendo colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, ou endofíticos obrigatórios, colonizando exclusivamente o interior dos tecidos das plantas (BALDANI et al., 1997). Essa classificação, contudo, não é aceita por alguns pesquisadores, uma vez que bactérias ditas endofíticas obrigatórias podem ser cultivadas em laboratório sem que haja a presença de seus hospedeiros.

Dentre os diazotrofos classificados como endofíticos, encontram-se as bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998; BALDANI, 1996; GILLIS et al., 1995). Os dois primeiros gêneros pertencem à classe α das proteobactérias, enquanto que os demais fazem parte da classe β . As α -proteobactérias compreendem também outros diazotrofos simbióticos pertencentes à família Rhizobiaceae, bem como bactérias de vida livre como *Beijerinckia spp.*, fototrópicos com *Rhodopseudomonas spp.* e fitopatógenos como *Agrobacterium spp.* (YOUNG, 1992). As β -proteobactérias incluem diversos fitopatógenos e, contrariamente à subdivisão alfa, possui relativamente poucas espécies capazes de fixar N_2 . Alguns exemplos são espécies de diazotrofos dos gêneros *Derxia*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*, *Herbaspirillum* e *Burkholdeira*, além daqueles previamente citados (YOUNG, 1992).

1.1.1.1 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia*, pertencente à divisão das β -proteobactérias, é formado por bactérias gram-negativas e atualmente compreende 55 espécies ², sendo algumas descritas como fixadoras de nitrogênio. Este gênero também inclui vários patógenos humanos, com destaque para a espécie *B. cepacia* (basônimo: *Pseudomonas cepacia*), patógeno oportunista que infecta pacientes com fibrose cística (GOLDMAN & KLINGER, 1986). A criação do gênero deu-se a

² Dados obtidos de www.dsmz.de

partir da reclassificação de um grupo homólogo de *Pseudomonas* (STEAD, 1992) a partir da análise de ácidos graxos, lipídeos e características fenotípicas (YABUUCHI *et al.*, 1992), e posteriormente devido à sua alta homologia DNA:DNA e DNA:rDNA (TRAN VAN *et al.*, 1994). Este gênero foi originalmente descrito como o agente causal da podridão mole em cebola (BURKHOLDER, 1950), e tem sido encontrado em diferentes tipos de solos e raízes. Um grande número de representantes diazotrofos tem sido encontrado no interior de raízes de arroz sem causar danos às células da planta hospedeira (BALDANI *et al.*, 1997). Apesar das espécies de *Burkholderia* serem classicamente consideradas como associativas, recentemente foram descobertos isolados capazes de formar nódulos em leguminosas.

A espécie *B. vietnamiensis* foi a primeira do gênero a ser identificada como sendo capaz de fixar N₂ (GILLIS *et al.*, 1995). Foi descrito recentemente um grupo filogeneticamente homogêneo de espécie diazotróficas endofíticas de *Burkholderia* isoladas de cana-de-açúcar e milho. Neste grupo foram encontradas bactérias com 97,2% de similaridade DNA:DNA com a espécie *B. sacchari*, contudo uma hibridização com 99,9% de similaridade em reassociação DNA:DNA demonstrou tratar-se de uma nova espécie nomeada de *Burkholderia tropica*, estirpe Ppe8 (REIS *et al.*, 2004). Outra espécie conhecidamente fixadora de nitrogênio é a *Burkholderia [brasiliensis]*, estirpe M130, isolada de arroz, batata doce e mandioca (raiz, tubérculo e caule) e classificada a partir de análises morfológicas, fisiológicas e sequenciamento parcial do gene para o RNA ribossomal de 23S (BALDANI, 1996).

Várias outras espécies foram incluídas neste grupo, dentre elas encontram-se *B. pseudomallei* (BRETT *et al.*, 1997), *B. caribensis* (ACHOUAK *et al.*, 1999), *B. graminis* (BEHRENDT *et al.*, 1999), *B. thailandensis* (BRETT *et al.*, 1998), *B. phenazinium* (VAILLARD *et al.*, 1998), *B. pyrrocinia* (VAILLARD *et al.*, 1998) e *B. glathei* (VAILLARD *et al.*, 1998). A capacidade de fixar N₂ nestas espécies ainda não foi comprovada.

Devido à ampla distribuição do gênero *Burkholderia* nos solos, águas e rizosferas, este vem sendo considerado de grande importância, e seu potencial está sendo explorado como controlador biológico, uma vez que apresentam antagonismo a alguns fungos e patógenos de plantas existentes no solo

(McLOUGHLIN *et al.*, 1992) bem como a capacidade de degradar alguns pesticidas (JACOBSEN, 1997; MARS *et al.*, 1996).

1.1.1.2 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* faz parte da divisão das β -proteobactérias e foi descrito como sendo formado por bactérias fixadoras de nitrogênio, microaeróbicas, gram-negativas e com morfologia curvilínea (BALDANI *et al.*, 1986). A ecologia destas bactérias tem mostrado que estas podem ser isoladas do interior de raízes, hastes e folhas de diversas gramíneas (OLIVARES *et al.*, 1996; DÖBEREINER *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1992). A característica endofítica das espécies de *Herbaspirillum* é constatada como sendo não prejudicial para arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (PIMENTEL *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1992; OLIVARES *et al.*, 1996). Contudo, há algumas espécies desse gênero que são fitopatogênicas, como *H. rubrisubalbicans*, responsável pela doença da estria mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1992; CHRISTOPHER & EDGERON, 1932) e por causar outras doenças em sorgo (HALE & WILKIE, 1972), sendo afetadas, contudo, apenas algumas variedades susceptíveis a essas patologias. Uma característica do gênero é a capacidade de metabolizar ácidos orgânicos como malato, succinato, piruvato e citrato, sendo estes as fontes de carbono preferenciais para cultivo (BALDANI *et al.*, 1986). Outras fontes de carbono também utilizadas por algumas espécies são açúcares simples (glucose, galactose e L-arabinose), manitol, sorbitol e glicerol.

A espécie *H. seropedicae* foi originalmente isolada de raízes de milho, sorgo e arroz, e foi inicialmente identificada como uma nova espécie de *Azospirillum* por apresentar características bastante semelhantes de crescimento e fixação de nitrogênio, formando uma fina película de crescimento abaixo da superfície quando cultivadas em meio semi-sólido (BALDANI *et al.*, 1986). Entretanto, análises mais detalhadas de homologia DNA:DNA mostraram tratar-se de um novo gênero. Semelhanças genotípicas e fenotípicas também foram encontradas entre o fitopatógeno *Pseudomonas rubrisubalbicans* e o endófito *Herbaspirillum seropedicae* (GILLIS *et al.*, 1991). Estudos moleculares, contudo, resultaram na

transferência de *P. rubrisubalbicans* para o gênero *Herbaspirillum*, quando então passou a ser identificado como *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996). Além das gramíneas já mencionadas, já foi descrito o isolamento de *H. seropedicae* de outras espécies da família Poaceae, dentre elas *Bracchiaria decumbens* e *Digitaria decumbens* (BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al., 1996), além de já serem descritas a presença desta espécie colonizando espécies tropicais como o abacaxizeiro (*Ananas sp.*) e bananeira (*Musa sp.*) (WEBER et al., 1999; CRUZ et al., 2001). Recentemente, uma nova espécie do gênero, *H. frisingense*, foi encontrada em tecidos de gramíneas com fisiologia fotossintética do tipo C4, como *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *Pennisetum purpureum* (KIRCHHOF et al., 2001).

1.2 EXOPOLISSACARÍDEOS

O termo exopolissacarídeo (EPS) é amplamente utilizado para nomear polímeros de carboidratos encontrados no exterior das células, sendo sua estrutura altamente diversificada, com propriedades físicas e composições químicas extremamente variadas (SUTHERLAND, 1980). Após a biossíntese, estas moléculas podem permanecer em contato com as células (cápsulas), ou podem ser totalmente liberadas no ambiente, sem que haja relação física com a célula que as produziram, sendo uma classe de polissacarídeos que se diferencia dos polissacarídeos de parede celular e de polissacarídeos somáticos, localizados no citoplasma dentro da membrana plasmática (STACEY & BARKER, 1960). Os EPS são amplamente observados em isolados procarióticos, incluindo vários patógenos humanos, animais e vegetais, bem como em alguns organismos saprofitos e de vida livre (SUTHERLAND, 1972). Podem também ser produzidos por células eucarióticas, principalmente por leveduras e fungos, mas também ocorrem em protozoários e algas unicelulares (SUTHERLAND, 1980).

Há ainda outra nomenclatura comumente utilizada para denominar as moléculas que se encontram imediatamente no exterior de uma célula. O termo *glicocálix*, entretanto, possui a desvantagem de incluir arranjos moleculares mais complexos, incluindo, além dos exopolissacarídeos, componentes de parede celular juntamente com outras espécies químicas, e, portanto, falha no

entendimento de uma definição química que cabe exclusivamente aos EPS por incluir uma variedade de materiais não glicídicos (SUTHERLAND, 1988).

1.2.1 Exopolissacarídeos Bacterianos

Polissacarídeos bacterianos formam um grupo de polímeros onde as variações estruturais são quase ilimitadas, em vários casos apresentando unidades monossacarídicas pouco comuns (KENNE & LINDBERG, 1983). A grande diversidade de estruturas e de microrganismos produtores de EPS está relacionada às diferentes funções desempenhadas por essas moléculas (CHRISTENSEN, 1989). Talvez a principal função dos exopolissacarídeos na fisiologia microbiana seja a de promover a adesão das células, seja em superfícies sólidas ou com outras células, formando agregados (COSTERTON et al., 1995). Agregados de células bacterianas envoltos por EPS formam uma matriz altamente organizada e hidratada na qual múltiplas camadas de células estão embebidas. A existência desta matriz confere às células uma série de vantagens seletivas, tais como a adesão à superfícies (BEVERIDGE & GRAHAM, 1991), proteção contra variações bruscas no macroambiente, aumento da variabilidade antigênica, retenção de íons e nutrientes (COSTERTON et al., 1987), resistência à dessecação (ROBERSON & FIRESTONE, 1992) e proteção mecânica (SUTHERLAND, 1982). A verdadeira função dos EPS, contudo, depende da ecologia da célula bacteriana que o produz. Ainda, alguns exopolissacarídeos são importantes na interação das células bacterianas com células eucarióticas, uma função inicialmente proposta por AYERS e colaboradores (1979).

Atualmente podem ser observados vários exemplos de EPS bacterianos que possuem interesse médico, industrial e biotecnológico. Um dos polímeros mais utilizados industrialmente é o alginato (GACESA, 1998), um polissacarídeo linear formado por unidades de β -D-ácido manurônico ligadas 1 \rightarrow 4 à unidades de α -L-ácido gulurônico (FIGURA 01), e sintetizado por *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii* (EVANS & LINKER, 1973; GORIN et al., 1966). Há atualmente uma grande procura de novos polissacarídeos que possuam propriedades interessantes para a indústria, levando a um crescimento na

identificação de microrganismos produtores de EPS (TABELA 01). Entretanto, a diversidade de estruturas sintetizadas por microrganismos é tamanha, que os estudos de fisiologia de produção, genética de biossíntese e propriedades físico-química destas moléculas ainda não são suficientes para satisfazer a demanda biotecnológica e o interesse industrial nestes polímeros (SUTHERLAND, 1982). A estrutura dos EPS e o rendimento de produção é, na maioria dos casos, extremamente dependente de fatores ambientais, bem como condições fisiológicas como teor de nitrogênio e fósforo disponível, fonte de carbono, aeração, temperatura e pH da cultura (PACE & RHIGELATO, 1980; ALVES, 1991). Há, contudo, algumas vantagens nos polímeros industriais obtidos de microrganismos em relação aos classicamente extraídos de plantas e algas. Dentre estas vantagens podemos destacar a possibilidade de produção contínua, independente de variações sazonais ou efeitos de poluição de águas, ar e solo, bem como a possibilidade de obtenção de polímeros mais homogêneos através do controle das condições de fermentação e da não necessidade do uso de solventes durante o processo de purificação. Além disso, novas técnicas de manipulação gênica são ferramentas potencialmente úteis na produção de EPS modificados e adaptáveis para usos industriais específicos (SUTHERLAND, 1988).

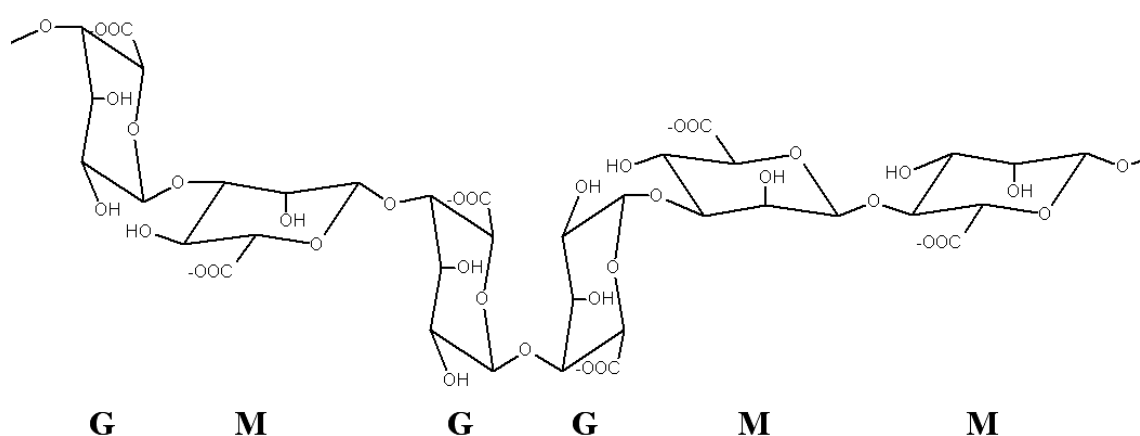


FIGURA 01. Estrutura secundária do alginato. **M)** β -D-ácido manurônico; **G)** α -L-ácido gulurônico. (ERTESVAG, 1998).

TABELA 01. Exopolissacarídeos produzidos por alguns microrganismos.

EPS	Características	Microrganismo	Referência
Alginato	Linear; Ácido	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EVANS & LINKER, 1973
		<i>Azotobacter vinelandii</i>	GORIN <i>et al.</i> , 1966
Marginalana	Galactoglucana ácida	<i>Pseudomonas</i> sp.	FETT <i>et al.</i> , 1995
Xantana	Cadeia celulósica ramificada	<i>Xantomonas campestris</i>	JANSSON <i>et al.</i> , 1975
Gelana Welana Rhamsana	Linear; Ácido	<i>Sphingomonas</i> sp.	SUTHERLAND, 1996
Amilovorana Stewartana	Ramificado; Ácido	<i>Erwinia</i> sp.	NIMITZ <i>et al.</i> , 1996
Acetana	Cadeia celulósica ácida ramificada	<i>Acetobacter</i> sp.	COLQUHOUN <i>et al.</i> , 1995
Succinoglucana	Ramificado; Neutro	<i>Rhizobium melioli</i>	LEIGH & WALKER, 1994
Galactoglucana	Linear; Neutro		GONZÁLES <i>et al.</i> , 1996
Polímero V2-7	Sulfatado	<i>Halomonas eurihalina</i>	BÉJAR <i>et al.</i> , 1998
Zooglana	Ramificado; Neutro	<i>Zoogloea ramigera</i>	TROYANO <i>et al.</i> , 1996
Ácido Colânico	Ramificado; Ácido	<i>Escherichia coli</i>	SUTHERLAND, 1969
		<i>Lactobacillus</i> sp.	CERNING, 1990
		<i>Streptococcus</i> sp.	VAN DER BERG, 1995

A formação de agregados celulares extremamente organizados e envoltos por uma matriz composta principalmente por polissacarídeos muitas vezes é chamada de biofilme (COSTERTON *et al.*, 1995). A maioria dos microrganismos não existe naturalmente em comunidades planctônicas, sendo, portanto encontrados aderidos à diversas superfícies e formando biofilmes que contém colônias organizadas (SUTHERLAND, 2001). O processo de adesão celular e formação de biofilmes mostrou-se ser extremamente complexa, onde as células bacterianas alteram seus fenótipos em resposta à proximidade da superfície. Durante a fase inicial da formação do biofilme, bactérias sésseis encontram-se justapostas com células da mesma espécie ou espécies diferente dentro da matriz

exopolissacarídica, condicionando o microambiente e respondendo de maneira distinta à influência do ambiente, dependendo da posição ocupada pela célula (XAVIER & FOSTER, 2007). A cooperatividade fisiológica é um fator chave para a arquitetura do biofilme e para o estabelecimento das microcolônias, tornando o biofilme uma comunidade dinâmica e eficiente aderida às superfícies (DAVIES et al., 1998).

Uma célula bacteriana pode ainda apresentar uma camada de revestimento externa à parede celular conhecida como cápsula. Os polissacarídeos capsulares (CPS) distinguem-se dos EPS por permanecerem de alguma forma em contato com a célula (TROY, 1979). As cápsulas podem ser facilmente observadas por microscopia óptica de contraste de fase, sendo melhor detectadas por coloração negativa (BAYER & BAYER, 1994). A distinção entre EPS e CPS é relativamente difícil num meio de cultura, uma vez que células mortas rompem-se e liberam o material capsular no meio. Contudo, num meio de cultura fresco, pode-se separar os EPS lavando-se as células com solução fosfato-salina (PBS), enquanto que a remoção do CPS exige uma metodologia mais drástica como sonicação e homogeneização ou por métodos de extração química (SANDFORD, 1979). Alguns polissacarídeos capsulares possuem características imunológicas, sendo normalmente de caráter ácido, contendo ácidos urônicos ou ulosônicos, e substituintes como acetais de ácido pirúvico, grupamentos acetil e fosfato (COLLINS & FERRIER, 1995).

1.2.2 Envolvimento dos EPS na Interação Planta-Bactéria

Uma das funções propostas para os exopolissacarídeos produzidos por bactérias fixadoras de nitrogênio é o seu papel na interação planta-bactéria (LEIGH & COPLIN, 1992). A produção de EPS é um traço comum em várias espécies de bactérias diazotróficas. A capacidade de floculação e agregação de diazotrofos de vida livre tais como *Azospirillum* e *Azotobacter* está ligada à produção destes polímeros (BURDMAN et al., 1998; GACESA, 1998). Durante o processo de infecção por fitopatógenos, os exopolissacarídeos, por serem geralmente hidrofílicos, criam um ambiente favorável ao crescimento do patógeno no interior da planta infectada, e podem ainda agir como barreiras protetoras

contra mecanismos de defesa da planta. Desta forma, a biossíntese de EPS é considerada um fator essencial no processo de infecção da planta por estes microrganismos (LEIGH & COPLIN, 1992). A interrupção de genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos (genes *exo*) resulta na perda dos sintomas provocados por *Erwinia stewartii* e *Xanthomonas axopodis* em seus respectivos hospedeiros (DENNY, 1995). No caso de *Xanthomonas campestris*, foi demonstrado que uma mutação no gene *gumD*, que codifica para uma glucosil transferase envolvida no processo de biossíntese do EPS xantana, diminui drasticamente a patogenicidade deste organismo (CHOU et al., 1997).

Diversas espécies de diazotrofos já foram estudadas com relação à produção de exopolissacarídeos, sendo que algumas sintetizam exclusivamente um único tipo de EPS, enquanto outras podem sintetizar duas ou mais estruturas diferentes (TABELA 02).

A família Rhizobiaceae possui certamente o maior número de espécies descritas que produzem polissacarídeos extracelulares. Dentre os mais estudados estão algumas espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, e *Agrobacterium* (GONZÁLEZ et al., 1996; HISAMATSU et al., 1980; AN et al., 1995). Diversas espécies de *Rhizobium* já foram estudadas e várias estruturas de EPS já foram determinadas, dentre elas *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* e *Bradyrhizobium japonicum* que produzem exopolissacarídeos que contém principalmente RibfA, GlcpA, Galp e Rhap (KENNE & LINDBERG, 1983). *Rhizobium meliloti* apresenta uma cápsula formada por unidades repetitivas de um octassacarídeo contendo Glcp e Galp (EPS II) (GONZÁLEZ et al., 1996). Outro polissacarídeo produzido por *R. meliloti*, EPS I, é uma succinoglucana fundamental para o estabelecimento dos nódulos fixadores de nitrogênio funcionais na simbiose com *Medicago sativa* (LEIGH & COPLIN, 1992; LEIGH & WALKER, 1994; BATTISTI et al., 1992). Entretanto, o papel exato do EPS I na comunicação celular planta-bactéria ainda não é conhecido. Em determinadas condições, o EPS II (galactoglucana) pode assumir o papel do EPS I e promover o estabelecimento de nódulos funcionais nas plantas (GONZÁLEZ et al., 1996). Já foi descrito também que mutantes deficientes na biossíntese do EPS I são capazes de induzir a formação de nódulos, porém estes não contêm bacterióides e são incapazes de fixar o dinitrogênio (LEIGH et al., 1987). Em alguns casos a

mutação nos genes responsáveis pela síntese do EPS I pode impedir a formação do cordão de infecção, estágio inicial de formação dos nódulos (GLAZEBROOK & WALKER, 1989). Apesar destes EPS serem fundamentais na formação dos nódulos durante a interação rizóbio-leguminosa, a estrutura dos EPS não é determinante na especificidade da interação com *Vicia sativa* (LAUS et al., 2005). A figura 02 mostra a estrutura de EPS I e EPS II produzidos por *R. meliloti*.

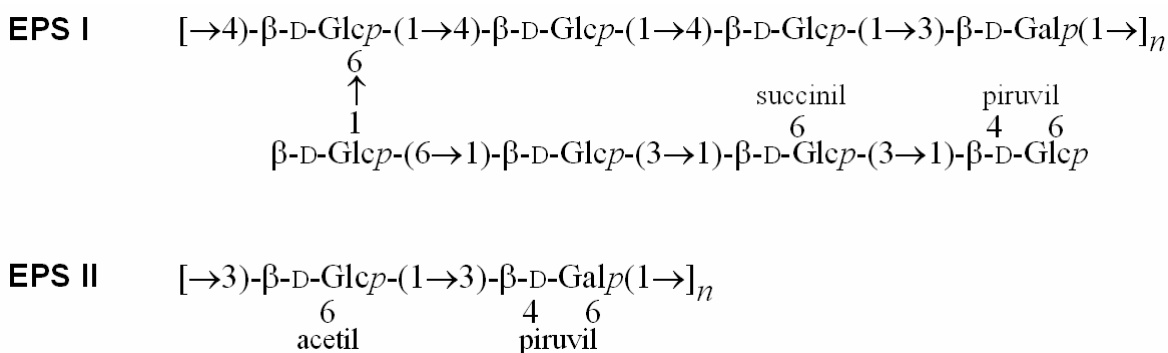


FIGURA 02. Estrutura da succinoglucana (EPS I) e da galactoglucana (EPS II) produzidos por *Rhizobium meliloti*.

A produção de uma glucana cíclica também é descrita para espécies do gênero *Rhizobium* (BREEDVELD et al., 1995) e *Agrobacterium* (HISAMATSU, 1992). Algumas espécies produzem estes polímeros que contêm entre 8 e 25 unidades de glucose ligadas por ligações do tipo $\beta\text{-}1\rightarrow 2$. *Bradyrhizobium japonicum* também é capaz de sintetizar glucanas cíclicas, porém estas possuem suas unidade de glucose ligadas por ligações $\beta\text{-}1\rightarrow 3$ e $\beta\text{-}1\rightarrow 6$, podendo ou não apresentar ramificações e grupamentos substituíntes (ROLIN et al., 1992). Estirpes de *Rhizobium* mutantes na biossíntese destas glucanas, levam à indução de nódulos defeituosos que não apresentam a capacidade de fixar nitrogênio. O processo proposto para o envolvimento dos EPS na formação dos nódulos nas raízes de leguminosas envolve a participação de lectinas na membrana celular da planta hospedeira (DAZZO et al., 1984). Contudo, o único mecanismo comprovadamente demonstrado é descrito para a interação da lectina Trifolina-A com exopolissacarídeos produzidos por *Rhizobium trifolii* (HALVERSON & STACEY, 1986).

Além dos diazotrofos noduladores, bactérias endofíticas capazes de fixar nitrogênio já foram descritas como produtoras de EPS. A influência dos EPS na agregação celular e floculação é demonstrada para *Azospirillum brasilense* (BURDMAN et al., 2000) e *Azospirillum lipoferum* (SADASIVAN & NEYRA, 1985). Várias estirpes de *A. brasiliense* foram analisadas em diferentes condições de cultivo, mostrando uma grande variabilidade na composição monossacarídica dos EPS formados que continham Glc, Gal, Fuc e Rha em proporções variáveis (BURDMAN et al., 2000). Aspectos genéticos, bioquímicos e ecológicos relacionando à presença de EPS em *Azospirillum* também são descritos (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Estudos de interação entre espécies de *Azospirillum* e raízes de trigo mostram a importância dos EPS na relação planta-bactéria (SKVORTSOV & IGNATOV, 1998). A interrupção dos genes envolvidos na biossíntese de dTDP-Rha em *A. brasilense* impede a produção do EPS e afeta a colonização (JOFRÉ et al., 2004). Entretanto, a real interação que ocorre entre os EPS e a raiz da planta parece ser inespecífica, uma vez que a maioria dos EPS produzidos são insolúveis e fibrosos, não havendo aparente interação molecular com receptores da planta.

Representantes diazotrofos da classe das β -proteobactérias também foram relatados como produtores de polissacarídeos extracelulares. A produção de dois EPS pela estirpe M130 de *Burkholderia [brasiliensis]* foi observada (MATTOS et al., 2001) e um dos exopolissacarídeos teve sua estrutura determinada como sendo um pentassacarídeo repetitivo e linear: $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlAp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow]_n$. Foi demonstrado que a espécie *Burkholderia tropica*, estirpe Ppe8, produz quantidades significativas de um EPS ácido quando cultivada na presença de manitol e glutamato (SERRATO et al., 2006). A composição monossacarídica do EPS produzido por *B. tropica* é bastante similar àquela descrita para *B. [brasiliensis]*, contudo, o EPS de *B. tropica* apresenta uma estrutura ramificada, onde a unidade de $\alpha\text{-D-GlAp}$ é terminal, e não faz parte da cadeia principal do polímero (SERRATO et al., 2008). Unidades de açúcares raros também são encontradas nos EPS descritos para *Burkholderia caribensis* (VANHAVERBEKE et al., 2001), que possuem unidades de $\alpha\text{-L-6-dTalp}$ na cadeia principal, e ramificações de $\beta\text{-Kdop}$. Unidades de $\beta\text{-Kdop}$ também são encontradas nos EPS linear de *B. pseudomallei*, juntamente

com unidades de unidades de Galp (STEINMETZ et al., 2000; KAWAHARA et al., 1998). A espécie *Burkholderia cepacia* é certamente a mais estudada do gênero, e produz dois EPS: uma galactoglucana, linear composta por unidades repetitivas do dissacarídeo $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow$ com substituições por acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6 da unidade de Galp (SIST et al., 2003; LAGATOLLA et al., 2002) e um outro polissacarídeo extremamente complexo e ramificado chamado Cepaciana (FIGURA 03) (CERANTOLA & MONTROZIER, 2001). Esse polissacarídeo possui propriedades físico-químicas bastante interessantes devido à sua unidade de GlcAp apresentar-se totalmente substituída, o que confere características reológicas incomuns (LINKER et al., 2001).

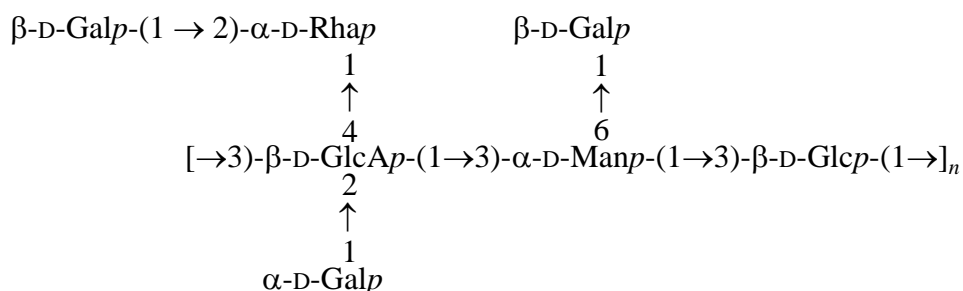


FIGURA 03. Estrutura do EPS cepaciana sintetizado por *Burkholderia cepacia*.

O gênero *Herbaspirillum* possui representantes que têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos. A fitopatologia conhecida como estria mosqueada é resultante da produção excessiva de EPS pelo endófito *H. rubrisubalbicans*, que acaba por obstruir o lúmen do xilema de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1992) ou sorgo (JAMES et al., 1997). A estrutura desses EPS, contudo, ainda não é conhecida. A espécie *H. seropedicae* não possui relatos de produção de EPS por nenhuma de suas estirpes conhecidas. O sequenciamento do genoma de *H. seropedicae*, estirpe SmR1, realizada pelo programa GENOPAR e coordenado pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, revelou, porém, a presença de genes homólogos envolvidos na biossíntese de EPS em outros microrganismos (ANEXO 01).

Dentre as espécies da classe das γ -proteobactérias, *Azotobacter vinelandii* é conhecidamente produtora de grandes quantidades de alginato, um EPS ácido e extremamente viscoso formado por unidades de ácido manurônico e ácido gulurônico na proporção de 1:1 (SABRA, 1998). *Pseudomonas syringae* tem a capacidade de sintetizar dois EPS. A levana é uma polifrutana, formada exclusivamente por unidades de frutose ligadas β -(2 \rightarrow 6) com ramificações do tipo β -(2 \rightarrow 1) (KASAPIS et al., 1994). *P. syringae* também produz alginato, o mesmo produzido por *A. vinelandii*, exceto pela posição das unidades de ManA e GulA, que podem variar de acordo com as condições de crescimento da bactéria (OSMAN et al., 1986; GACESA, 1998).

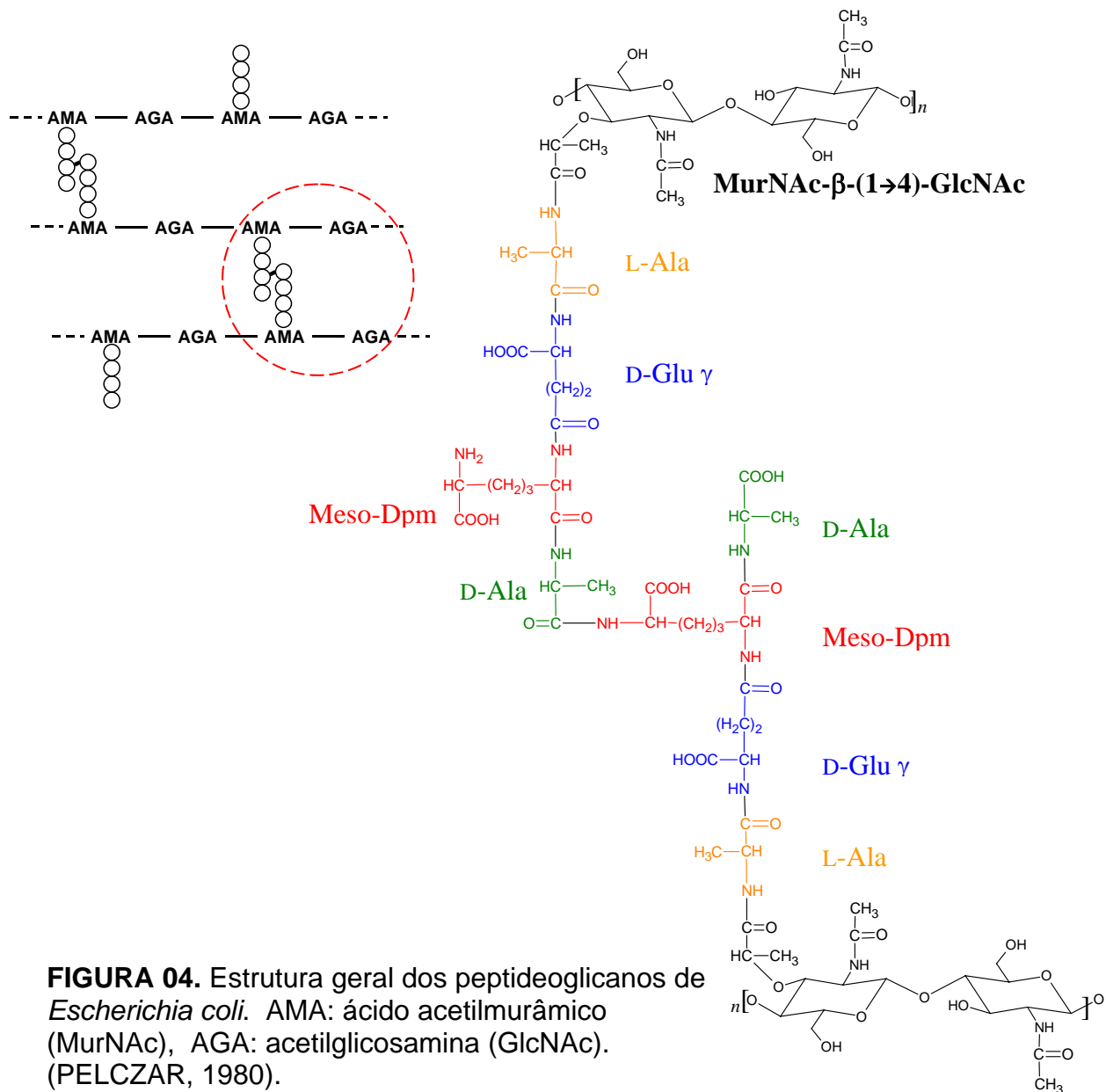
TABELA 02. Composição química de exopolissacarídeos produzidos por bactérias envolvidas em interações com plantas.

Classe	Espécie	Composição	Substituintes	Referência
α-proteobactérias	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Glc	-	SUTHERLAND, 1982
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>			
	Succinoglucana	Glc, Gal (7:1)	-	HISAMATSU et al., 1980
	Celulose	Glc	-	MATTHYSSE, 1986
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Glc, Gal, Fuc, Rha, Ara (variável)	-	BURDMAN et al., 2000
	<i>Beijerinckia sp. 7070</i>	Glc, Gal, Fuc, GlcA (variável)	-	BORGES et al., 2004
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Rha, GlcA (3:1)	O-Metil	AN et al., 1995
	<i>Rhizobium meliloti</i>			
	EPS I	Glc, Gal (7:1)	O-Acetil, Piruvil e Succinil	GONZÁLEZ et al., 1996
	EPS II	Glc, Gal (1:1)	O-Acetil e Piruvil	GONZÁLEZ et al., 1996
	Glucana cíclica	Glc	-	BREEDVELD et al., 1995
β-proteobactérias	<i>Burkholderia [brasiliensis]</i>	Glc, Rha, GlcA (2:2:1)	O-Acetil	MATTOS et al., 2001
	<i>Burkholderia caribensis</i>	Glc, Kdo, 6-deoxi-Tal (2:1:1)	O-Acetil	VANHAVERBEKE et al., 2001
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Gal, Kdo (3:1)	O-Acetil	NIMTZ et al., 1997
	<i>Burkholderia tropica</i>	Glc, Rha, GlcA (2:2:1)	O-Acetil	SERRATO et al., 2008
	<i>Ralstonia pickettii</i>	Rha, GalNAc, BacNAc (1:1:1)	-	VINOGRADOV et al., 2004
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	GalNAc, GalANAc, BacNAc (1:1:1)	3-OH Butiril	ORGAMBIDE et al., 1991
γ-proteobactérias	<i>Azotobacter vinelandii</i>	ManA, GulA (1:1)	-	SABRA, 1998
	<i>Pseudomonas syringae</i>			
	Levana	Fru	-	KASAPIS et al., 1994
	Alginato	ManA, GulA (1:1)	-	OSMAN et al., 1986

1.3 PAREDE CELULAR BACTERIANA

Na maioria das células bacterianas a parede celular protege o delicado protoplasma de choques mecânicos e osmóticos. A parede celular também determina a forma da célula, uma vez que o protoplasma (célula desprovida da parede celular) será sempre esférico, independentemente da forma da célula na presença da parede celular (PELCZAR, 1980). A parede celular também funciona como uma barreira molecular, impedindo que muitos compostos atinjam a superfície da membrana plasmática. Contudo, a parede celular não deve ser vista meramente como uma proteção inerte, ela possui papel ativo na regulação e captação de moléculas pela célula e no reconhecimento celular por outros organismos (SINGLETON, 1992).

De acordo com a estrutura observada na parede celular, as eubactérias são divididas em dois grupos, gram-positivas e gram-negativas. A estrutura básica da parede celular de ambos os grupos é formada por moléculas de peptideoglicano, formando uma camada externa à membrana citoplasmática como uma rede contínua de polissacarídeos ligados por pontes peptídicas, cobrindo toda a superfície celular como uma macromolécula gigante (GLASER, 1973). A porção polissacarídica dos peptideoglicanos é formada por unidades de N-acetilglucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glucopiranoose) (AGA ou GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (2-acetamido-2-deoxi-3-O-lactil-D-glucopiranoose) (AMA ou MurNAc). Estes dois amino-acúcares são ligados alternadamente por ligações do tipo β -(1→4) e contém pequenas cadeias peptídicas (4 ou 5 aminoácidos) que projetam-se das unidades de MurNAc (COLLINS & FERRIER, 1995). Algumas destas cadeias são unidas de maneira cruzada à outra cadeia polissacarídica, dando grande rigidez à estrutura (FIGURA 04).



Na parede celular de bactérias gram-positivas (FIGURA 05) o peptidoglicano é o principal constituinte. Nestes microrganismos a parede celular é bastante grossa, chegando a ter de 30 à 100 nm de espessura. Em certos organismos, tal como *Micrococcus luteus*, o peptidoglicano é responsável por $\frac{3}{4}$ do peso total da parede celular (SHARON, 1975). Outros polissacarídeos podem também estar presentes, ligados covalentemente ao peptidoglicano através de ligações fosfodiéster. Além disso, a parede celular dos organismos gram-positivos pode ainda apresentar ácidos teicóicos, polímeros que contêm entre 8 e 50 unidades de glicerol fosfato, ribitol fosfato, ou 3-O-β-D-glucopiranosilglicerol fosfato (SINGLETON, 1992; COLLINS & FERRIER, 1995). O papel dos ácidos teicóicos

na parede celular ainda não está totalmente esclarecido, mas foi sugerido que estas moléculas possuem atividade antigênica por constituírem um componente grupo-específico para bactérias gram-positivas (SHARON, 1975). Estes também servem de receptores para fagos, além de estarem envolvidos na ligação de íons divalentes, particularmente Mg^{2+} . Em algumas bactérias são também encontrados outros monossacarídeos, oligossacarídeos, lipídeos ou aminoácidos ligados às hidroxilas não substituídas dos ácidos teicóicos (SUTHERLAND, 1972).

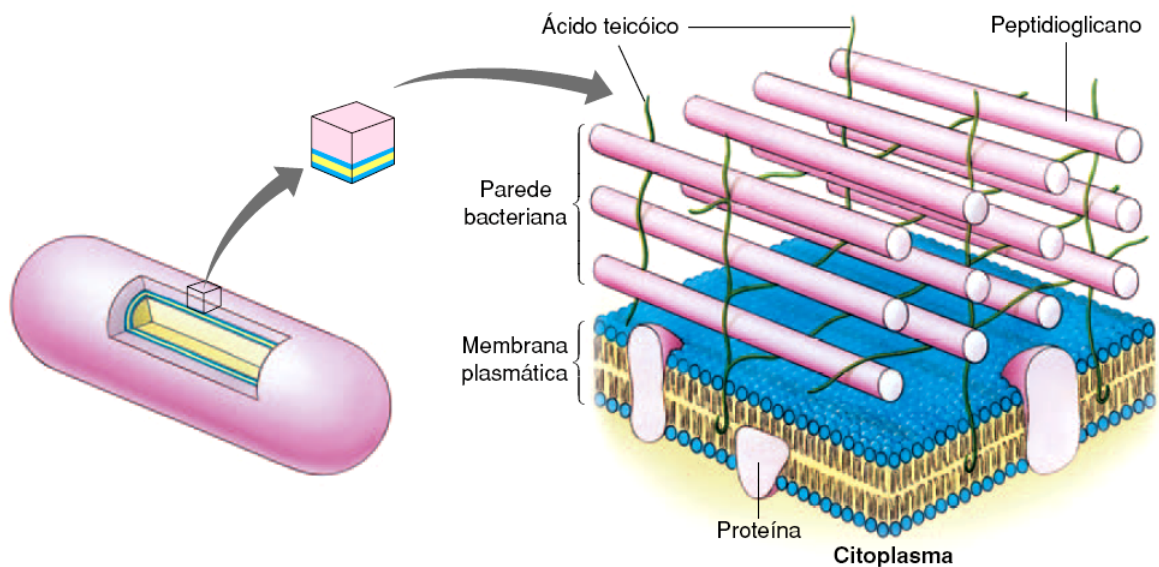


FIGURA 05. Representação esquemática da estrutura de parede celular das bactérias gram-positivas (TORTORA et al., 2006).

A parede celular de bactérias gram-negativas (FIGURA 06) apresenta uma maior complexidade e é muitas vezes descrita pelo termo envelope celular. Neste caso uma fina porção de peptidoglicano, muitas vezes monocamada, encontra-se comprimida entre a membrana plasmática e uma membrana externa (SHARON, 1975). Desta forma, o peptidoglicano não é acessível à ação de lisozimas ou outras enzimas líticas ao menos que esta membrana seja danificada. A membrana externa também possui uma certa permeabilidade a determinados compostos incluindo vários antibióticos, sendo portanto altamente responsável pela resistência destas bactérias (SHARON, 1975). A membrana externa interage não covalentemente com a camada de peptidoglicano através uma proteína

hidrofóbica, que, por sua vez, está covalentemente ligada por seu terminal carboxílico ao grupo amino de um aminoácido do peptidoglicano que não faz ligação cruzada. O terminal amino da proteína hidrofóbica está ligado a um lipídeo que se encontra ancorado por forças hidrofóbicas na membrana externa (COLLINS & FERRIER, 1995).

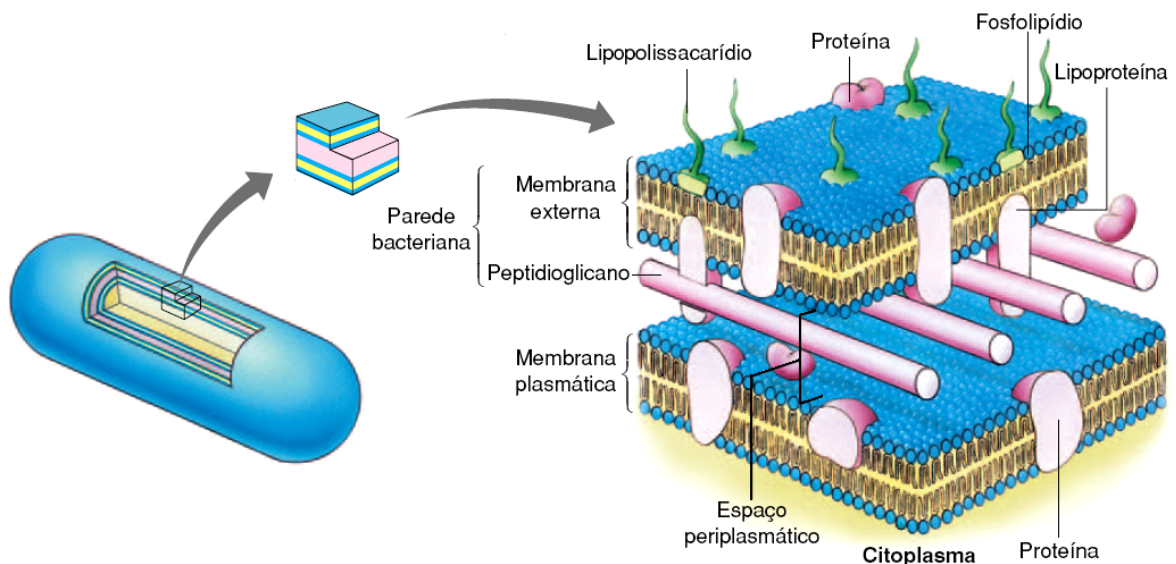


FIGURA 06. Representação esquemática da estrutura de parede celular das bactérias gram-negativas (TORTORA et al., 2006).

A membrana externa das bactérias gram-negativas (FIGURA 06) contém ainda outras proteínas, fosfolipídeos e lipoproteínas, mas o componente principal são os lipopolissacarídeos (LPS), responsáveis por aproximadamente 60% do peso seco desta camada.

1.3.1 Lipopolissacarídeos

Os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas de estrutura extremamente complexa encontrados exclusivamente na monocamada externa da membrana externa das bactérias gram-negativas (COLLINS & FERRIER, 1995). Estes glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente e geneticamente distintas: a porção chamada de lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico, e a região externa ou O-antígeno (SUTHERLAND, 1985). O lipídeo-A é a porção lipofílica do

LPS, responsável por ancorar toda a estrutura à membrana externa da bactéria. Essa também é a região estruturalmente mais conservada entre as classes de bactérias e é basicamente formada por dímeros de 2-amino-2-deoxi-D-glucose (GlcN) ligadas entre si por ligações do tipo β -(1→6) e fosforiladas nas posições 1 e 4', além de apresentarem substituições por ácidos graxos de cadeia longa nas demais posições (ZÄHRINGER et al., 1999). Os lipídeo-A encontrados em Enterobacteriaceae também são chamados de endotoxinas por apresentarem atividade cito-tóxica em células animais (KARUNARATNE et al., 1992). As unidades de GlcN podem estar substituídas por ácidos graxos ligados por ligações do tipo éster ou amida. Frequentemente são encontrados nessas estruturas ácidos graxos hidroxilados nas posições 2 (α -hidroxilados) ou 3 (β -hidroxilados). Essas hidroxilas podem ainda estar substituídas por outros grupamentos acil (LÜDERITZ et al., 1971). A composição de ácidos graxos bem como seu posicionamento são bastante variáveis (MIKHAIL et al., 2005). Alguns ácidos graxos raros são descritos somente para os LPS de algumas espécies de bactérias como é o caso do ácido 27-hidroxi-octacosanóico (*Rhizobium spp.*), ácido 5,9-dihidroxi-tetradecanóico (*Pseudomonas diminuta* e *Pseudomonas vesicularis*) e ácido 3-oxotetradecanóico (*Rhodobacter spp.*) (FORSBERG & CARLSON, 1998; KASAI et al., 1987; TEGTMEYER et al., 1985). O perfil de ácidos graxos geralmente está relacionado com a filogenia das bactérias gram-negativas. Outra característica filogenética, porém menos comumente utilizada na classificação, é a substituição de uma ou ambas as unidades de glucosamina dos lipídeo-A por 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucose (GlcN3N). A presença dessas unidades monossacarídicas duplamente aminadas foi relatada para cerca de 25 espécies de bactérias (WECKESSER & MAYER, 1988; MORAN et al., 1992). Outros grupamentos também podem estar presentes na estrutura do lipídeo-A, ligados aos fosfatos nas posições 1 e 4' ou substituindo-os. Alguns dos casos descritos mostram a presença de unidades de fosfoetanolamina (pEtN) ligados à 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (N-Ara) em *Salmonella typhimurium* (ZHOU et al., 2001).

A ligação entre o lipídeo-A e a porção hidrofílica dos lipopolissacarídeos é realizada quase sempre por uma unidade de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo), ligada ao C-6 livre da unidade distal de glucosamina (GlcN II)

(RAETZ & WHITFIELD, 2002). Entretanto, em algumas estruturas atípicas de LPS, outros ceto-monossacarídeos ácidos podem ser encontrados fazendo essa ponte entre o lipídeo-A e o núcleo. *Acinetobacter haemolyticus* e alguns membros da família Rhizobiaceae apresentam unidades de ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosônico (Ko) e ácido 3-deoxi-D-lixo-hept-2-ulosárico (Dha) fazendo esse papel (VINOGRADOV et al., 1997; RUSSA et al., 1996).

O núcleo do LPS pode ser dividido em dois domínios, interno e externo. No núcleo interno, além das unidades de Kdo que fazem a ligação com o lipídeo-A, é comum encontrar uma ou mais unidades de heptose, geralmente L-glicero-D-mano-heptose (Hep). O núcleo externo consiste geralmente de hexoses, sendo freqüente a presença de Glc, Gal e GlcNAc (RAETZ, 1990). Todas as unidades do núcleo encontram-se na forma piranosídica, e geralmente estão ligados na configuração α -anomérica (JANSSON et al, 1981). A figura 07 mostra a estrutura básica do lipídeo-A ligado ao núcleo em uma bactéria gram-negativa típica.

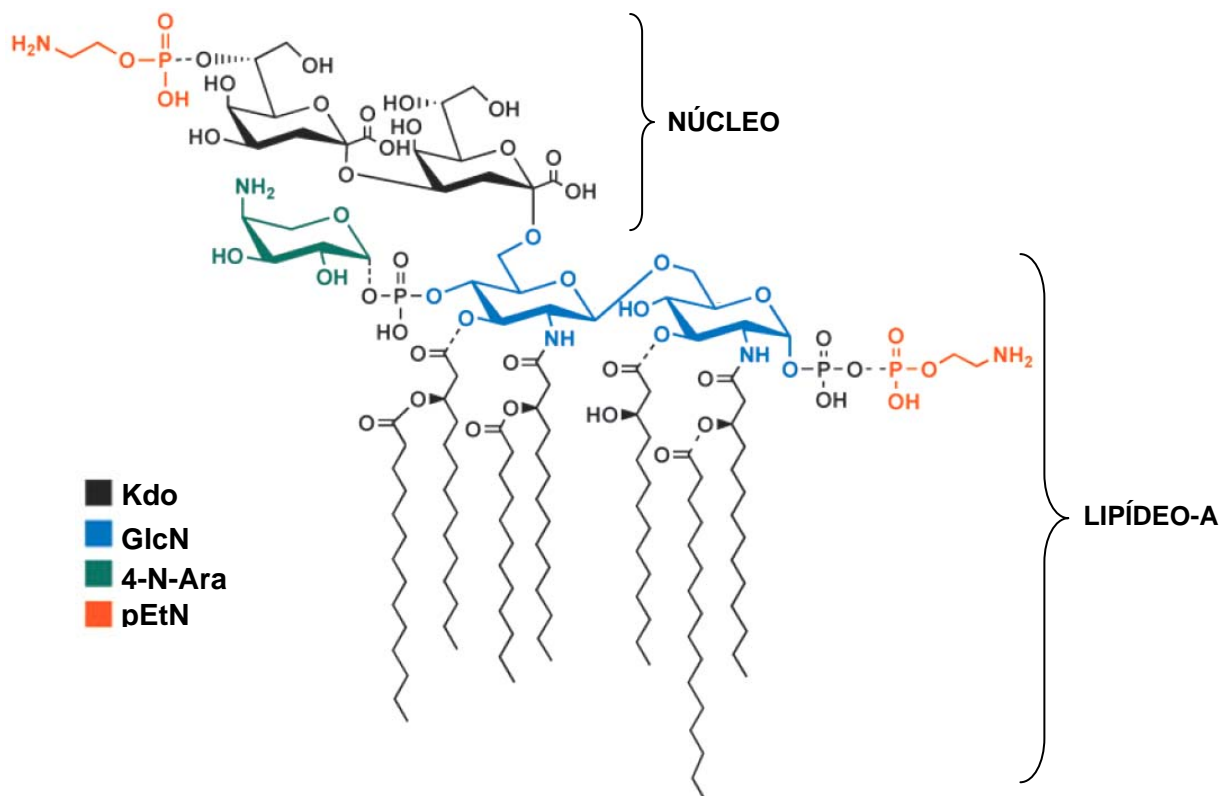


FIGURA 07. Estrutura do lipídeo-A e do núcleo interno do LPS de *Escherichia coli*, estirpe K-12 (RAETZ et al., 2007).

Em alguns casos, os lipopolissacarídeos são classificados de acordo com a presença ou ausência do O-antígeno na estrutura. Quando a bactéria é incapaz de produzir o LPS completo, diz-se que se trata de um mutante rugoso (R – *rough mutant*), uma vez que normalmente a ausência da porção O-antígeno na estrutura do LPS cria colônias bacterianas deformadas ou enrugadas. Por outro lado, mutantes lisos (S – *smooth mutants*) são aqueles capazes de sintetizar a estrutura completa do LPS, contendo o O-antígeno nativo. Mutantes SR (*semi-rough*) são aqueles que produzem estruturas intermediárias do LPS, com a maior parte do O-antígeno ligado ao núcleo da molécula, porém com algumas deficiências estruturais e propriedades biológicas alteradas (ASPINALL, 1970).

A porção O-antígeno geralmente é constituída de unidades oligossacarídicas repetitivas. Diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com massas moleculares diferentes, fenômeno facilmente observado pelo padrão de bandas na análise eletroforética dos LPS (ERRIDGE et al., 2002). As cadeias polissacarídicas formadas projetam-se a partir da membrana externa da bactéria em direção ao meio, e em microrganismos patogênicos esses polissacarídeos estão em contato direto com a célula hospedeira durante a infecção (HEUMANN & ROGER, 2002). Por apresentarem propriedades antigênicas, essas moléculas são a base das espécies bacterianas em serótipos. A presença destas cadeias polissacarídicas na superfície celular promove proteção contra a ação de lisozimas e antibióticos, uma vez que mutantes R são consideravelmente mais sensíveis a esses ataques (CAROFF & KARIBIAN, 2003). Esse fato pode ser em alguns casos explicado por interações LPS-LPS, que são estabilizadas por cátions divalentes e promovem a impermeabilização da membrana a alguns compostos (MAAGD et al., 1989).

A diversidade estrutural encontrada nos O-antígenos é imensa (TABELA 03). Mais de 60 monossacarídeos e 30 diferentes substituintes já foram encontrados nessas estruturas (RAETZ & WHITFIELD, 2002). As unidades repetitivas que formam os polissacarídeos podem variar em sua composição monossacarídica, posição e estereoquímica, além da presença ou ausência de substituintes não-glicídicos. A alta heterogeneidade dessas moléculas torna sua identificação bastante complexa, uma vez que na mesma cultura podem ser encontradas

diversas estruturas intermediárias do polissacarídeo maduro (LÜDERITZ et al., 1971).

1.3.2 Estrutura de LPS em Diazotrofos

As estruturas de lipopolissacarídeos presentes em bactérias fixadoras de nitrogênio são mais bem descritas para espécies da família Rhizobiaceae. A composição monossacarídica e de lipídeos dos LPS de rizóbios pode variar consideravelmente, contudo, a arquitetura básica dessas moléculas é conservada (KANNENBERG et al., 1998). O LPS de *Rhizobium etli* estirpe CE3 é um dos mais extensivamente estudados, e apresenta uma variedade estrutural que é usada para a classificação dessas moléculas em duas classes principais (CARLSON et al., 1987a). A primeira classe consiste de um LPS com rápida migração eletroforética por ser formado apenas pela porção lipídeo-A e uma porção do núcleo oligossacarídico interno (LPS II). A outra classe é formada pela estrutura completa do LPS, contendo a região O-antígeno, além do núcleo completo e do lipídeo-A (LPS I) (RIDLEY, 2000). A porção lipídeo-A de *R. etli* é estruturalmente similar àquela encontrada em *R. leguminosarum*. Ambas apresentam um trissacarídeo formado por glucosamina (GlcN), ácido galacturônico (GalA) e 2-amino-2-deoxigluconato (GlcNato) como estrutura primária do lipídeo-A (CARLSON et al., 1999). Além da substituição do grupamento fosfato por uma unidade de GalA na posição 4', ambas as unidades de GlcN e GlcNato apresentam-se N-aciladas na posição 2 e O-aciladas na posição 3 por ácidos graxos β -hidroxilados de comprimentos variados (BHAT et al., 1994). A maioria dos lipídeo-A presente nas Rhizobiaceae, incluindo *R. etli*, são acilados com cadeias de ácido graxo bastante longas, como o ácido 27-hidroxiocacosanóico (27-OH,C_{28:0}) (KANNENBERG et al., 1998). O núcleo interno de *R. etli* CE3 é formado por um octassacarídeo ramificado complexo, contendo unidades de Kdo, GalA, Man e Gal. A porção do núcleo externo, que faz a ligação com o O-antígeno, consiste em unidades de QuiNAc (N-acetilquinosamina), Man e Fuc (FORSBERG & CARLSON, 1998). Apesar da variedade estrutural dos O-antígenos encontrados para rizóbios é comum a presença de açúcares hidrofóbicos, incluindo deoxi-hexoses, 6-deoxi-amino-açúcares, deoxi-hexoses

metiladas e *N*-metil-6-deoxi-açúcares. Além disso, é freqüente a presença de grupamentos acetil na estrutura (SCHNAITMAN & KLENA, 1983). O LPS I de *R. etli* CE3 possui, no final da estrutura polissacarídica, uma sequência formada por cinco unidades trissacarídicas repetitivas, cada uma formada por um dissacarídeo GlcA-Fuc contendo uma unidade terminal de 3-metil-6-deoxitalose (3Me-6dTal) ligada às unidades de Fuc. A cadeia do *O*-antígeno ainda possui uma unidade terminal de 2,3,4-tri-*O*-metil fucose (FORSBERG & CARLSON, 1998; BHAT & CARLSON, 1992). Microheterogeneidades estruturais podem ocorrer devido à alterações na metilação dos resíduos fucosil e na composição de ácidos graxos da porção lipídeo-A.

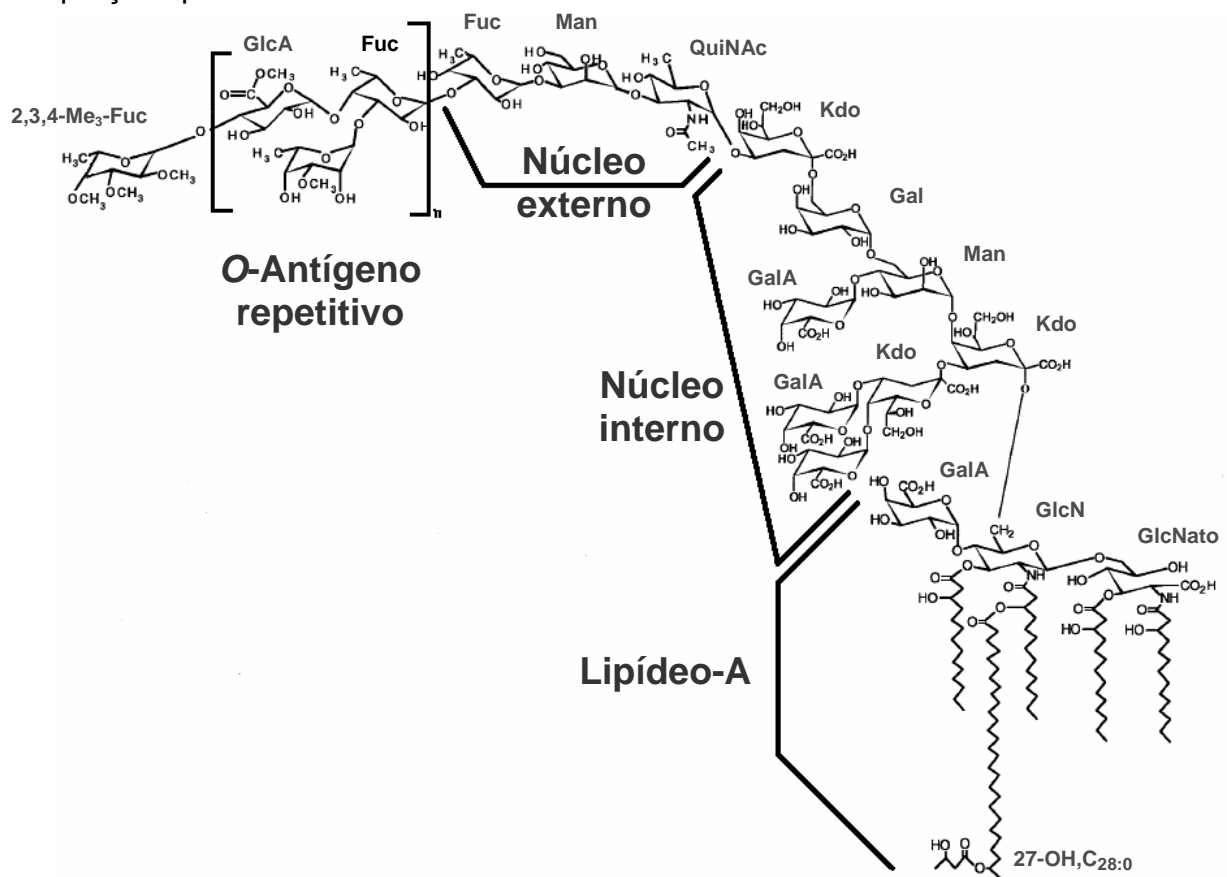


FIGURA 08. Estrutura do LPS completo (LPS I) de *Rhizobium etli* CE3. (RIDLEY, 2000).

Diversos outros diazotrofos também já tiveram as estruturas de seus lipopolissacarídeos determinadas. A presença de unidades de rhamnose na estrutura dos *O*-antígenos é um traço comum entre várias espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. *Rhizobium trifolii* apresenta um pentassacarídeo repetitivo

como estrutura principal de seu O-antígeno que é formado por três unidades de rha, além de ManNAc e GlcNAc (WANG & HOLLINGSWORTH, 1994). No caso da γ -proteobactéria *Pseudomonas syringae*, a estrutura do O-antígeno é formada por um polímero linear de β -(1 \rightarrow 2)-L-Rha. Os diazotrofos endofíticos do gênero *Azospirillum* também apresentam grandes quantidades de rhamnose na estrutura dos O-antígenos. No caso de *A. brasilense*, a estrutura do O-antígeno é formada exclusivamente por esse monossacarídeo na forma de uma homorhamnana linear, onde todas as unidades são encontradas como D-isômeros (FEDONENKO et al, 2002). *Azospirillum lipoferum* apresenta uma cadeia principal de rhamnose com ramificações de Glc e substituições por grupamento acetil (SKVORTSOV & IGNATOV, 1998). A bactéria *Acetobacter diazotrophicus* sintetiza uma estrutura similar àquelas descritas (PREVIATO et al., 1997) indicando que algumas α -proteobactérias podem apresentar algum tipo de relação estrutural em seus O-antígenos. Entretanto, análises de composição em seis diferentes estirpes de *A. diazotrophicus* indicam uma grande variabilidade estrutural dentro da própria espécie (FONTAINE et al., 1995).

Diazotrofos da classe das β -proteobactérias apresentam uma variabilidade muito grande de estruturas descritas, e em muitos casos são encontradas unidades monossacarídicas raras. Um exemplo é a presença de unidades de yersiniose (YerA) na estrutura do O-antígeno produzido por *Burkholderia [brasiliensis]* (MATTOS et al., 2005). Essa unidade de YerA é ramificante em uma estrutura com cadeia principal formada por unidades de rhamnose. *Ralstonia pickettii* apresenta outro monossacarídeo incomum, BacNAc, na estrutura do O-antígeno (VINOGRADOV, 2004).

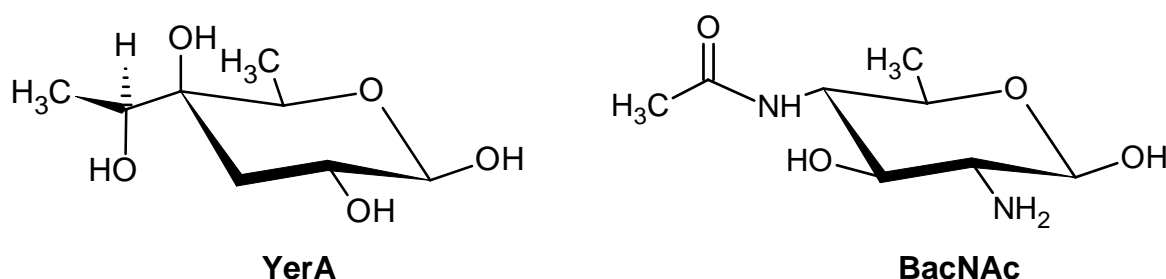


FIGURA 09. Estrutura das unidades de YerA (3,6-dideoxi-4-C-(4'-hidroxi-etil)-D-xylo-hexose) e de BacNAc (4-acetamido-2-amino-2,4,6-trideoxi-D-glucose).

TABELA 03. Estrutura da porção O-antígeno descrita para diversas espécies de bactérias Gram-negativas.

Classe / Espécie	Estrutura Repetitiva do O-Antígeno	Referência
α-proteobactérias		
^{Nfix} <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	$\begin{array}{c} \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}6\text{-deoxi-}\alpha\text{-D-Talp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}p\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow \\ 2 \\ \text{OAc} \end{array}$	GIL-SERRANO, et al., 1995
^{Nfix} <i>Rhizobium trifolii</i> 4S	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow \\ 2 \\ \alpha\text{-D-ManNAc} \end{array}$	WANG & HOLINGSWORTH, 1994
^{Nfix} <i>Rhizobium etli</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{-}(1\rightarrow 5)\text{-Kdop}\text{-}(2\rightarrow \\ \uparrow \\ 4 \\ \alpha\text{-D-GalAp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}[\alpha\text{-D-GalAp}\text{-}(1\rightarrow 5)\text{-Kdop} \end{array}$	FORSBERG & CARLSON, 1998
^{Nfix} <i>Rhizobium etli</i> CE3	$\begin{array}{c} \rightarrow 4)\text{-Glc}pA\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-Fuc}p\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow \\ 3 \\ 3\text{-O-Me-6-deoxi-Talp} \end{array}$	FORSBERG et al., 2000
^{Nfix} <i>Azospirillum lipoferum</i> spBr17	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow \quad \uparrow \\ 2 \quad 2 \\ \beta\text{-D-Glc}p \quad \text{OAc} \end{array}$	SKVORTSOV & IGNATOV, 1998
^{Nfix} <i>Azospirillum brasilense</i> sp245	$\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow$	FEDONENKO et al., 2002
^{Nfix} <i>Acetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	$\begin{array}{c} \rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rib}f\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow \\ 2 \\ \beta\text{-D-Glc}p \end{array}$	PREVIATO et al., 1997
^{Nfix} <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-6-deoxi-Talp}\text{-}(1\rightarrow$	CASTRO et al., 2003
^{Nfix} <i>Agrobacterium radiobacter</i>	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc}\text{-}(1\rightarrow$	CASTRO et al., 2004
β-proteobactérias		
<i>Burkholderia cepacia</i> ASP B2	$\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rib}f\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow$	LEONE et al., 2006
^{Nfix} <i>Burkholderia [brasiliensis]</i>	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow \\ 2 \\ \alpha\text{-YerAp} \end{array}$	MATTOS et al., 2005

<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>agaricola</i>	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow$ \uparrow 2 OAc	KARAPETYAN et al., 2006
^{Nfix} <i>Ralstonia pickettii</i>	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-GalnAcA}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-BacNac}\text{-}(1\rightarrow$	VINOGRADOV et al., 2004
<i>Naxibacter alkalitolerans</i> YIM 31775	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-FucNac}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Quip3NHBU}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow$	SILIPO et al., 2007
<i>Bordetella hinzii</i>	$\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcpNac3Nac}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNac3Nac}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNac3Nac}\text{-}(1\rightarrow$	VINOGRADOV, 2002
γ-proteobactérias		
<i>Escherichia coli</i> O65	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalAp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalApNac}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GalAp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNac}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Quip3Nac}\text{-}(1\rightarrow$ \uparrow 6 NH_2	PERRY & MACLEAN, 1999
<i>Escherichia coli</i> O166	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNac}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNac}\text{-}(1\rightarrow$ \uparrow 3 $\beta\text{-D-Glcp}$	ALI et al., 2007
^{Nfix} <i>Klebsiella pneumoniae</i> O1	$\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Galp}\text{-}(1\rightarrow$	VINOGRADOV et al., 2002
<i>Shigella boydii</i>	\downarrow OAc \downarrow 6 $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNac}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow$ \downarrow 3 $\alpha\text{-L-Rhap}$	L'VOV et al., 1995
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpNacA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpNac}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-QuiNac}\text{-}(1\rightarrow$	YOKOTA et al., 1986
^{Nfix} <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	$\rightarrow 2\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow$	OVOD et al., 2004

^{Nfix} Bactérias fixadoras de nitrogênio.

As estruturas podem variar de acordo com a microheterogeneidade de cada espécie. Os grupamentos fosfato foram removidos para melhor visualização das estruturas.

1.3.3 Envolvimento dos LPS na Interação Planta-Bactéria

O atual entendimento do papel biológico dos lipopolissacarídeos nos processos de interação de bactérias com seus hospedeiros é principalmente voltado para as espécies de Enterobacteriaceae. A importância dos LPS na comunicação celular planta-bactéria já foi demonstrada para algumas espécies, mas o papel exato dessas moléculas no processo ainda não é conhecido (DENNY, 1995). Entretanto, esses polissacarídeos de superfície são a interface entre as células bacterianas e o ambiente, e, portanto, devem apresentar uma importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular (KANNENBERG et al., 1998).

No caso de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, a perda ou alteração da estrutura da porção O-antígeno está relacionada com a perda da virulência (SMITH et al., 1994). Alguns trabalhos sugerem que os LPS estão envolvidos no processo de adesão de *Agrobacterium tumefaciens* às células hospedeiras (PUEPPKE, 1984; MATHYSSE, 1986). Contudo, avaliações posteriores não conseguiram suportar a hipótese de que os LPS de *A. tumefaciens* possuem um papel direto na agregação bacteriana com seu hospedeiro. Mutantes de *A. tumefaciens* que produzem um LPS deficiente na região do núcleo, mas que sintetizam a porção O-antígeno sem defeitos, são capazes de aderir às células de cenoura normalmente (METTS et al., 1991) mostrando que a estrutura total do LPS não é fundamental para o processo. A produção de mutantes R de *Agrobacterium vitis* e *Agrobacterium rubi* mostrou que a falta da porção O-antígeno não afeta a formação de tumores nas plantas hospedeiras, sugerindo que os LPS podem não estar envolvidos no processo de patogênese (WEIBGEN et al., 1993). Em *Pseudomonas aeruginosa*, a mutação do gene *rmlC*, responsável por um passo da biossíntese de UDP-Rha, mostrou que o LPS formado não é detectado por anticorpos específicos para o LPS nativo (RAHIM et al., 2000). Uma mutação no gene *galU* de *P. aeruginosa* impede a ligação da porção O-antígeno ao núcleo externo do LPS (CHOUDHURY, et al., 2005).

O processo de nodulação em leguminosas realizado durante a simbiose com bactérias da família Rhizobiaceae parece ser alterado na ausência de LPS intactos (CARLSON et al., MAAGD et al., 1988). Contudo, os LPS aparentemente

não afetam os primeiros estágios de nodulação, como a adesão, enrolamento do pêlo radical e formação do cordão de infecção (KANNENBERG et al., 1998). Foi demonstrado que os LPS de *Rhizobium etli* são responsáveis pela manutenção das células viáveis dentro dos nódulos após a formação dos mesmos em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (NOEL et al., 2000). Além disso, os bacterióides dentro dos nódulos apresentam variações drásticas na estrutura dos LPS em relação às células antes da infecção, como demonstrado *in situ* para os LPS de *R. leguminosarum* durante a simbiose com *Pisum sativum*, *Vicia sativa* e *Phaseolus vulgaris* (KANNENBERG et al., 1994; GOOSEN-DEROO et al., 1991). Bacterióides de *R. etli* retirados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (TAO et al., 1992), e de *Sinorhizobium meliloti* retirados de alfafa (REUHS et al., 1999) mostraram diferenças estruturais na porção O-antígeno dos LPS similares às aquelas observadas quando essas bactérias são cultivadas em baixos níveis de oxigênio e baixo pH, indicando que as mudanças nas estruturas podem ser uma consequência das condições fisiológicas à que as células estão expostas dentro dos nódulos (KANNENBERG et al., 1998). Mutantes de *R. etli* que produzem uma estrutura truncada de LPS formam nódulos defeituosos e não possuem a capacidade de fixar nitrogênio (NOEL & DUELLI, 2000). Aparentemente, quando maior a anomalia na estrutura do LPS, menores as chances de sobrevivência dos bacterióides, e em casos de extremos de alteração estrutural dos LPS, o processo de infecção pode parar antes do início de formação do nódulo (CARLSON et al., 1995; RIDLEY, 2000). Há indícios de que a atividade dos genes nod pode afetar a estrutura dos LPS (CARLSON et al., 1987b), e estudos de homologia da seqüência de nucleotídeos dos genes nod também sugerem que eles podem estar envolvidos na biossíntese ou modificação de lipopolissacarídeos (MAAGD & LUGTENBERG et al., 1989).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) por bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, bem como determinar a composição e estrutura química destas moléculas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* que produzem quantidades significativas de EPS em meio líquido.
- Isolar e purificar os EPS de diferentes estirpes bacterianas, quando presentes, para análises químicas e estruturais.
- Isolar oligossacarídeos a partir dos EPS parcialmente hidrolisados, e purificá-los por cromatografia de gel filtração.
- Determinar a estrutura dos oligossacarídeos purificados, utilizando métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.
- Extrair os LPS da membrana externa das células crescidas em meio líquido, e determinar a presença destes LPS nas diferentes frações de extração.
- Determinar o perfil eletroforético dos LPS extraídos de diferentes estirpes bacterianas.
- Determinar as diferenças químicas e estruturais dos LPS produzidos por *H. seropedicae* SmR1 em relação aos dois mutantes deficientes na síntese de rhamnose.
- Caracterizar quimicamente as diferentes porções dos LPS isolados (lipídeo-A e O-antígeno).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas nesse trabalho diversas estirpes das bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum* provenientes da coleção de culturas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e gentilmente cedidas pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Os estoques de células foram mantidos em suspensão de glicerol 50% e armazenados a -20°C, ou estocados em meio semi-sólido à temperatura ambiente. A tabela 04 mostra a lista de estirpes utilizadas.

TABELA 04. Lista de estirpes de diazotrofos utilizados neste trabalho e características genotípicas e fenotípicas relevantes.

Estirpes	Genótipo / Fenótipo	Referência / Fonte
<i>H. seropedicae</i>		
M2	Nif ⁺	RAMOS et al., 2003
RAM4	Nif ⁺ ; Sm ^R ; Km ^R ; ∴DsRed	MONTEIRO, R. A. *
RAMEBB	rmIB ∴EZ:TN TM ; Sm ^R ; Tc ^R	MONTEIRO, R. A. *
RAMEBC	rmIC ∴EZ:TN TM ; Sm ^R ; Tc ^R	MONTEIRO, R. A. *
SmR1 [†]	Nif ⁺ ; Sm ^R	MACHADO et al., 1995
Z67 (LMG 6513)	Nif ⁺	BALDANI et al., 1986
Z78 (LMG 6514)	Nif ⁺	BALDANI et al., 1986
ZA95	Nif ⁺	BALDANI et al., 1986
ZM152	Nif ⁺	BALDANI et al., 1986
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
AB7	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
BA10	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
BA15	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
BA16	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
HCC103	Nif ⁺	DÖBEREINER et al., 1995
M1 (LMG 1278)	Nif ⁺	BALDANI et al., 1996
M4 (ATCC 2286)	Nif ⁺	BALDANI et al., 1996
<i>Herbaspirillum sp.</i>		
AB48	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
AB71	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
<i>B. [brasiliensis]</i>		
M130	Nif ⁺	CRUZ et al., 2001
<i>B. tropica</i>		
Ppe8 (LMG 22274)	Nif ⁺	REIS et al., 2004

* Estirpes mutantes ainda não publicadas. Comunicação pessoal (Rose A. Monteiro, 2006).

† A estirpe SmR1 é derivada da estirpe Z78.

3.1.1 Construção das Estirpes Mutantes

Para a construção dos mutantes de *H. seropedicae* deficientes na síntese de rhamnose, os plasmídeos pRAMEBB e pRAMEBC, contendo respectivamente os genes *rmIB* e *rmIC* mutados por um transposon Tc^R (EZ:TNTM <TET-1> - Epicentre Laboratories), foram introduzidos em *H. seropedicae* SmR1 por eletrotransformação. Os transformantes que continham o transposon no genoma de *H. seropedicae* como resultado de recombinação homóloga dupla foram selecionados e a posição da inserção do transposon foi determinada por *southern blot*. As estirpes recombinantes Tc^R foram selecionadas e nomeadas como *H. seropedicae* RAMEBB e RAMEBC, mutantes nos genes *rmIB* e *rmIC* respectivamente. Ambas as estirpes mutantes foram construídas no Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná e foram gentilmente cedidas para este trabalho.

3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS BACTERIANAS

3.2.1 Meio de Cultura

Para o crescimento das células de *Burkholderia tropica*, estirpe Ppe8, foi utilizado o meio sintético JMV (BALDANI *et al.*, 1996) contendo: K₂HPO₄ (0,6 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,8 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,2 g.L⁻¹), NaCl (0,1 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,2 g.L⁻¹), Na₂MoO₄.2H₂O (2 mg.L⁻¹), MnSO₄.H₂O (2,4 mg.L⁻¹), H₃BO₃ (2,8 mg.L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (0,08 mg.L⁻¹) e ZnSO₄.7H₂O (0,24 mg.L⁻¹) suplementado com 4 mL de FeEDTA (1,64%) e 1 mL de biotina (100 µg/ml). A fonte de carbono utilizada foi manitol (5,0 g.L⁻¹ ou 27,5 mM) e como fonte de nitrogênio foi usado L-glutamato monossódico monohidratado (1,87 g.L⁻¹ ou 10 mM) (ANEXO 02). Originalmente o meio continha extrato de levedura (100 mg.L⁻¹) que foi excluído para manter a composição do meio melhor definida. As soluções de FeEDTA (1,64%) e glutamato de sódio 1 M foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio na hora do uso. Todos os outros sais foram solubilizados em água destilada e autoclavados por 20 min (120°C, 1 atm) e o pH ajustado até 4,5 com H₂SO₄ 2N.

O crescimento das estirpes de *Herbaspirillum spp.* foi realizada utilizando-se o meio NFb malato (PEDROSA & YATES, 1984) que continha K_2HPO_4 ($17,8 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($159,5 \text{ g.L}^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), $NaCl$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), $CaCl_2$ (20 mg.L^{-1}), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (20 mg.L^{-1}), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), $MnSO_4 \cdot H_2O$ ($2,4 \text{ mg.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($2,8 \text{ mg.L}^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($8,0 \text{ mg.L}^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($240 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) e biotina ($100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$). A fonte de carbono utilizada foi ácido málico ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl (20 mM). O pH do meio foi ajustado para 6,5. Os sais de fosfato bem como o cloreto de amônio foram autoclavados separadamente e adicionados ao restante do meio já autoclavado momentos antes da inoculação (ANEXO 03).

3.2.2 Condições de Crescimento

O preparo dos pré-inóculos foi realizado em frascos de 10 mL contendo 2 mL de meio de cultura (JMV ou NFb) inoculados com 40 μL da suspensão estoque de células em glicerol 50%. O crescimento foi realizado a 30°C em shaker rotatório (120 rpm). Para o cultivo em grande escala, foram utilizados frascos erlenmeyer de 2,0 L de capacidade, contendo 1,0 L de meio de cultura e inoculados com o pré-inóculo fresco crescido até uma densidade óptica ($D.O_{.600}$) de aproximadamente 0,8. Os frascos foram mantidos a 30°C shaker rotatório (120 rpm) por 48 h. A $D.O_{.600}$ inicial de todos os cultivos foi padronizada em 0,05.

3.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE EPS E LPS

3.3.1 Crescimento em Meio Sólido Contendo Calcofluor

Algumas estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foram crescidas em placas de petri utilizando meios de cultura acrescidos de ágar (5 g/L). Ao meio de cultura também foi adicionado um corante epifluorescente com comprimento de emissão de 430nm (calcofluor bright 28 – SIGMA) na concentração final de 200 $\mu\text{g/mL}$. Este corante fluorescente é específico para polissacarídeos que contém ligações do tipo $\beta\text{-1}\rightarrow\text{4}$ ou $\beta\text{-1}\rightarrow\text{3}$ (WOOD, 1980). As placas foram divididas em quadrantes e inoculadas com 1 μL de pré-inóculo fresco de estirpes selecionadas. Após 24 h

de crescimento em estufa à 30°C, a detecção da produção de EPS de cada estirpe foi determinada com a iluminação das placas por luz UV num comprimento de onda de 365nm.

3.3.2 Crescimento em Meio Líquido Contendo Flavonóides

A produção de EPS por *H. seropedicae* SmR1 foi avaliada na presença dos flavonóides naringenina e quercitina. As células foram cultivadas em meio NFb nas condições previamente descritas, em frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido acrescido de naringenina ou quercinina em concentrações variáveis (0,1 – 10 µg/mL). O crescimento das células foi acompanhado pela densidade óptica da cultura em 600 nm (D.O.₆₀₀) e a quantidade de açúcares totais presentes no meio de cultura foi avaliada pela reação colorimétrica com PhOH:H₂SO₄ (DUBOIS et al., 1956) após remoção das células por centrifugação.

3.3.3 Microscopia de Fluorescência

Para a detecção de produção de polissacarídeos na superfície bacteriana de *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe SmR1, foi realizada uma microscopia óptica de fluorescência em células de *H. seropedicae* SmR1 crescidas em meio NFb líquido acrescido de calcofluor na concentração final de 100 µg/mL. As células utilizadas possuíam um gene repórter responsável pela síntese de uma proteína vermelha fluorescente (DsRed). Lâminas de microscopia óptica foram preparadas com alíquotas da cultura e observadas em microscópio de fluorescência (Confocal Radiance 2001 – Eclipse E800 Nikon). A detecção das proteínas DsRed, foi realizada com laser He-Ne em comprimento de onda de 543 nm e filtro LP 560. Para a visualização de fluorescência do calcofluor foi utilizada luz UV como comprimento de onda excitatório (365 nm) e detecção direta. As imagens foram adquiridas por uma câmera acoplada ao equipamento com auxílio de software.

3.4 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DOS EPS E LPS

3.4.1 Obtenção dos Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos produzidos pelas estirpes de *Burkholderia* e *Herbaspirillum* foram obtidos após crescimento das bactérias em frascos tipo erlenmeyer contendo 1 L de meio de cultura como descrito. Após 48 h de crescimento, as estirpes selecionadas que mostravam produção significativa de EPS foram submetidas à centrifugação (5 min, 8.000 x g) para a remoção das células. O meio desprovido de células foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida até aproximadamente 100 mL, dialisado exaustivamente em água corrente (MWCO 14.000 Da) e submetido à tratamento com excesso de etanol (3 v/v) por 12 h a -20°C. O precipitado resultante foi removido por centrifugação (10 min, 15.000 x g) como EPS, solubilizado em água destilada e liofilizado para posterior análise.

3.4.2 Extração dos Lipopolissacarídeos

Após crescimento das células de *Herbaspirillum spp.* em frascos do tipo erlenmeyer contendo 1 L de meio de cultura como descrito, as células foram removidas por centrifugação (5 min, 8.000 x g) e coletadas. Após repetidas lavagens das células com solução salina (NaCl 0,9%) e posteriormente com água destilada, as células foram liofilizadas.

A extração dos LPS produzidos por *H. seropedicae*, SmR1 e pelas estirpes mutantes RAMEBB e RAMEBC, foi realizada utilizando 4,5 g de células liofilizadas para que se obtivesse quantidade suficiente de LPS para análises espectrométricas. As células secas foram suspensas em 80 mL de água deionizada (17 mL de água para cada g de células) e foi aquecida à 65°C. Posteriormente, 80 mL de fenol 90%, pré-aquecido à 65°C, foi adicionado. A solução foi mantida à 65°C sob agitação por 20 min e posteriormente resfriada em banho de gelo por 10 min (WESTPHAL & JANN, 1965). Após centrifugação, a fase aquosa foi removida, enquanto a fase fenólica foi extraída novamente com nova adição de 50 mL de água nas mesmas condições. Ambas as fases, aquosa

e fenólica, foram então dialisadas exaustivamente em membranas de 3.500 Da de exclusão. As frações foram centrifugadas, para a remoção de materiais insolúveis, e o material solúvel contendo LPS foi liofilizado para posterior análise (RIDLEY et al., 2000).

As demais estirpes analisadas foram submetidas à extração dos LPS utilizando apenas quantidades suficientes para a análise do perfil eletroforético e de composição química dos LPS.

3.5 MÉTODOS QUÍMICOS

3.5.1 Hidrólise Parcial dos Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos obtidos das estirpes selecionadas mostraram não ser totalmente solúveis em água após liofilização e foram submetidos à hidrólise parcial para a formação de oligossacarídeos e continuidade das análises. Aproximadamente 30 mg de EPS foram hidrolisados com TFA 1 M (5,0 mL) por 30 min à 100°C. Posteriormente o material foi resfriado em banho de gelo e 10 mL de água foram adicionados. O material foi congelado e liofilizado. O hidrolisado seco foi solubilizado em água e tratado com etanol em excesso (3 v/v) por 12 h à -20°C. O precipitado resultante foi eliminado por centrifugação (10 min, 15.000 x g) e o sobrenadante contendo oligossacarídeos foi coletado, concentrado em rotaevaporador e liofilizado para posterior análise e fracionamento em coluna de gel filtração.

3.5.2 Hidrólise Branda dos Lipopolissacarídeos

As frações contendo LPS de *H. seropedicae*, SmR1 e dos mutantes RAMEBB e RAMEBC, foram submetidas à hidrólise branda para a separação da porção lipídeo-A da cadeia polissacarídica (O-antígeno). 10 mg de cada fração foram dissolvidos em 1 mL de água deionizada e sonicados por 10 s. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de ácido acético 2% e a solução foi mantida a 100°C sob agitação até que um precipitado fosse formado (30-45 min). O material foi resfriado em banho de gelo por 10 min e centrifugado (LÜDERITZ et al., 1971). O

precipitado formado continha a porção lipídeo-A dos LPS e foi lavado 3 vezes com água seguido de centrifugação. As frações solúveis foram combinadas e continham os oligossacarídeos da porção O-antigênica. O material precipitado e o solúvel foram liofilizados para posterior análise estrutural.

3.5.3 De-O-Acilação da porção Lipídeo-A

A porção lipídeo-A obtida na hidrólise branda dos LPS foi submetida à processo de de-O-acilação, para a remoção dos ácidos graxos ligados na forma de ésteres. As amostras liofilizadas (2 mg) foram tratadas com 0,5 mL de hidrazina anidra por 90 min a 40°C (SILIPO et al., 2002). Posteriormente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e 1 mL de acetona foi adicionado para auxiliar na secura do material com fluxo de nitrogênio. O material foi então particionado com CHCl₃:H₂O (1:1 v/v) e a fase aquosa contendo o lipídeo-A de-O-acilado foi liofilizada para posterior análise estrutural.

3.5.4 De-fosforilação da Porção Lipídeo-A

A remoção dos substituintes fosfato (-PO₃) da estrutura do lipídeo-A foi realizada após tratamento com ácido fluorídrico. Uma porção liofilizada das amostras contendo lipídeo-A (2 mg) foi tratada com ácido fluorídrico concentrado (HF 48%) por 48 h, à 4°C sob agitação constante (SILIPO et al., 2002). Foram utilizados tubos de polipropileno para a realização da reação. A solução foi então evaporada sob fluxo de nitrogênio por várias horas, com freqüentes adições de iso-propanol para auxiliar na eliminação do HF. Após a secura, o material foi deixado em dessecador a vácuo acoplado a um *trap* de NaOH até que se confirmasse a completa eliminação do HF. Quando o pH da solução atingiu a neutralidade, o material de-fosforilado foi liofilizado para posterior análise estrutural.

3.5.5 Métodos de Derivatização

3.5.5.1 Derivados Alditol Acetatos (AA)

Para a análise de composição de monossacarídeos neutros, 2 mg de material contendo lipopolissacarídeos foram hidrolisados com TFA 2M a 100°C por 8 horas, seguido de redução com NaBH₄ por 12 h. A solução foi lavada repetidas vezes com metanol e liofilizada. 3 mL de Ac₂O-piridina (1:1, v/v) foi adicionado à amostra e mantida à temperatura ambiente por 12 horas. A reação foi interrompida em banho de gelo. Os derivados alditol acetato resultantes foram extraídos com CHCl₃ após repetidas lavagens com solução de sulfato de cobre 5%. O extrato clorofórmico foi evaporado até a secura para posterior análise por GC-MS. (WOLFROM & THOMPSON, 1963a; WOLFROM & THOMPSON, 1963b).

3.5.5.2 Derivados per-O-Trimetilsililados (TMS)

A análise de composição monossacarídica e de ácidos graxos presentes nos LPS extraídos foi realizada através de derivados per-O-trimetilsilil glicosídeos (TMS). 200 – 500 µg de material liofilizado contendo LPS foram submetidos à metanólise por 18 h à 80°C utilizando 1 mL de MeOH anidro contendo 1 M de HCl. Após evaporação da solução com fluxo de nitrogênio, foi adicionado 1 mL de Ac₂O-piridina (1:1 v/v) e a reação foi deixada por 1 h à 100°C. O material foi então novamente seco em fluxo de nitrogênio e 500 µL de Tri-Sil foi adicionado. A reação foi mantida a 80°C por 20 min e o material seco novamente. Aos derivados TMS resultantes foram adicionados 2 mL de hexano, seguido por sonicação por 10 s para dissolver o material. As soluções foram então centrifugadas e o material solúvel foi seco em fluxo de nitrogênio para posterior análise por GC-MS.

3.5.5.3 Derivados Metil Ésteres de Ácidos Graxos (FAME)

Para a melhor análise da composição de ácidos graxos lineares e hidroxilados presentes nos LPS, 500 µg de material foram submetidos à metanólise com 1 mL de HCl 1 M em MeOH anidro por 18 h à 80°C. Posteriormente, o material foi

resfriado em banho de gelo e durante todo o processo as amostras foram mantidas a 4°C. Após evaporação do MeOH:HCl com fluxo de nitrogênio até cerca de 1/3 do volume total, foi adicionado 1 mL de CHCl₃ e o material foi lavado 3 vezes com 3 mL de solução saturada de NaCl, removendo-se a porção aquosa após cada lavagem. A fase orgânica foi então lavada outras 5 vezes com água deionizada para a remoção do sal residual, filtrada em filtro contendo sulfato de sódio anidro e posteriormente analisada em GC-MS.

3.5.5.4 Derivados Alditol Acetato Parcialmente Metilados (PMAA)

Para a formação dos alditol-acetatos parcialmente per-O-metilados (PMAAs), 2 mg do material foram solubilizados em DMSO, e NaOH anidro pulverizado foi adicionado em excesso. Adições de 0,1 ml de iodeto de metila (CH₃I) foram feitas a cada 5 min, durante 30 min, agitando-se o material em vortex (CIUCANU & KEREK, 1984). O material foi deixado por 12 h à temperatura ambiente, neutralizado com gotas de H₂SO₄ e os derivados per-metilados foram extraídos com CHCl₃. Posteriormente, o material foi submetido à metanólise com HCl 1M em MeOH por 2 horas a 80°C, seguido por neutralização com AgCO₃ e extração do sobrenadante com acetona (GORIN & IACOMINI, 1984). Após liofilização, o material foi submetido ao processo de acetilação como descrito, exceto pelo passo de redução que foi realizado com NaBD₄ (boridreto de sódio deuterado). Os derivados PMAA foram analisados por GC-MS segundo o tempo de retenção e perfil de elétron impacto típico (SASSAKI et al., 2005).

3.6 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS LPS POR DOC-PAGE

Para a análise do perfil eletroforético dos LPS extraídos, foi montado um gel de poliacrilamida 18% contendo 2 mL de Tris-Base (230 mg/mL), 6.0 mL de uma solução de acrilamida (30% p/v) e bis-acrilamida (0,8% p/v), e 2 mL de água deionizada. O gel de corrida foi polimerizado com 17,5 µL de persulfato de amônio (10% p/v) e 8,75 µL de TEMED. O gel de empilhamento foi montado na concentração final de 4% de poliacrilamida e continha 330 µL de uma solução de acrilamida (30% p/v) e bis-acrilamida (0,8% p/v), 500 µL de Tris-Base (77 mg/mL)

e 1,67 mL de água deionizada, polimerizado com 12,5 µL de persulfato de amônio (10% p/v) e 6,25 µL de TEMED. Antes da aplicação das amostras nos poços do gel, foi realizada uma pré-corrída de 20 min (30,0 mA, 400 V) utilizando o tampão de corrída contendo glicina (21,7 g/L), Tris-Base (4,5 g/mL) e ácido deoxicólico (DOC) (2,5 g/L). De uma solução estoque das frações contendo LPS (10 mg/mL), foram retirados 5 µL para serem solubilizados em 5 µL de tampão de amostra contendo Tris-Base (150 mg/mL), glicerol (100 µL/mL) e azul de bromofenol (250 µg/mL). 1 µL dessa solução foi então aplicada ao gel para a corrída de 45 min (30,0 mA, 400 V) (KOMURO & GALANOS, 1988).

Após a corrída, os géis foram imediatamente lavados em 100 mL solução de alcian blue (0,005% p/v em etanol 40% e ácido acético 5%) durante 12 h sob leve agitação constante (CORZO et al., 1991). Após rápido enxágue em água destilada, os géis foram oxidados em 100 mL de solução de periodato de sódio (0,7% p/v) por 10 min, e posteriormente submetidos à extensiva lavagem com água destilada (5 vezes de 20 min) para a remoção completa do periodato. Cada gel foi então imerso em solução de nitrato de prata (10% Bio-Rad silver) por 10 min, enxaguados com água destilada e revelados com Bio-Rad developer (57 mg/mL). A reação foi interrompida após 2-5 min com solução de ácido acético 5%, seguido por dois enxágües com água destilada (TSAI & FRISCH, 1982).

3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.7.1 Cromatografia de Camada Delgada

A porção lipídeo-A isolada dos LPS após hidrólise branda foi analisada por cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de alumínio revestida de sílica. As amostras foram diluídas em MeOH:H₂O (3:1 v/v) na concentração de 5 mg/mL e 10 µL foram aplicados na placa. O solvente de corrída utilizado foi CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH (40:25:4:2 v/v/v/v) (QUE et al., 2000) e as placas foram reveladas com solução etanólica de ácido sulfúrico 10% à 100°C por 5 min.

3.7.2 Cromatografia de Gel Filtração

3.7.2.1 Fracionamento de Oligossacarídeos em BioGel-P2

Os oligossacarídeos derivados da hidrólise parcial dos EPS foram fracionados em coluna de gel filtração BioGel-P2, utilizando água como eluente. A coluna (i.d. 10 mm x 120 cm) foi pré-equilibrada 3 volumes de água deionizada e o V_0 determinado com a aplicação de 0,5 mL uma solução de Blue Dextran (1 mg/mL). 10 mg do hidrolisado contendo oligossacarídeos foram solubilizados em 500 μ L de água deionizada para aplicação na coluna, que foi eluída num fluxo contínuo de 115 μ L/min. A eluição foi acompanhada por detector de índice de refração e registrador acoplado à um coletor de frações. As frações foram coletadas em tubos de ensaio a cada 15 min, sendo posteriormente combinadas de acordo com o perfil de eluição.

3.7.2.2 Fracionamento dos LPS em Sephacryl S-200 HR

Os LPS intactos extraídos nas frações fenólicas, foram submetidos à purificação por cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl S-200 HR, com fluxo constante de 230 μ L/min. A coluna (i.d. 10 mm x 120 cm) foi previamente equilibrada com tampão contendo deoxicolato de sódio (5 g/L), NaCl (24 g/L), EDTA dissódico (745 mg/L) e Tris-Base (2,42 g/L), ajustado em pH 9.2. Uma porção (10 mg) de material contendo LPS foi solubilizada em 500 μ L do mesmo tampão para aplicação na coluna. Após separação, frações foram submetidas à exaustiva diálise para a remoção do DOC em membrana de 3.500 Da de exclusão, primeiramente utilizando solução de EtOH:H₂O (1:9 v/v) contendo Tris (4,85 g/L) e NaCl (25 g/L), e posteriormente utilizando água deionizada. Todas as frações foram liofilizadas após diálise para posterior análise em DOC-PAGE.

3.7.2.3 Fracionamento os Oligossacarídeos em Sephacryl S-100

Frações contendo oligossacarídeos foram purificadas em coluna de gel filtração de Sephacryl S-100, utilizando formiato de amônio (50 mM), pH 7.0,

como eluente. Cada material (20 mg) foi solubilizado em 500 μL de água deionizada para aplicação na coluna (i.d. 10 mm x 120 cm) que foi eluída num fluxo contínuo de 115 $\mu\text{l}/\text{min}$. A eluição foi acompanhada por detector de índice de refração acoplado à coletor de frações. As frações foram coletadas em tubos de ensaio a cada 15 min, sendo posteriormente combinadas de acordo com o perfil de eluição.

3.7.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

Após conveniente derivatização do material, as amostras foram dissolvidas em acetona ou diclorometano e 1 μl foi injetado em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massa. Os derivados foram caracterizados segundo seu tempo de retenção e perfil de fragmentação por impacto de elétrons.

Para os derivados alditol acetato foi utilizado o cromatógrafo gasoso Varian (Saturn 2000) com coluna capilar DB-225, tendo hélio como gás de arraste, acoplado em série a um espectrômetro de massa *ion trap* Finnigan (modelo 810 R12) com varredura de massa entre 20 e 650 m/z e energia de geração de elétrons de 70 eV. A temperatura inicial de corrida é de 50°C com uma rampa de 40°C.min⁻¹ até 220°C, permanecendo constante até o final da análise. O mesmo equipamento foi utilizado para a análise dos PMAAs, exceto que a coluna utilizada foi DB-23.

Os derivados TMS e FAME foram analisados em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard (HP 5890 GC) utilizando coluna capilar DB-1, acoplado à um espectrômetro de massa *ion trap* (modelo 5970 MSD). As condições de corrida foram 50°C com rampa de elevação de temperatura de 20°C.min⁻¹ até 160°C, mantido por 2 min, subindo até 200°C (2°C.min⁻¹), e imediatamente elevando-se até 250°C (10°C.min⁻¹).

3.8 DINÂMICA MOLECULAR DO EPS PRODUZIDO POR *B. TROPICA* PPE8

3.8.1 Cálculo do Contorno de Energia dos Diedros Isolados da Estrutura

A análise de dinâmica molecular do EPS produzido por *Burkholderia tropica*, estirpe Ppe8, foi realizada com cada unidade dissacarídica da estrutura analisada individualmente de acordo com os ângulos de torção para verificar quais ângulos proporcionam a menor energia de ligação (em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Os gráficos foram gerados através da variação dos ângulos Φ e Ψ de 0° a 360° , em passos de 30° , seguidos de minimização de energia, no vácuo. A estabilidade relativa de cada conformação obtida foi baseada nos campos de força ffgmx do software GROMACS v.3.3.2 e utilizada para a construção dos gráficos de contorno energéticos através do servidor PRODRG2. Os cálculos iniciais foram realizados pelo software GAMESS (SCHMIDT et al., 2004). O mínimo de energia obtido para cada dissacarídeo foi utilizado como estrutura de entrada para a simulação em sistema solvatado em caixa cúbica contendo 5.000 moléculas de água a fim de verificar a influência do solvente sobre a geometria de cada ligação glicosídica. A distância das moléculas de água com a lateral do cubo foi determinado como 0,5 nm. Os valores para os ângulos Φ e Ψ foram obtidos em simulação com 10ns de duração.

3.8.2 Dinâmica do Pentassacarídeo Repetitivo da Estrutura

Os resultados e valores observados na dinâmica dos dissacarídeos isolados em solução aquosa foram para a simulação do EPS na forma de pentassacarídeo. Devido à presença de quatro ligações glicosídicas, duas das quais possuem dois mínimos de energia, foram realizadas simulações de quatro conformações pentassacarídicas diferentes encontradas na estrutura do EPS. As simulações foram realizadas com base nos campos de força do software GROMACS v.3.3.2 (VAN der SPOEL, et al., 2001). Os cálculos para o campo de força foram realizados pelo servidor PRODRG2. A combinação dos resultados foi utilizada para a criação de modelos tridimensionais das quatro configurações de pentassacarídeos avaliadas. A manipulação das estruturas foi realizada pelo

software MOLDEN. O estado conformacional para os anéis de todas as unidades foi considerado como sendo 1C_4 . A temperatura foi mantida constante a 310K em termostato acoplada a cada 0,1 ps durante a simulação. A constante dielétrica do meio foi determinada como $\epsilon = 1.0$.

3.9 “MATRIX ASSISTED LASER DESSORPTION IONIZATION TIME OF FLIGHT” – MALDI-TOF

Foram realizadas análises de espectrometria de massa nas frações contendo lipídeo-A e oligossacarídeos extraídos dos LPS e dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise parcial dos EPS. Para isso, foi utilizado um espectrômetro (MALDI) (Applied Biosystems Voyager-DE) acoplado a um analisador de tempo de voo (TOF). As amostras de lipídeo-A foram solubilizadas em MeOH:CHCl₃ (3:1 v/v) e misturadas na proporção de 1:1 com a matriz de cristalização 2,4,6-tetrahidroxi aceto fenona (THAP – 0,5M em MeOH). As análises foram realizadas em modo negativo refletivo. Para as frações contendo oligossacarídeos dos LPS e dos EPS, as amostras solubilizadas em água foram misturadas com a matriz de cristalização DHB (ácido 2,5-diidrobencóico 0,5M em MeOH) ou SDBH (ácido 2,5-diidrobencóico 0,5M + ácido 5-metoxisalicílico 10% em MeOH) e as análises foram realizadas no modo positivo refletivo. Alíquotas de 1,0 µL das amostras misturadas à matriz apropriada foram aplicadas em poços de placa de aço inoxidável para MALDI-TOF para a cristalização do material. O equipamento foi operado com uma voltagem de aceleração de 25 kV tempo de extração de 50 ns. As amostras foram ionizadas com laser de N₂ (337 nm) usando detector de sensibilidade de 1000 mV FS. Os espectros foram adquiridos em uma janela de 200 – 3000 *m/z*, e representam a média de 50 aquisições. Angiotensina I (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão de calibração (*m/z* 1296,5).

3.10 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. Cada amostra foi repetidamente solubilizada em D₂O 99,8% e liofilizada para a troca dos prótons intercambiáveis por deutério. Para a análise, o

material foi solubilizado em 400 μL de D_2O e colocado em tubos Shigemi (i.d. 5 mm x 150 mm). As análises foram realizadas à 30°C ou 70°C sendo utilizado o sinal de HOD como referência em δ 4,78 e δ 4,22 respectivamente. Experimentos unidimensionais de ^1H foram realizados com amplitude espectral de 8 kHz. Espectros de correlação homonuclear (COSY e TOCSY) foram adquiridos utilizando uma amplitude espectral de 2,25 kHz nas duas dimensões e um *dataset* ($t_1 \times t_2$) de 256 x 1024 pontos com 64 scans. Experimentos de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HMQC) foram realizados com amplitude espectral de 2,25 e 13,9 kHz para ^1H e ^{13}C respectivamente, e *dataset* ($t_1 \times t_2$) de 128 x 512 pontos com 32 scans. Após aquisição os dados foram processados utilizando o software Mest-Rec, versão 4.7.5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS E LPS

Para avaliar a capacidade de produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos por espécies dos gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum*, foram realizados experimentos de crescimento em placas contendo meio de cultura sólido (JMV ou NFb) acrescidos de calcofluor (200 µg/mL). Sendo este um corante fluorescente específico para polissacarídeos que contêm ligações β -1→4 ou β -1→3, as colônias que produziram maiores quantidade de EPS apresentaram uma maior intensidade de fluorescência quando as placas foram expostas à luz UV (365nm). A figura 10 mostra as placas após 24h de crescimento à 30°C e a intensidade de fluorescência de cada estirpe nos dois diferentes meios de cultura quando irradiadas com luz UV. O crescimento das estirpes do gênero *Herbaspirillum* foi favorecido nas placas contendo meio NfB malato sólido, enquanto que as estirpes de *Burkholderia* cresceram preferencialmente nas placas com meio JMV sólido. Todas as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram intensidade de fluorescência semelhantes nas placas contendo meio NFb malato. Dentre estas, foi possível observar que *H. seropedicae* SmR1 apresentou uma intensidade levemente maior de fluorescência. As estirpes de *H. rubrisubalbicans* apresentaram crescimento e intensidade de fluorescência similares àqueles observados para as estirpes de *H. seropedicae*, exceto por *Herbaspirillum* sp. BA15 que não cresceu em nenhum dos meios utilizados. As colônias de *Burkholderia tropica* Ppe8 e *Burkholderia [brasiliensis]* M130 também apresentaram fluorescência moderada quando crescidas em meio NFb malato. Nas placas contendo meio JMV, entretanto, estas duas estirpes destacam-se pela alta intensidade de fluorescência, promovida pela grande quantidade de EPS produzidos nestas condições.

Sabendo da influência de flavonóides na produção de exopolissacarídeos (EPS) (LIN et al., 1999) e lipoquitoligossacarídeos (LCO) (RHIJN & VANDERLEYDEN, 1995) em Rhizobiaceae, foram testados o efeito da adição de dois flavonóides (naringenina e quercitina) ao meio de cultura NFb líquido para observar o crescimento e a produção de EPS por *H. seropedicae* SmR1.

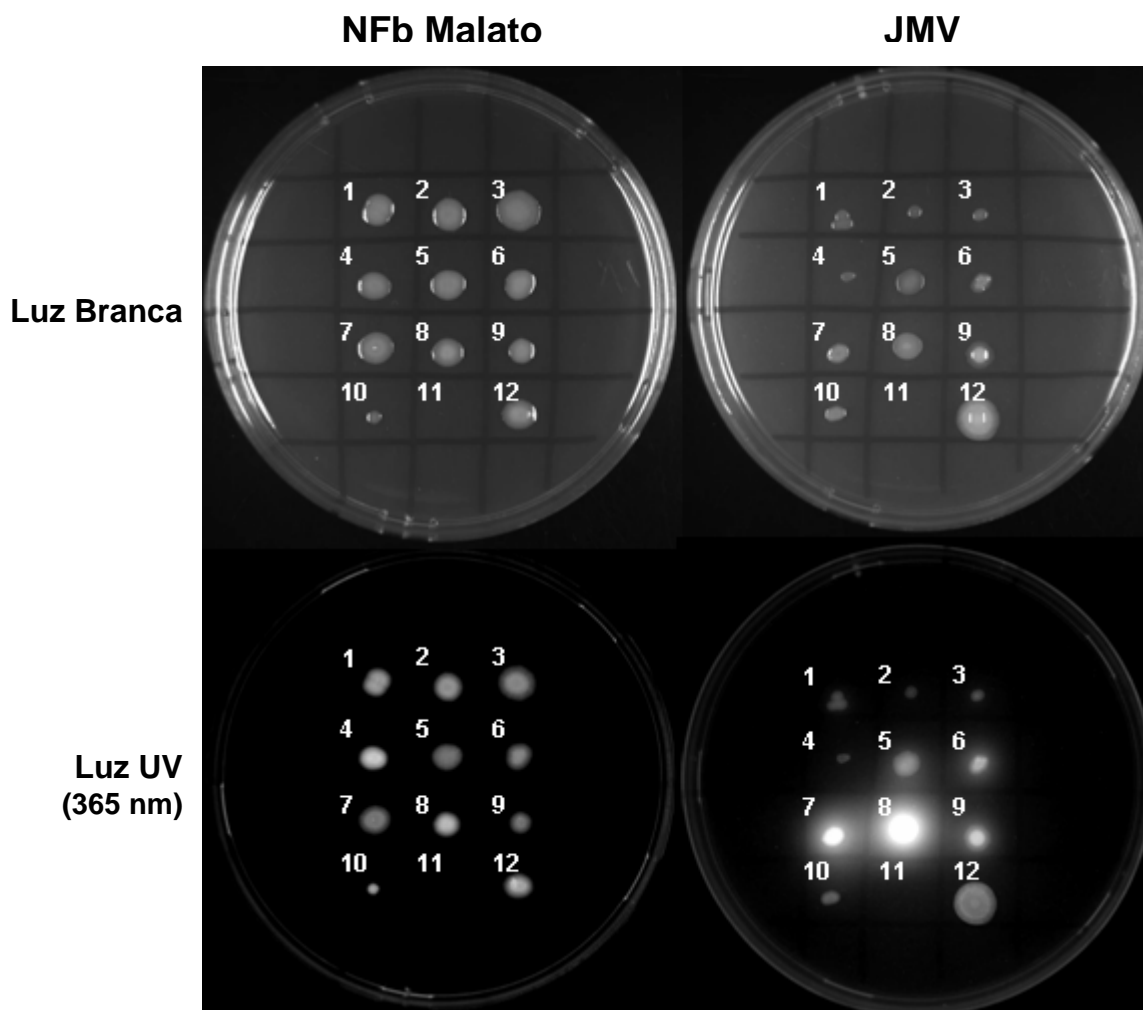


FIGURA 10. Crescimento de diazotrofos dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em placas contendo calcofluor (200 µg/mL). Legenda: **1)** *H. seropedicae* Z78; **2)** *H. seropedicae* ZA95; **3)** *H. seropedicae* M2; **4)** *H. seropedicae* SmR1; **5)** *H. seropedicae* ZA; **6)** *H. seropedicae* ZM152; **7)** *B. tropica* Ppe8; **8)** *B. [brasiliensis]* M130; **9)** *H. rubrisubalbicans* AB7; **10)** *H. rubrisubalbicans* M4; **11)** *Herbaspirillum* sp. BA15; **12)** *H. rubrisubalbicans* BA16.

As curvas de crescimento de *H. seropedicae* SmR1 na presença de diferentes concentrações de naringenina e quercitina mostraram-se bastante parecidas. A presença dos flavonóides no meio de cultura promoveu um modesto aumento no crescimento das células, uma vez que a densidade óptica das culturas ($D.O_{600}$) foi maior em todos os tempos observados conforme o aumento da concentração dos flavonóides.

Após centrifugação das células, os meios de cada cultivo contendo flavonóides foram analisados pelo método do fenol-ácido sulfúrico para a quantificação de açúcares totais. A concentração de carboidratos presentes nos meios aumentou em relação ao tempo de crescimento para todas as culturas observadas, entretanto, a presença de naringenina ou quercitina não interferiu na produção de EPS em nenhuma das concentrações utilizadas (FIGURA 11). O aumento da concentração de açúcares no meio de cultura segue relacionado diretamente ao crescimento celular, indicado pela D.O.₆₀₀ do meio de cultura, e também à morte celular que ocorre mais intensamente após 48 horas de cultivo, não sendo observada nenhuma relação significativa entre a quantidade de carboidratos totais encontrados no meio e a concentração dos flavonóides utilizada.

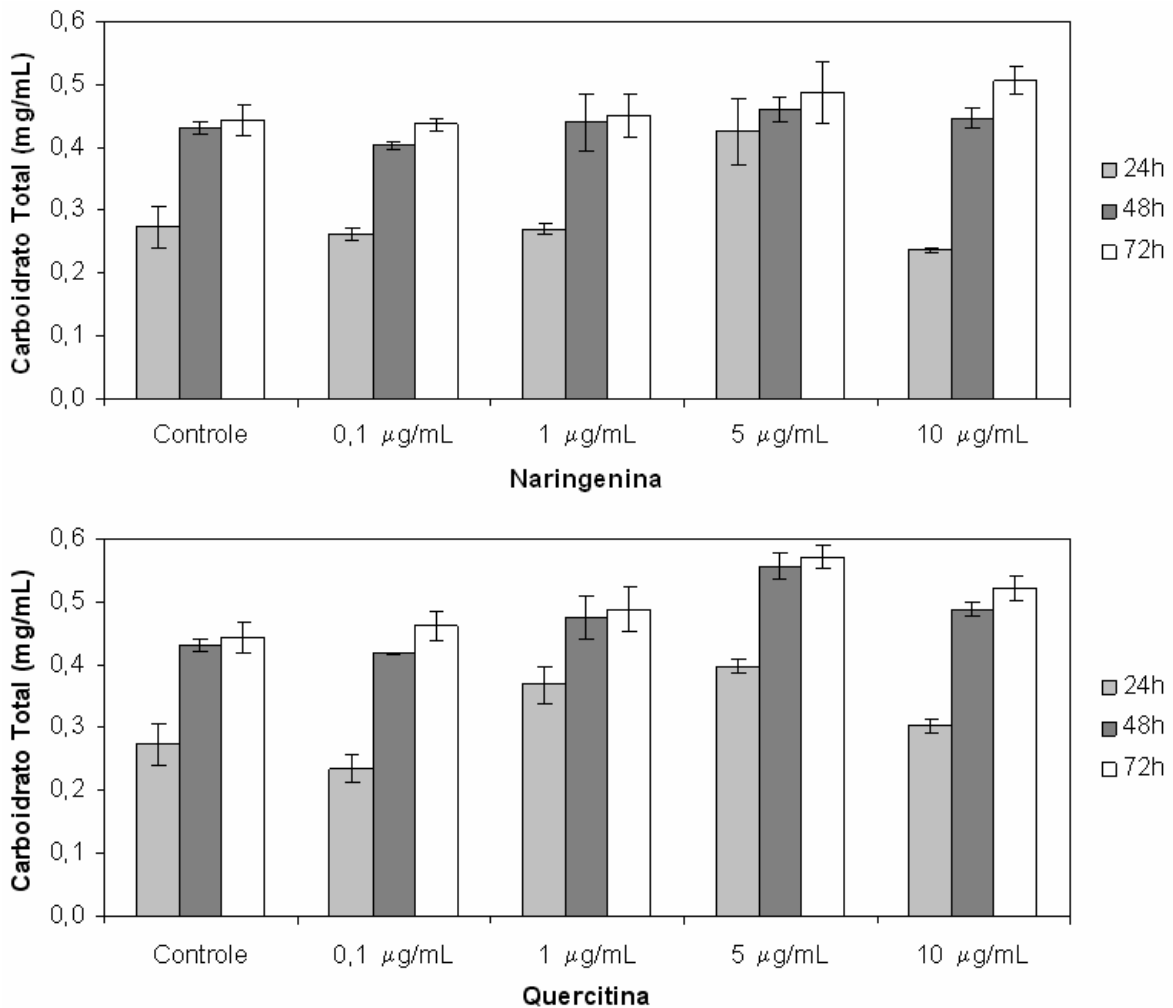


FIGURA 11. Efeito da concentração de flavonóides na produção de EPS por de *H. seropedicae* SmR1.

A composição dos monossacarídeos neutros presente no meio de cultura de várias estirpes de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foi avaliada após crescimento destas em meio NFb ou JMV por 48h à 30°C. Alíquotas foram retiradas das culturas e centrifugadas para a remoção das células. O meio foi então dialisado em membrana de 14 kDa para a obtenção de material de alta massa molecular. Os polissacarídeos retidos na diálise foram submetido à derivatização para a formação de alditol acetatos e análise por GC-MS. Esse tipo de análise determina somente os monossacarídeos neutros presentes em cada material, uma vez que derivados alditol acetato de unidades ácidas não podem ser analisados sob as condições descritas.

Foi observada uma grande heterogeneidade na composição monossacarídica obtida das diferentes estirpes. Dentre as estirpes de *H. seropedicae*, foi predominante a presença de glucose, em especial para a estirpe ZA que apresentou exclusivamente esse monossacarídeo em sua composição. A estirpe M2, contudo, apresentou grande quantidade de manose (~90%), além de galactose e glucose. A estirpe Z78, mostrou uma composição monossacarídica bastante complexa, mas com predomínio de Man, Gal e Glc, na razão molar de 2:2:3 respectivamente, enquanto que a estirpe SmR1 apresentou estas mesmas unidades na proporção de 7:3:10 respectivamente. As estirpes de *H. rubrisubalbicans* mostraram uma composição bastante diferenciada em relação àquelas de *H. seropedicae*. A presença de ramnose nas estirpes AB7, BA10 e BA16 foi observada, além de quantidades significativas de alose. A presença de glucose em todas as estirpes também pôde ser constatada. A estirpe M4 foi a única a apresentar fucose em sua composição, além de grande quantidade de manose (~58%). Duas espécies de *Burkholderia* foram analisadas, ambas apresentando composição monossacarídica semelhante com ramnose e glucose na razão molar de 1:1. Duas estirpes ainda não identificadas também foram analisadas segundo a composição monossacarídica presente no meio de cultura. A estirpe AB48 apresentou glucose, galactose, manose, alose e ramnose na proporção aproximada de 3:2:2:2:1:1 respectivamente. AB71 continha principalmente glucose e manose, apresentando galactose e rhamnose em menor quantidade (TABELA 05).

A maioria das estirpes analisadas apresentou baixa produção de material polissacarídico. Em algumas, o rendimento do material retido pela membrana de diálise foi de menos de 1,0 mg/L. A produção de EPS foi considerada significativa quando um litro de meio de cultura apresentava um rendimento superior a 100 mg de material retido pela membrana de diálise. A única estirpe de *H. seropedicae* que produziu material significativo foi M2, com um rendimento aproximado de 120 mg/L. As estirpes AB7, BA10 e BA16 de *H. rubrisubalbicans* apresentaram altos rendimentos de produção de EPS, todas acima de 350 mg/L em meio NFb malato. Ambas as estirpes de *Burkholderia* analisadas já haviam sido descritas como produtoras de EPS. Nesta avaliação, *B. [brasiliensis]* M130 teve um rendimento de 680 mg/L, enquanto que *B. tropica* PPe8 produziu 800 mg de material polissacarídico para cada litro de meio JMV utilizado. Os resultados obtidos nessa análise prévia foram utilizados na seleção das estirpes para a caracterização química dos EPS produzidos.

TABELA 05. Composição monossacarídica dos EPS produzidos por diazotrofos dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

Estirpes	Derivados Alditol Acetato (mol%)					
	Rha	Fuc	All	Man	Gal	Glc
<i>H. seropedicae</i>						
Z78	4,8	2,4	1,3	26,2	28,0	37,3
M2 *	-	-	-	90,5	4,8	4,7
ZA95	-	-	-	8,5	32,2	59,3
RAM4	-	-	-	36,8	14,9	48,3
<i>H. rubrisubalbicans</i>						
M4	-	6,9	-	57,6	13,4	22,1
AB7 *	30,1	-	32,5	-	2,9	34,5
BA10 *	28,7	-	15,7	-	26,2	29,4
BA15 †	0,6	-	18,7	28,5	22,3	29,9
BA16 *	30,2	-	15,1	-	23,9	30,8
HCC103	-	-	-	20,7	28,4	50,9
<i>B. [brasiliensis]</i>						
M130 *	48,4	-	-	-	-	51,6
<i>B. tropica</i>						
PPe8 *	50,5	-	-	-	-	49,5
Desconhecido						
AB71 *	7,9	-	-	37,0	8,6	46,5
AB48	11,5	-	11,4	23,1	22,1	30,9

* Estirpes que apresentaram produção significativa de EPS.

† Espécie indeterminada. Provável *H. rubrisubalbicans*.

A presença de lipopolissacarídeos na superfície celular de *H. seropedicae* SmR1 foi evidenciada através de microscopia de fluorescência. Um mutante dessa estirpe (RAM4) contendo um gene repórter que codifica para uma proteína vermelha fluorescente (DsRed) foi crescido em meio NFb malato contendo calcofluor (100 µg/mL). Após 24 h de crescimento à 30°C, uma alíquota da cultura foi montada em lâmina de microscopia e analisada em microscópio de fluorescência sob dois comprimentos de onda diferentes. A presença das células de *H. seropedicae* SmR1 foi determinada através de excitação do material com luz de comprimento de onda de 515 nm. O material complexado com calcofluor foi observado no mesmo campo óptico, porém com excitação do material com luz UV no comprimento de onda de 365 nm. As imagens obtidas em ambos os comprimentos de onda excitatório são mostradas na figura 12.

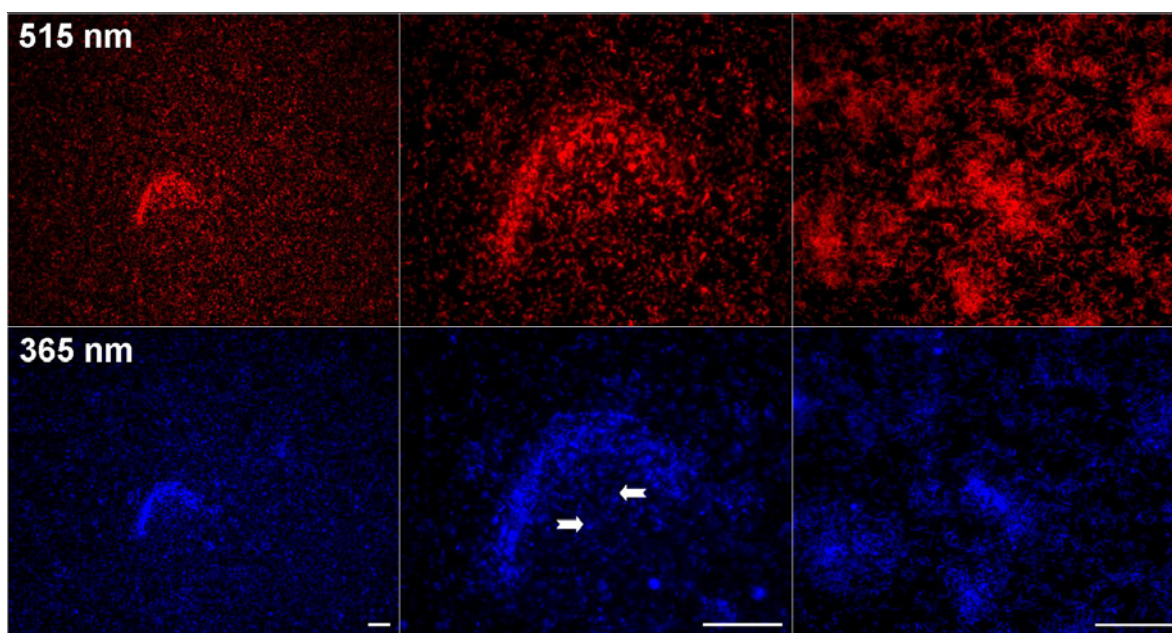


FIGURA 12. Microscopia de fluorescência de *H. seropedicae* SmR1 contendo uma proteína vermelha fluorescente (DsRed) após crescimento na presença de calcofluor (100 µg/mL). Barra = 20 µm.

A colocalização de fluorescência da proteína DsRed com o material complexado com o fluoróforo calcofluor white, sugere que há polissacarídeos na superfície das células de *H. seropedicae* SmR1, provavelmente proveniente das cadeias O-antígeno dos LPS, que são abundantes na superfície de células

gram-negativas. Contudo, foi possível observar um material amorfo entre as células complexando-se com o calcofluor (indicado pelas setas). Esse material pode ser indicativo de uma pequena quantidade de exopolissacarídeos liberados pelas células bacterianas no meio de cultura. A detecção dos LPS na membrana externa de *H. seropedicae* SmR1 levou à posterior extração destas moléculas para análises de composição química.

4.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS DE *B. TROPICA* PPE8

A estirpe Ppe8 do diazotrofo *Burkholderia tropica* foi previamente descrita como produtora de grandes quantidades de um EPS ácido quando cultivada em meio JMV contendo glutamato e manitol (SERRATO et al., 2006). A caracterização parcial do EPS mostrou que este é formado por unidades de Glc, Rha e GlcA (2:2:1) havendo ainda a presença de grupamentos O-acetil substituintes. Análises preliminares por ¹³C-RMN mostraram tratar-se de EPS formado por unidades pentassacarídicas repetitivas e a carboxi-redução do EPS revelou a presença de uma unidade de GlcA terminal não redutora ramificando a estrutura (SERRATO, 2004). Os resultados aqui demonstrados são complementares àqueles previamente descritos, e, juntos, fornecem a completa caracterização estrutural do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8.

A análise de composição monossacarídica do EPS ácido foi realizada por derivatização química para formar derivados alditol acetato (AA) e derivados per-O-trimetilsililados (per-O-TMS), seguido por análise em GC-MS. Os derivados AA revelaram a presença de Glc e Rha na razão molar de 1:1, enquanto que os derivados per-O-TMS revelaram a presença de Glc, Rha e GlcA na proporção de 2:2:1, respectivamente. A análise das ligações glicosídicas do EPS ácido através dos derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA) revelou a presença dos derivados 2,3,6-tri-O-metil-glucose, 2,4-di-O-metil-rhamnose e 3-O-metil-rhamnose, numa razão molar de 2:1:1 respectivamente. O derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucose foi encontrado como derivado PMAA do EPS após carboxiredução. A tabela 06 mostra a compilação dos dados de derivatização para o EPS ácido e carboxi-reduzido de *B. tropica* Ppe8. Os resultados obtidos através dos derivados per-O-TMS confirmam a presença de GlcA na estrutura

do EPS nativo, previamente observada através do aumento da razão molar de Glc dos derivados AA do EPS-CR.

TABELA 06. Composição monossacarídica e análise de ligação do EPS ácido e carboxi-reduzido (EPS-CR) de *Burkholderia tropica* Ppe8.

	Derivados						Ligação
	per-O-TMS ^a		Alditol Acetato ^b		PMAA ^c		
	EPS	EPS-CR	EPS	EPS-CR	EPS	EPS-CR	
Rha	1,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	3)-Rhap¹
Glc	2,0	1,5	1,0	1,5	1,1	1,1	2,4)-Rhap²
GlcA	1,0	-	-	-	2,0	2,2	4)-Glc³
						1,2	t-Glc⁴

Os valores são mostrados em razão molar relativa.

^a Os monossacarídeos foram analisados como derivados per-O-trimetilsilil-metil glicosídeos após metanólise e tratamento com TRI-SIL. ^b Derivados obtidos após hidrólise, redução com NaBH₄ e acetilação. ^c Derivados alditol acetato parcialmente O-metilados obtidos após metilação, seguida de metanólise, redução com NaBH₄ e acetilação.

As ligações indicadas são abreviações de: ¹ 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-rhamnitol; ² 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-rhamnitol; ³ 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-glucitol; ⁴ 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

Os dados de ressonância magnética nuclear previamente obtidos para este exopolissacarídeo não esclareceram a seqüência dos monossacarídeos na estrutura. Desta forma, o EPS ácido de *B. tropica* Ppe8 foi submetido à hidrólise parcial (TFA 1M; 30 min; 100°C) e fracionamento em BioGel-P2 (FIGURA 13) para a análise mais detalhada dos oligossacarídeos componentes da estrutura. O perfil da eluição mostrou quatro frações principais (I – IV), sendo a fração IV a de maior massa molar e, portanto, a primeira a ser eluída na coluna.

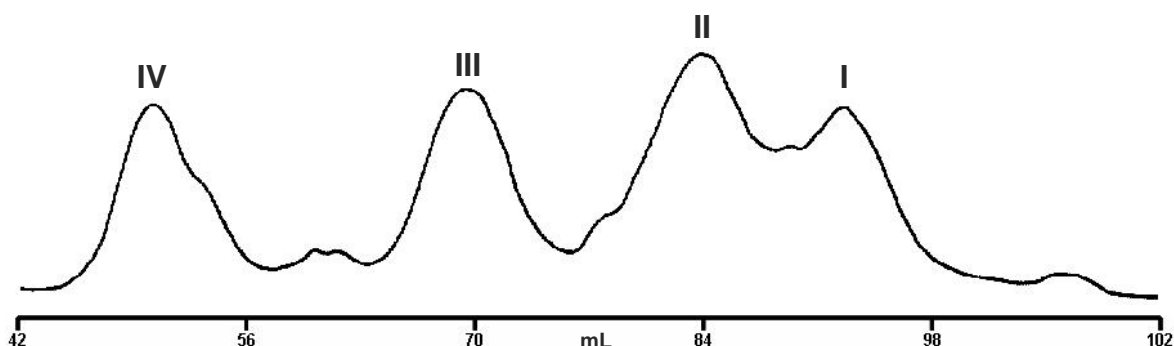


FIGURA 13. Perfil cromatográfico em BioGel-P2 dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8.

Cada fração foi submetida à análise de composição através dos derivados per-O-TMS, revelando que a fração IV apresentava Glc, Rha e GlcA na razão molar de 2:2:1 e, portanto, sendo provavelmente a fração que contém o pentassacarídeo repetitivo da estrutura do EPS. A composição encontrada para as frações III e II indicam que unidades de Glc e Rha estão sendo perdidas da estrutura respectivamente, uma vez que a proporção desses monossacarídeos é encontrada diminuída nestas frações. A fração I apresentou apenas Rha e GlcA numa razão molar de 1:1, sugerindo que essa fração seja formada por um ácido biurônico GlcA-(1→4)-Rha, como descrito previamente. Estes resultados foram confirmados pela identificação do derivado 2,3-di-O-rhamnitol como derivado único presente na fração I. A semelhança no padrão de derivados PMAA da fração IV em relação àqueles encontrados para o EPS nativo é outro indicativo de que esta fração é representativa da estrutura repetitiva do EPS. A presença de unidades de rhamnose monossustituídas em O-4 nas frações I, II e III, sugere que essa unidade é derivada das unidades 2,4-di-O-sustituídas presentes somente na fração IV. É provável que a unidade que substitua a rhamnose em O-2 seja uma glucose terminal, uma vez que o derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol aparece apenas na fração IV, não sendo encontrado em nenhuma das outras frações (TABELA 07).

TABELA 07. Composição monossacarídicas e análise de ligação glicosídica dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8.

	Derivados								Ligação
	per-O-TMS ^a				PMAA ^b				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Rha	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	30,9	26,3	3)-Rhap ¹
Glc	-	1,1	0,5	1,1	100	51,4	34,1	-	4)-Rhap ²
GlcA	1,1	1,0	0,5	0,5	-	48,6	35,0	27,1	4)-Glc ³
					-	-	-	24,5	2,4)-Rhap ⁴
					-	-	-	22,1	t-Glc ⁵

^a Os monossacarídeos foram analisados como derivados per-O-trimetilsilil-metil glicosídeos após metanólise e tratamento com TRI-SIL. Os valores são mostrados em razão molar relativa às unidades de Rha. ^b Derivados alditol acetato parcialmente O-metilados obtidos após metilação, seguida de metanólise, redução com NaBH₄ e acetilação. Os valores para os derivados alditol acetato estão representados em mol%.

As ligações indicadas são abreviações de: ¹ 1,3,5-tri-O-acetil-2,4-di-O-metil-rhamnitol; ² 1,4,5-tri-O-acetil-3-O-metil-rhamnitol; ³ 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-glucitol; ⁴ 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3-O-metil-rhamnitol; ⁵ 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol.

A mistura de oligossacarídeos obtida na hidrólise total foi submetida à análise por MALDI-TOF em modo refletivo positivo (FIGURA 14). O espectro obtido revelou a presença do sinal em m/z 833 (M5), referente ao pentassacarídeo repetitivo da estrutura do EPS e representado pelo íon $[\text{GlcA};\text{Rha}_2;\text{Glc}_2+\text{Na}]^+$. Os sinais encontrados em m/z 855 e m/z 875 são representativos do íon M5 na sua forma sua forma $[\text{M5}-\text{H}^++2\text{Na}]^+$ e $[\text{M5}+\text{OAc}]^+$, respectivamente. A perda de uma unidade de Glc da estrutura de M5 foi observada na diferença de 162 unidades de massa que deu origem ao sinal encontrado em m/z 671 (M4), sendo este atribuído ao íon do tetrassacarídeo $[\text{GlcA};\text{Rha}_2;\text{Glc}+\text{Na}]^+$. A presença de um grupamento O-acetil na estrutura de M4 também é observada pelo sinal em m/z 713. A forma di-sodiada de ambos os íons são encontradas em m/z 693 ($[\text{M4}-\text{H}^++2\text{Na}]^+$) e m/z 735 ($[\text{M4}+\text{OAc}-\text{H}^++2\text{Na}]^+$) respectivamente. O íon $[\text{GlcA};\text{Rha};\text{Glc}+\text{Na}]^+$, referente à M3, foi observado em m/z 525 e é originado da perda de uma unidade de Rha da estrutura de M4. Por conseguinte, a remoção de outra unidade de Glc gerou o íon M2 em m/z 363, sendo este um dissacarídeo ácido representado por $[\text{GlcA};\text{Rha}+\text{Na}]^+$. Não foram observadas as formas O-acetiladas dos íons M3 e M2, sugerindo que a unidade que contém este substituinte está presente nos oligossacarídeos correspondentes aos íons M4 e M5.

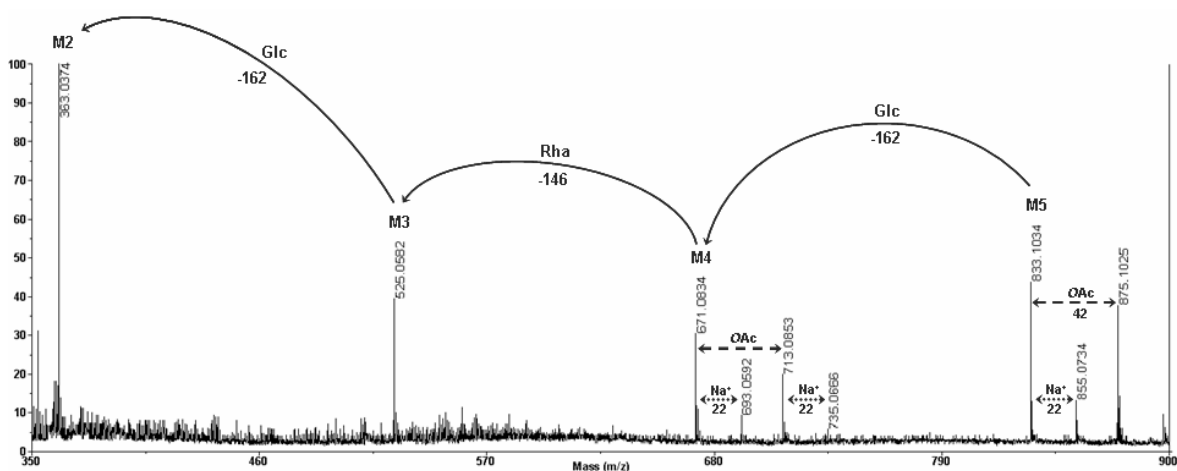
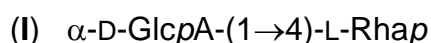
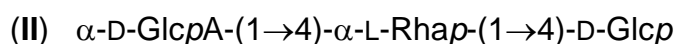


FIGURA 14. Espectro de massa MALDI-TOF modo positivo dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8. Matriz utilizada: DHB.

Cada fração oligossacarídica eluída na coluna BioGel-P2 foi submetida à análise por MALDI-TOF em modo refletivo positivo, revelando que as frações IV, III, II e I são correspondentes aos íons M5, M4, M3 e M2, respectivamente, comprovando os resultados das análises de metilação que sugeriam a presença de penta-, tetra-, tri- e dissacarídeos em cada uma das frações. Todas as frações foram analisadas por ^1H -RMN. A fração I apresentou um sinal característico de H-6 da unidade de rhamnose em δ 1.35, bem como os sinais do carbono anomérico redutor desta unidade na configuração α (δ 5.18) e β (δ 4.90). Os assinalamentos de todos os ^1H e ^{13}C desta estrutura foram determinados por HMQC. A correlação H4/C4 encontrada em δ 3.94/76.6 mostrou que a unidade terminal não redutora α -D-GlcAp encontrava-se ligada à unidade de rhamnose em O-4, como mostrado também pelas análises dos derivados PMAA. A estrutura do dissacarídeo encontrado na fração I é mostrada abaixo:

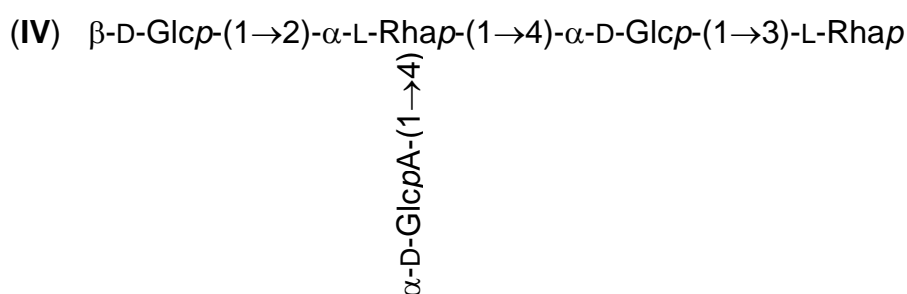
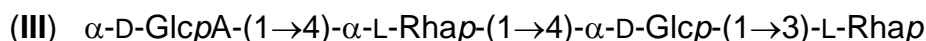


O espectro de ^1H -RMN obtido para a fração II confirmou a presença de um trissacarídeo devido à presença dos sinais na região anomérica encontrados em δ 5.19, 4.96 e 5.06/4.92, sendo os últimos representados pela configuração α e β de uma unidade de \rightarrow 4)-D-Glcp. O sinal em δ 1.29 foi atribuído à H-6 da unidade de rhamnose. As análises por HMQC, juntamente com os derivados PMAA obtidos para essa fração, permitiram determinar a estrutura deste trissacarídeo como sendo:



Ambas as frações III e IV apresentaram unidades de rhamnose como terminal redutor, como mostrado pelos sinais em δ 5.09/4.92 provenientes da configuração α e β desta unidade respectivamente. Entretanto, como mostrado nas análises de MALDI-TOF e de metilação, a fração III é formada por um tetrassacarídeo, enquanto a fração IV consiste de um pentassacarídeo. O espectro de HMQC de ambas as frações mostrou acoplamentos H6/C6 de duas unidades de rhamnose

em 1.31/17.1 e em δ 1.29/16.8 respectivamente. A fração IV apresentou unidades de β -D-Glcp ligadas à O-2 das unidades de rhamnose di-O-substituídas, como sugerido pela análise dos derivados PMAA, e confirmado pelo acoplamento $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ encontrado em δ 4.29/72.1. As estruturas dos oligossacarídeos presentes nas frações III e IV são mostradas abaixo:



Todos os assinalamentos obtidos para os oligossacarídeos são compatíveis com àqueles obtidos previamente (SERRATO, 2004) para o EPS ácido produzido por *B. tropica* Ppe8. A presença dos grupamentos O-acetil substituintes observados nos espectros de MALDI-TOF também foram detectados nas análises de RMN. As unidades monossacarídicas foram nomeadas de A até E para facilitar a representação e interpretação dos sinais. O espectro de TOCSY do EPS (FIGURA 15) mostrou que o sinal em δ 5.59 é referente à H-2 da unidade de β -L-Rhap 3-O-substituída, e que, portanto, quando O-acetilada, deve ser representada por \rightarrow 3)-[2-OAc]- β -L-Rhap (unidade D). Foi possível observar sinais de correlação entre o H-2 com os demais prótons desta unidade, como observado para H2/H1 (δ 5.59/5.02), H2/H3 (δ 5.59/4.16), H2/H4 (δ 5.59/3.87) e H2/H5 (δ 5.59/3.49). Os prótons anoméricos das unidades A e D, respectivamente *t*- α -D-GlcpA e \rightarrow 3)-[2-OAc]- β -L-Rhap, aparecem sobrepostos no espectro em δ 5.02. Alguns sinais de correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ também são encontrados para ambas as unidades. O sinal do próton anomérico da unidade 4-O substituída de β -D-Glcp (unidade E) foi observado em δ 4.62, e correlações deste próton com H2, H3 e H4 foram observadas em δ 4.62/3.28, δ 4.62/3.41 e δ 4.62/3.62, respectivamente. O sinais

do próton anomérico da outra unidade de Glc da estrutura (unidade C) foi observado em δ 4.96, apresentando as correlações H1/H2 (δ 4.96/3.74), H1/H3 (δ 4.96/3.45) e H1/H4 (δ 4.96/3.54). Os prótons correspondentes às ligações da unidade de α -L-Rhap 2,4-di-O-substituída (unidade B) apresentaram as seguintes correlações: δ 4.88/4.18 (H1/H2) e δ 4.88/3.99 (H1/H4).

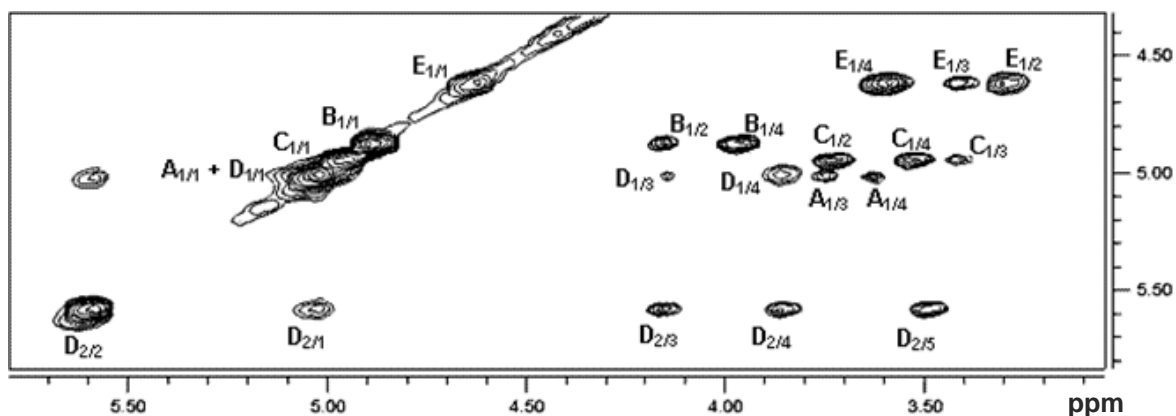
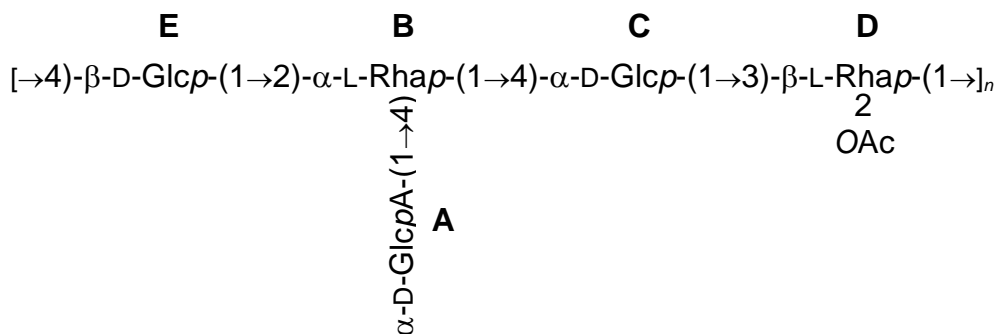


FIGURA 15. Espectro parcial de TOCSY mostrando correlações $^1\text{H}/^1\text{H}$ da região anomérica do EPS ácido produzido por *B. tropica* Ppe8. Unidades: **A** (*t*- α -D-GlcAp); **B** (\rightarrow 2,4- α -L-Rhap); **C** (\rightarrow 4- α -D-Glcp); **D** (\rightarrow 3-[2-OAc]- β -L-Rhap); **E** (\rightarrow 4- β -D-Glcp).

A compilação dos resultados mostrados aqui, em conjunto com aqueles previamente obtidos, possibilitou a determinação da estrutura repetitiva do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8 como sendo:



4.3. MODELAGEM MOLECULAR DO EPS PRODUZIDO POR *B. TROPICA* PPE8

Com a determinação da estrutura fina do exopolissacarídeo ácido produzido pela bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica* Ppe8, foi possível realizar ensaios de modelagem molecular *in silico* a fim de prever as possíveis variações conformacionais desta molécula em solução. A estrutura do pentassacarídeo repetitivo que forma o EPS é representada na figura 16.

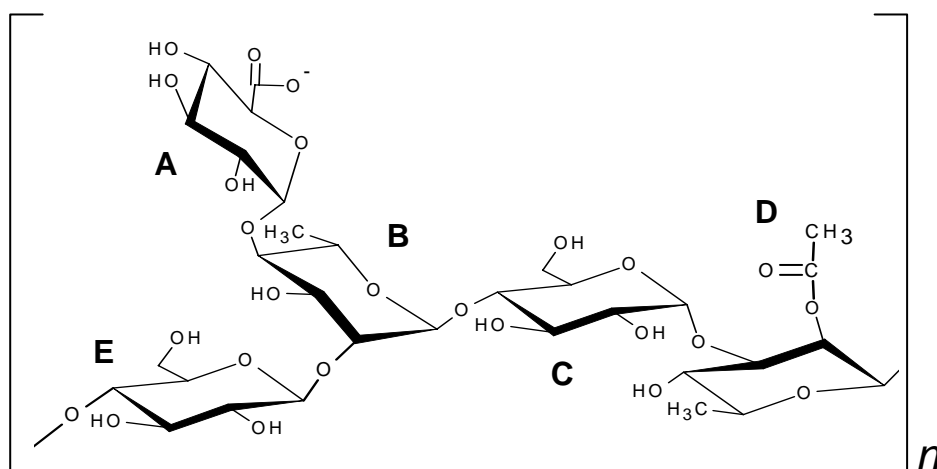
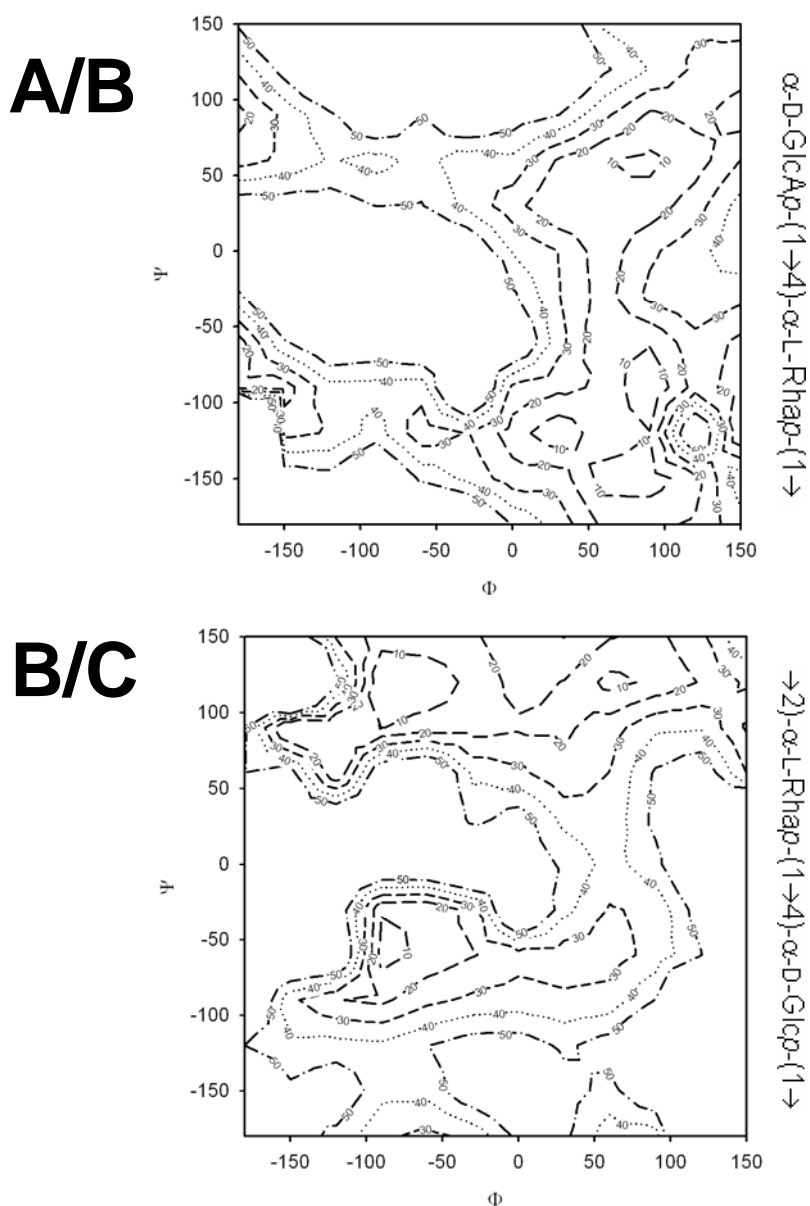


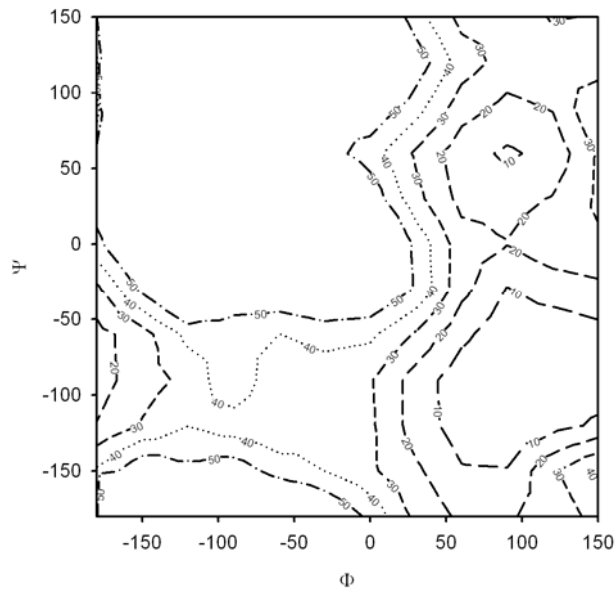
FIGURA 16. Estrutura do pentassacarídeo repetitivo que forma o EPS ácido produzido por *B. tropica* Ppe8. **A** (*t*- α -D-GlcAp); **B** (\rightarrow 2,4- α -L-Rhap); **C** (\rightarrow 4- α -D-Glcp); **D** (\rightarrow 3-[2-OAc]- β -L-Rhap); **E** (\rightarrow 4- β -D-Glcp).

O primeiro passo para a determinação da dinâmica estrutural do EPS foi dividir a estrutura da molécula em unidades dissacarídicas, a fim de determinar os ângulos de torção pré- (Φ) e pós- (Ψ) ligação glicosídica para cada ligação no vácuo, ou seja, sem a influência do meio. Desta forma, cada dissacarídeo foi analisado individualmente em ambos os ângulos de rotação que variaram de 0° a $\pm 150^\circ$ para verificar em quais pares de ângulos Φ/Ψ encontra-se a menor energia de ligação (até 50 kJ.mol^{-1}). Os gráficos de contorno de energia obtidos para cada ligação são mostrados na figura 18. Para a ligação glicosídica presente entre as unidades de α -D-GlcAp e α -L-Rhap (A/B), a configuração dos ângulos que apresentam menor energia foi de aproximadamente 75° para o ângulo Φ , enquanto que o ângulo Ψ apresenta dois mínimos de energia em -125° e 50° . O dissacarídeo \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow (B/C) apresentou três regiões

de baixa energia para Φ/Ψ , sendo a mais proeminente encontrada em $-80^\circ/115^\circ$. A configuração de ângulos Φ/Ψ da ligação glicosídica C/D que apresentou menor energia foi observada em $100^\circ/-100^\circ$, enquanto que para D/E, a configuração menos energética foi observada em 85° para Φ e 120° para Ψ . A ligação entre as unidades de β -D-Glcp e α -L-Rhap (E/B) parece ser a que apresenta maiores valores energéticos independente dos ângulos analisados. Apenas uma combinação de ângulos Φ/Ψ apresentou valores abaixo de 10 kJ.mol⁻¹, encontrada em $-85^\circ/-30^\circ$ respectivamente.

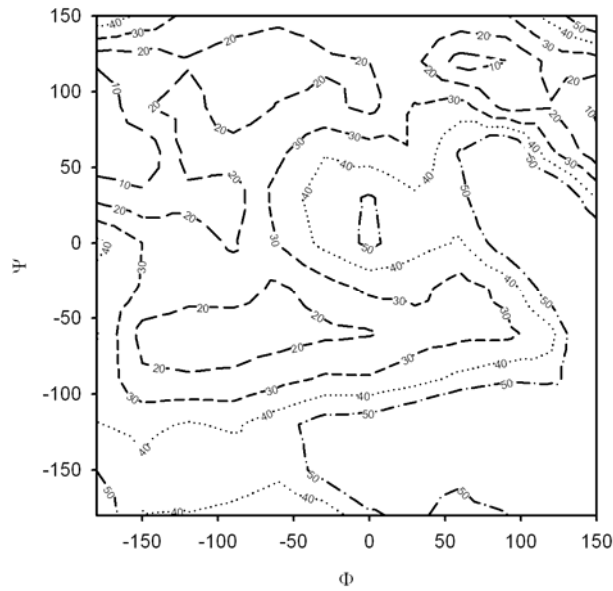


C/D



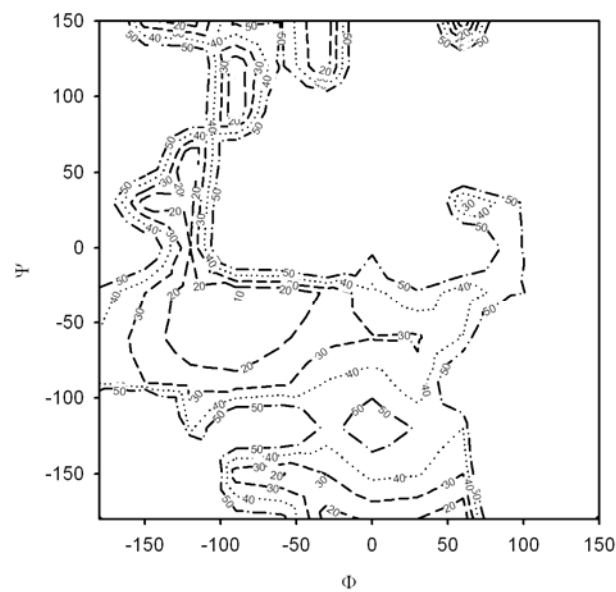
→4)- α -D-Glc_{pp}-(1→3)- β -L-[2OAc]-Rhap-(1→

D/E



→3)- β -L-[2OAc]-Rhap-(1→4)- β -D-Glc_{pp}-(1→

E/B

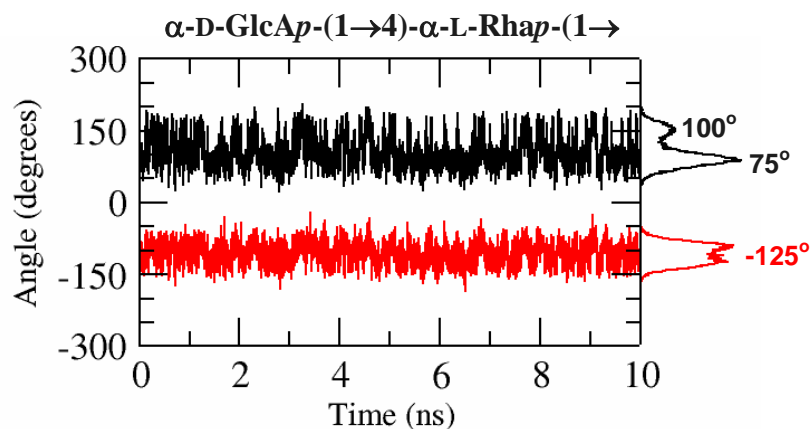


→4)- β -D-Glc_{pp}-(1→2)- α -L-Rhap-(1→

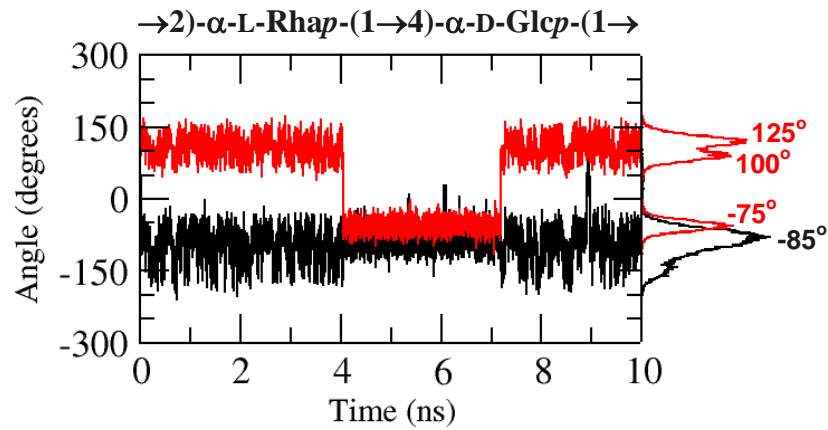
FIGURA 17. Gráficos de contorno de energia (kJ.mol^{-1}) dos ângulos de torção das ligações glicosídicas de cada dissacarídeo do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8.

Os dados obtidos nos gráficos de contorno de energia para as ligações glicosídicas no vácuo foram utilizados como parâmetros para a avaliação das energias de cada par de ângulos Φ/Ψ destas ligações em solução aquosa. Para isso, o comportamento dos ângulos foi avaliado durante 10 ns, utilizando a simulação dos dissacarídeos em um cubo de água (FIGURA 18). Os resultados obtidos desta análise foram compatíveis com àqueles observados nos gráficos de contorno de energia. Todas as ligações glicosídicas analisadas mostram que o ângulo pré-ligação (Φ) não sofre influência substancial do solvente. Por outro lado, os valores obtidos para o ângulo Ψ mostraram que a variação deste na presença da água é alta. Foi possível observar que para duas das ligações glicosídicas presentes na estrutura do EPS, B/C e D/E, são encontrados dois mínimos de energia para o ângulo Ψ ao longo do tempo. Após 4 ns de simulação, a média conformacional deste ângulo passou de 100° para -75° na ligação entre as unidades de α -L-Rhap e α -D-Glcp (B/C), o mesmo ocorrendo para a ligação D/E após 2 ns de simulação. Em ambos os casos, houve uma pequena variação nos valores dos ângulos Φ , aproximadamente de $+10^\circ$, durante período de variação observada para os ângulos Ψ , mostrando a influência de cada ângulo sobre o outro, bem como a flexibilização destas ligações quando a molécula encontra-se em solução.

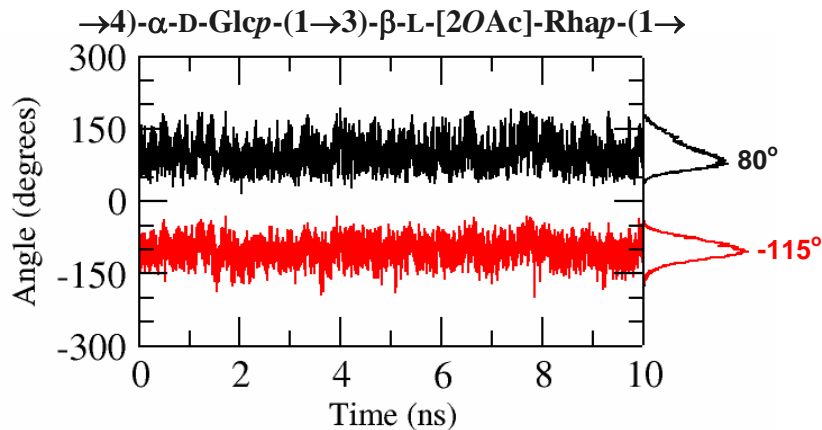
A/B



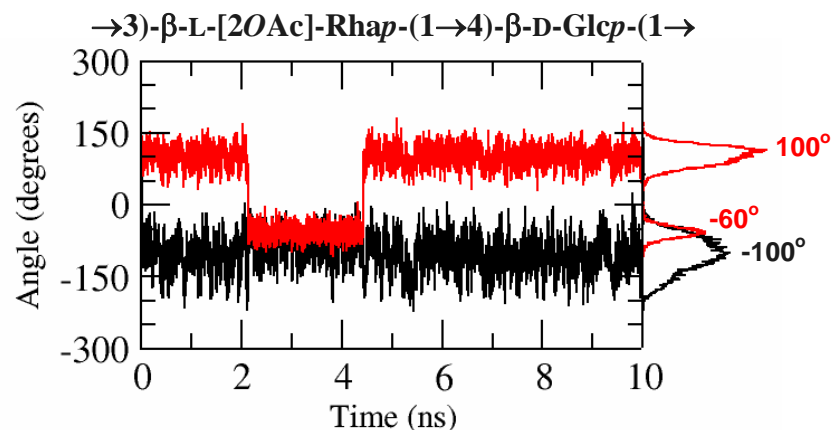
B/C



C/D



D/E



E/B

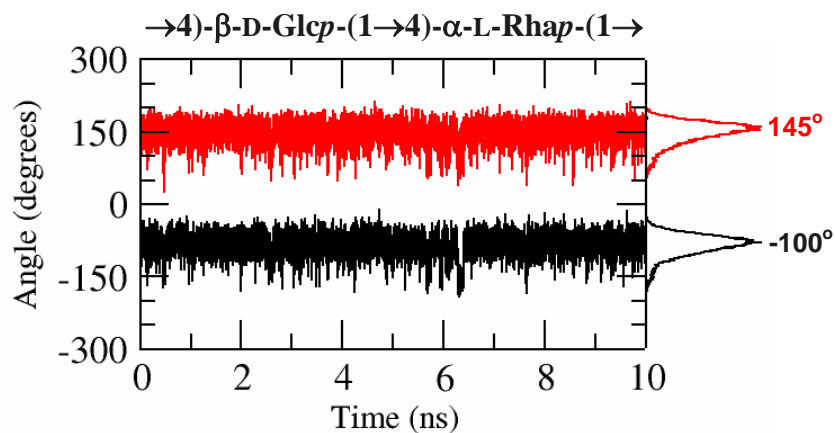


FIGURA 18. Avaliação da população dos ângulos de torção Φ (preto) e Ψ (vermelho) das ligações glicosídicas em cada dissacarídeo que forma o EPS em relação ao tempo de simulação em solução aquosa.

Os dados obtidos das análises individuais de cada ligação glicosídica foram utilizados como base para a simulação estrutural na forma de pentassacarídeo em solução aquosa. Entretanto, foi necessário realizar a análise de todos os ângulos através dos quatro confôrmeros possíveis do pentassacarídeo repetitivo da estrutura do EPS. A figura 19 mostra a comparação da população dos diedros Φ e Ψ obtidos durante a simulação de dinâmica molecular dos dissacarídeos isolados (vermelho) e dos quatro confôrmeros pentassacarídicos possíveis para a estrutura repetitiva do EPS de *B. tropica* Ppe8.

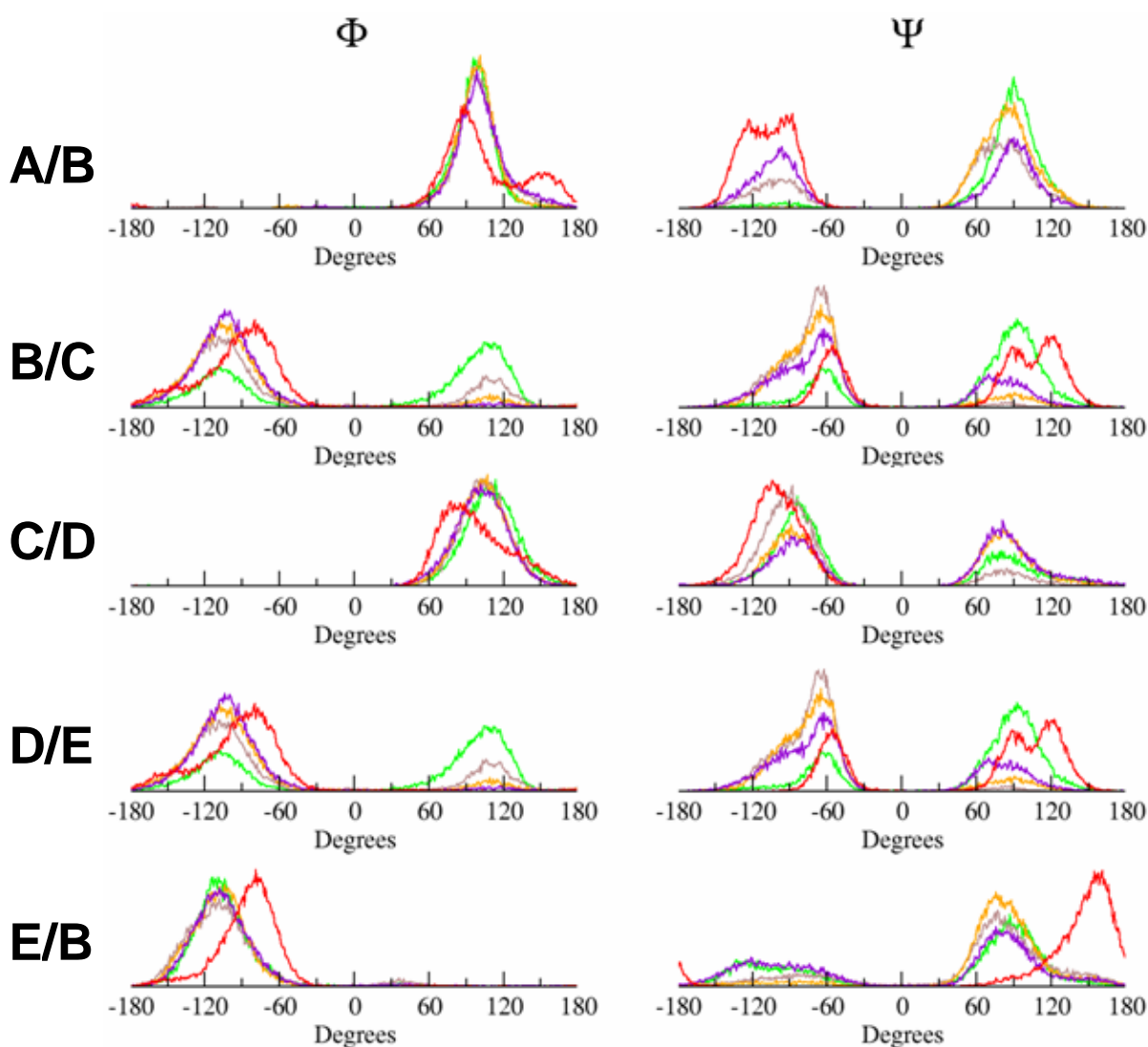


FIGURA 19. Comparação da população ângulos Φ e Ψ das ligações glicosídicas pelas simulações de dinâmica molecular dos dissacarídeos isolados (vermelho) e das quatro diferentes conformações simuladas do EPS na forma de pentassacarídeo (verde, marrom, laranja e roxo).

As quatro conformações pentassacarídicas utilizadas, apesar de possuírem estruturas de entrada distintas, apresentaram perfil de correlação angular semelhantes. Apesar disso, devido ao aumento de complexidade das estruturas durante a simulação, foi observada uma grande variação nos ângulos Φ e Ψ de cada ligação nos pentassacarídeos em relação aos dissacarídeos isolados. Essa alteração é bastante clara para o ângulo Ψ da ligação α -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow) (A/B), que aparecia em aproximadamente -100° no dissacarídeo isolado e foi observado em 90° para todos os confôrmeros pentassacarídicos analisados. Em contrapartida, o ângulo Φ das ligações A/B e C/D aparecem praticamente inalterados, independentemente do confôrmero analisado.

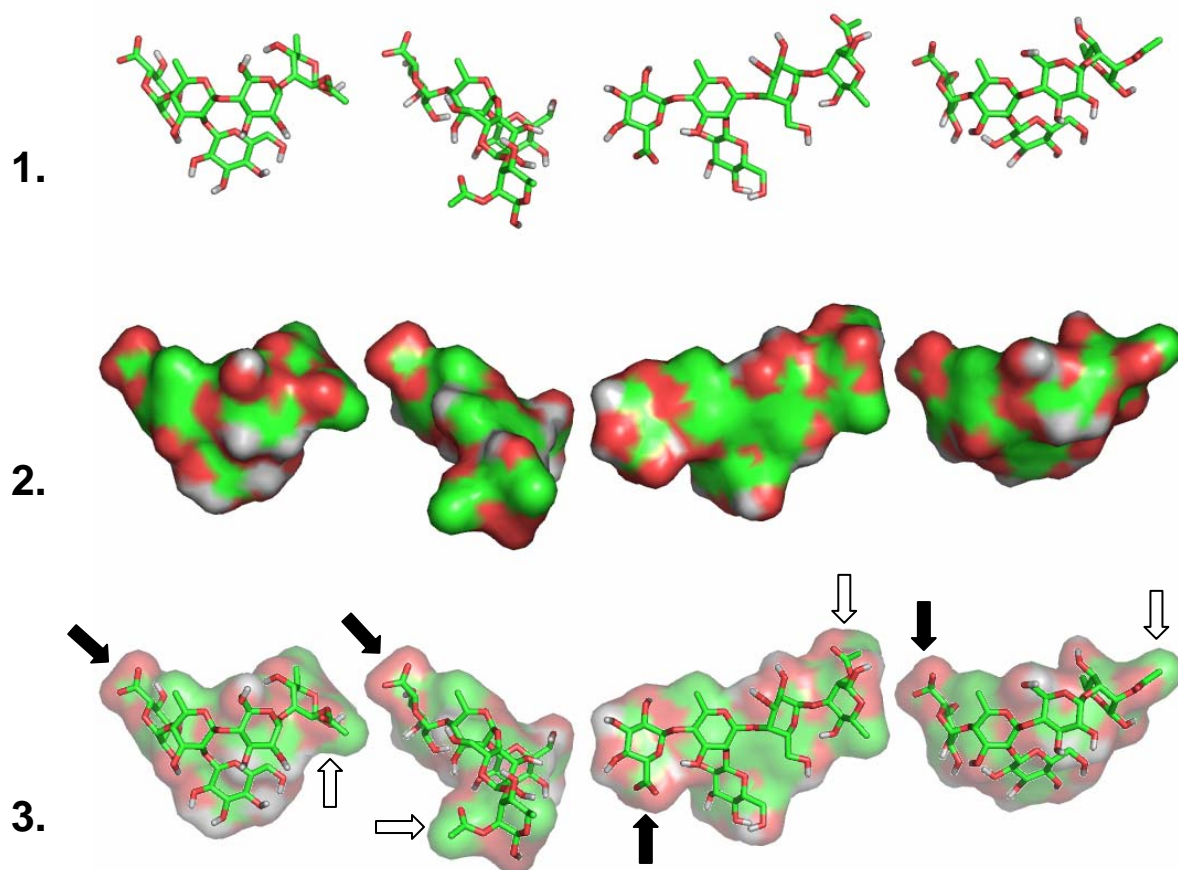


FIGURA 20. Estruturas geradas a partir da dinâmica dos diferentes confôrmeros possíveis para o pentassacarídeo repetitivo do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8. 1.) *Sticks*; 2.) Superfície eletrostática; 3.) Sobreposição da estrutura com a superfície. As setas cheias indicam a posição do grupamento carboxílico da unidade de GlcA. As setas vazias mostram a posição dos grupamentos OAc.

A análise conjunta dos dados obtidos para as diferentes conformações pentassacarídicas possíveis, combinadas com as análises de energia dos ângulos pré- e pós-ligação glicosídica (Φ e Ψ), permitiram a construção de modelos tridimensionais das quatro configurações isoladamente (FIGURA 20). A conformação de cada ângulo em cada uma das estruturas leva em conta a influência das unidades vizinhas, bem como a presença do grupamento O-acetil substituinte. Observa-se que em todos os casos a unidade não terminal de GlcA do EPS fica separada espacialmente uma vez que a carga eletrostática do grupamento carboxílico desta unidade afeta a interação com as demais. É possível que na distribuição espacial do EPS, que contém centenas dessas unidades pentassacarídicas repetitivas, haja unidades de GlcA ramificantes expostas para o meio. Da mesma forma, os grupamentos O-acetil substituintes aparecem destacadas em cada confôrmero. O esquema abaixo mostra três unidades pentassacarídicas ligadas (FIGURA 21). Fica claro que o posicionamento espacial das unidades de GlcA e dos grupamentos OAc pode ser importante para a função deste exopolissacarídeo numa possível interação com outras moléculas ou com superfícies do meio.

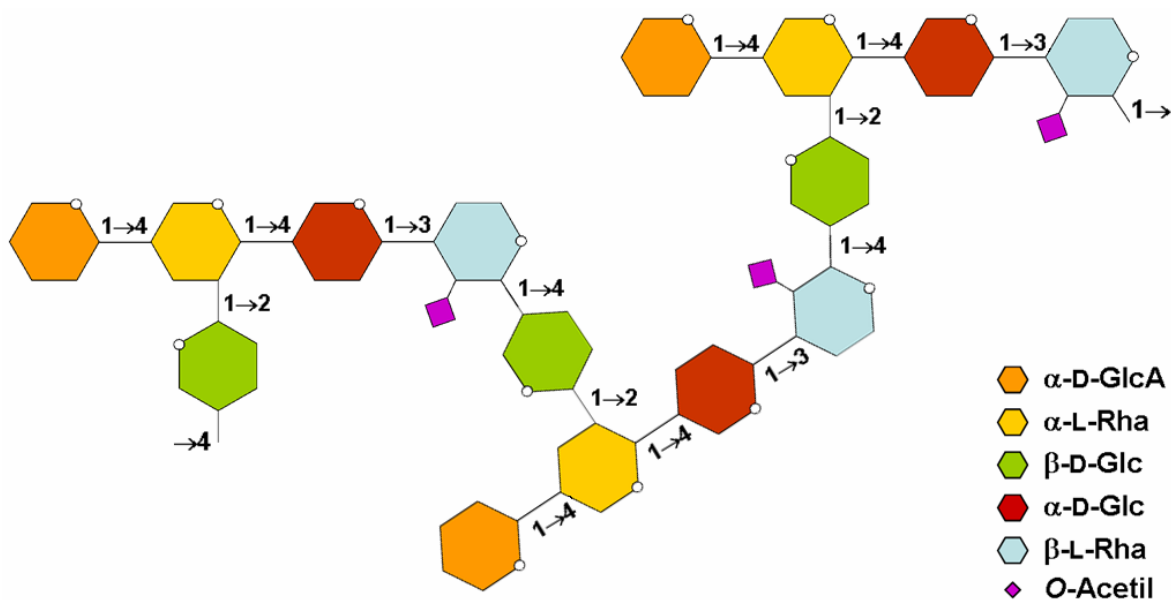


FIGURA 21. Representação esquemática do EPS de *B. tropica* Ppe8 contendo três unidades pentassacarídicas repetitivas.

4.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EPS DE *H. RUBRISUBALBICANS* AB7

A estirpe AB7 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi originalmente isolada de *Ananas* sp. (abacaxizeiro) e produz quantidades significativas de um exopolissacarídeo neutro como relatado anteriormente. A composição monossacarídica deste EPS apresentou principalmente Glc, All, Gal e Rha na razão molar aproximada de 3:3:2:2, respectivamente. Este EPS mostrou-se parcialmente insolúvel, principalmente após o processo de liofilização. Desta forma, o material que se encontrava insolúvel em água foi removido por centrifugação e o material solúvel foi analisado separadamente. Os resultados de metilação para este EPS (TABELA 08) mostraram que os principais derivados PMAA presentes foram 2,3-Me₂-Rha (27,4%), 2,3,4,6-Me₄-Glc (24,1%) e 2,3,6-Me₃-All (25,6%). Apenas uma pequena porcentagem de uma unidade di-O-substituída foi encontrada para o derivado 2-Me-Rha (2,4%).

TABELA 08. Análise de ligação glicosídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7

PMAA ^a	EPS solúvel (%)	Ligação
2,3,4-Me ₃ -Rha	2,8	<i>t</i> -Rhap-(1→
2,3-Me ₂ -Rha	27,4	→4)-Rhap-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	24,1	<i>t</i> -Glc <i>p</i> -(1→
2,3,4,6-Me ₄ -All	2,7	<i>t</i> -All <i>p</i> -(1→
2-Me-Rha	2,4	→3,4)-Rhap-(1→
2,3,6-Me ₃ -All	25,6	→4)-All <i>p</i> -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	8,7	→4)-Gal <i>p</i> -(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	6,2	→4)-Glc <i>p</i> -(1→

^a Derivados alditol acetato parcialmente O-metilados. Valores representados em mol%.

A figura 22 mostra o espectro de ¹³C-RMN e de DEPT-135 do material solúvel após centrifugação. É possível observar os sinais característicos de CH₃-6 das unidades de Rha em δ 17.3. Substituições por grupamentos O-acetil foram identificadas pelos sinais encontrados em δ 20.9 (-CH₃) e δ 174.2 (-C=O). A análise de DEPT mostrou que os C-6 das unidades de Glc e All encontram-se livres (δ 61.1 e 61.5), como previamente demonstrado pelas análises de

metilação. Cinco sinais foram observados na região anomérica, δ 95.6, 96.2, 100.5, 101.6 e 104.1.

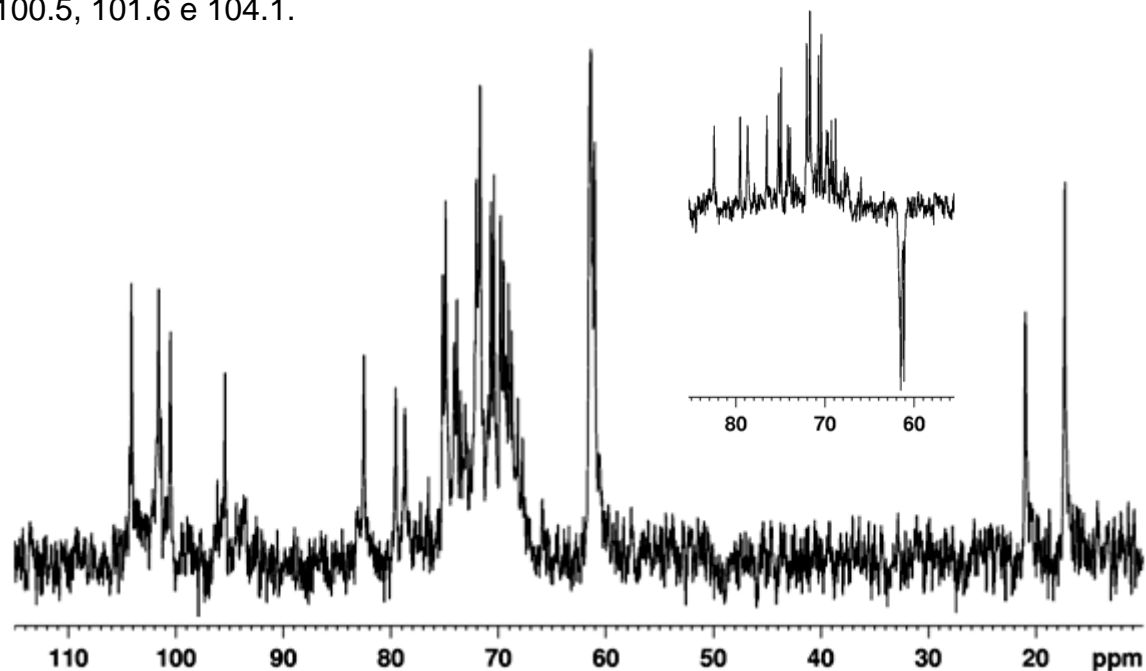


FIGURA 22. ¹³C-RMN do EPS solúvel produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7. O inserto mostra o espectro parcial de DEPT-135.

A partir do espectro de ¹H-RMN do EPS solúvel foi possível observar novamente os sinais característicos de CH₃-6 das unidades de Rha (δ 1.21) bem como os sinais do grupamento -CH₃ dos substituintes O-acetil (δ 2.19, 2.22, 2.25) (FIGURA 23).

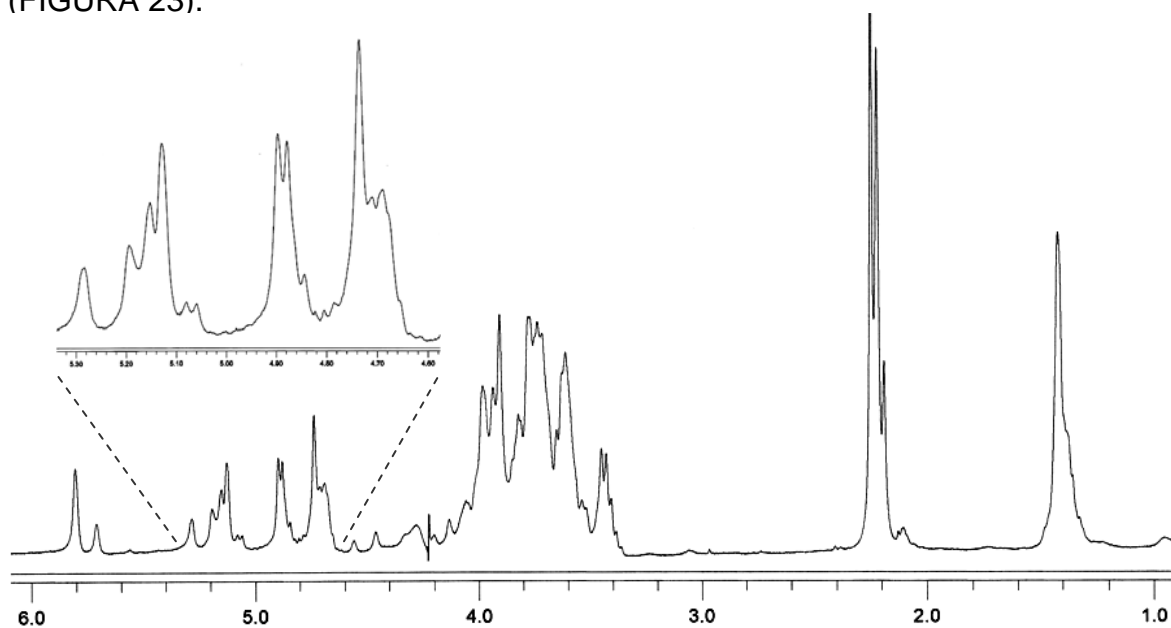


FIGURA 23. ¹H-RMN do EPS solúvel produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7.

Os sinais encontrados em δ 5.86 e δ 5.91 no espectro de ^1H -RMN do EPS solúvel produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7 foram atribuídos aos prótons do anel das unidades monossacarídicas aos quais se ligam os substituintes *O*-acetil, uma vez que estes sinais apresentaram acoplamentos $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ em δ 5.86/70.0 e δ 5.91/70.1. A região anomérica apresentou-se bastante complexa no espectro de ^1H -NMR. Entretanto, os acoplamentos $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ nesta região do espectro de HMQC apareceram bem definidos em δ 5.29/95.6, 5.12/96.2, 4.73/100.5, 4.88/101.6 e 4.69/104.1 (FIGURA 24).

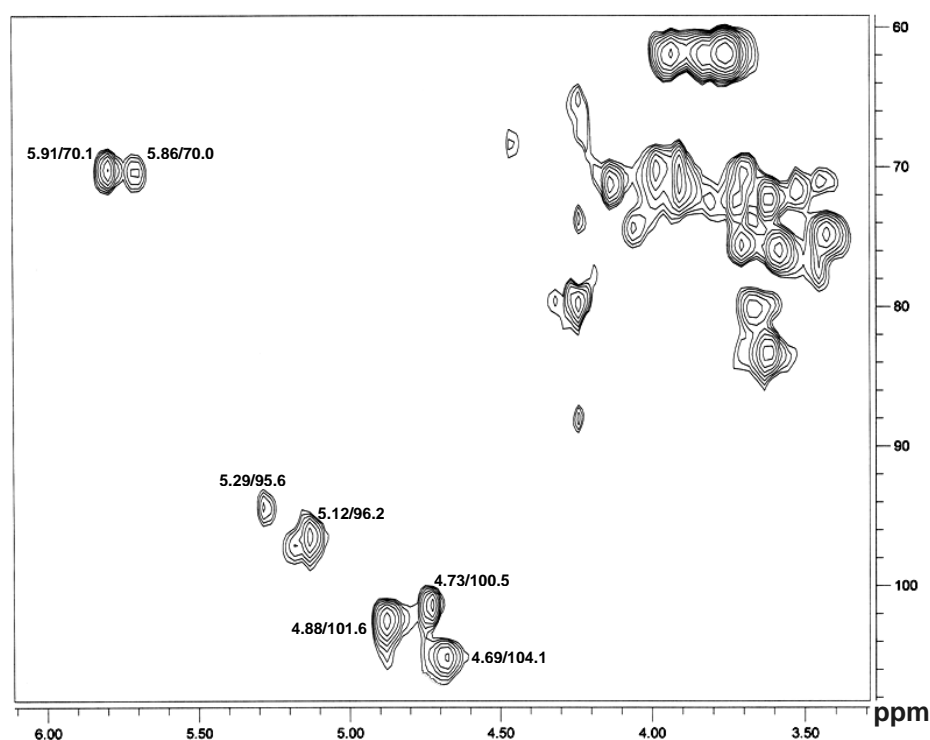


FIGURA 24. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC do EPS solúvel produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7.

As demais análises estruturais para o EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7 foram realizadas a partir dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS (TFA 1M, 30 min, 100°C). Após o processo de hidrólise, a mistura de oligossacarídeos foi submetida à análise por MALDI-TOF em modo positivo (FIGURA 25). É possível observar a presença de grupamentos *O*-acetil substituintes na estrutura (diferença de m/z 42), bem como as unidades de Rha (m/z 146) e de hexoses (m/z 162). A diferença encontrada entre os íons m/z 997 e m/z 673 indica a perda de um dissacarídeo formado por duas hexoses (m/z 324).

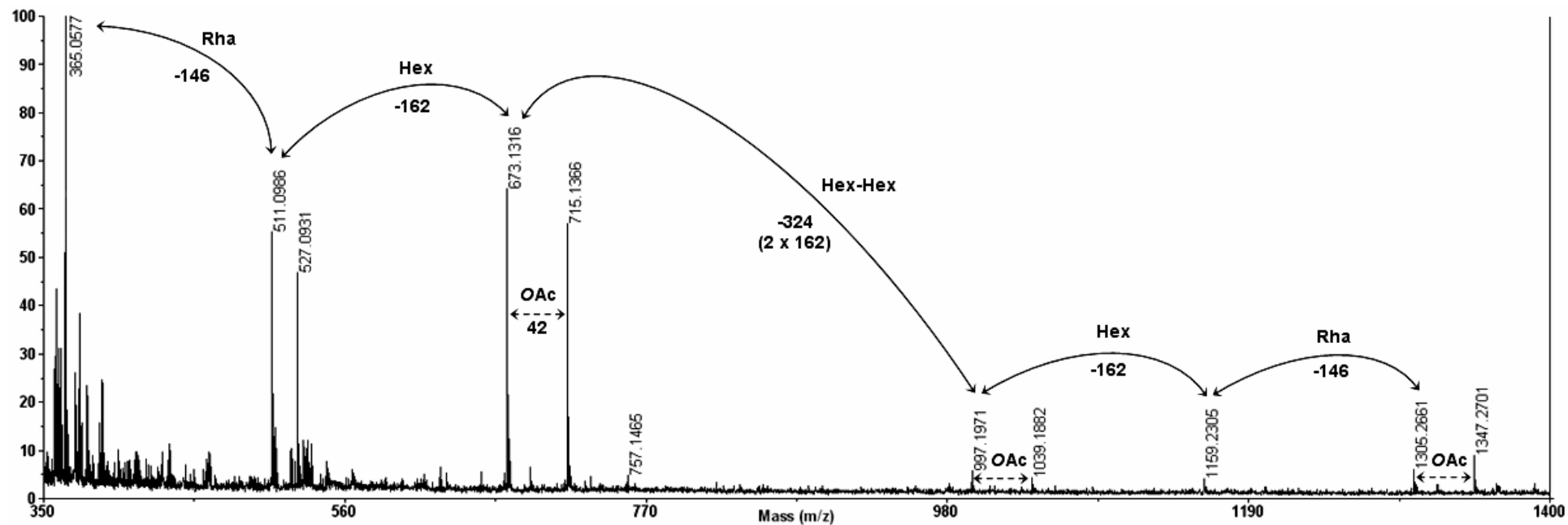
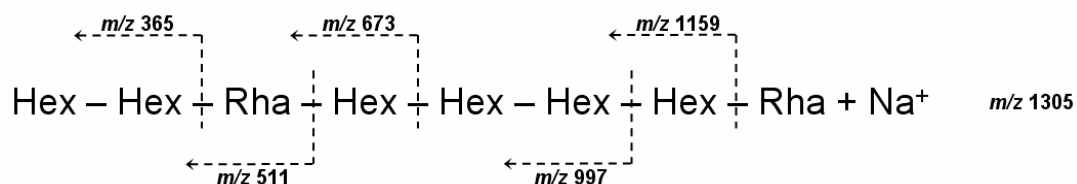


FIGURA 25. Espectro de MALDI-TOF em modo positivo dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7. Hex = Glc ou All. Matriz utilizada: DHB.

A análise do espectro de MALDI-TOF da mistura dos oligossacarídeos obtidos do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7, revela a presença de uma possível unidade pentassacarídica repetitiva. O íon encontrado em m/z 1305 é referente ao oligossacarídeo $[\text{Rha}_2;\text{Hex}_6 + \text{Na}]^+$, onde as unidades de Glc e All são definidas simplesmente como hexoses (Hex). Este oligossacarídeo pode ainda apresentar-se na forma O-acetilada, devido à presença do íon em m/z 1347, representativo de $[\text{Rha}_2;\text{Hex}_6\text{-OAc} + \text{Na}]^+$. A perda de uma unidade de Rha para formar o íon $[\text{Rha}_2;\text{Hex}_6\text{-OH} + \text{Na}]^+$, encontrado em m/z 1159, mostra que esta unidade encontra-se na extremidade do oligossacarídeo original. A seqüência do oligossacarídeo obtida a partir dos íons no espectro de MALDI-TOF pode ser representada pelo esquema de fragmentação abaixo:



O material parcialmente hidrolisado resultante foi submetido à eluição com água em coluna BioGel-P2 para a separação dos oligossacarídeos, que foram coletados em seis frações (FIGURA 26), sendo que as frações II, III e IV tiveram um perfil de eluição mais homogêneo e, portanto, foram selecionadas para as análises de estrutura do EPS.

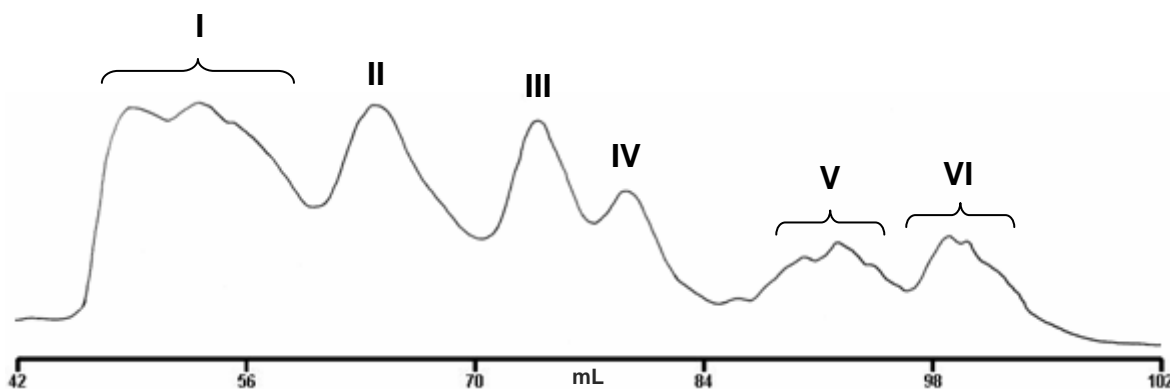


FIGURA 26. Perfil cromatográfico em BioGel-P2 dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7.

A composição monossacarídica destas frações foi determinada por GC-MS através dos derivados alditol acetado e per-O-TMS glicosídeos (TABELA 09). As frações II e III apresentaram Rha, Glc e All em sua composição numa razão molar aproximada de 1:1:1, além de apresentar também uma pequena porcentagem de Gal. A fração IV apresentou pouca Gal em sua composição, sendo que as demais unidades de Rha, All e Glc foram observadas na razão molar de 1:2:3 respectivamente.

TABELA 09. Composição monossacarídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7.

	Derivados					
	Alditol Acetato ^a			Per-O-TMS ^b		
	II	III	IV	II	III	IV
Rha	31,4	30,5	16,1	1,0	1,0	1,0
All	31,2	36,9	29,8	1,0	1,2	1,9
Gal	7,7	4,8	3,7	0,3	0,3	0,3
Glc	29,7	27,8	50,4	0,9	0,9	3,2

^a Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise, redução com NaBH₄ e acetilação. Os valores para os derivados alditol acetato estão representados em mol%. ^b Os monossacarídeos foram analisados como derivados per-O-trimetilsilil-metil glicosídeos após metanólise e tratamento com TRI-SIL. Os valores para os derivados per-O-TMS glicosídeos são representados em razão molar relativa às unidades de Rha.

A análise de ligação glicosídica da fração II, realizada a partir dos derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA), mostrou a presença dos derivados 2,3-Me₂-Rha, 2,3,6-Me₃-All, 2,3,6-Me₃-Gal e 2,3,6-Me₃-Glc na razão molar aproximada de 2:2:2:1, além de pequenas quantidades de terminais de Rha (2,1%) e Glc (8,0%). Para a fração III foram encontradas unidades de All e Gal 4-O-substituídas, além de 4-O-rhamnosil e terminais de Glc na razão molar de 3:3:2:2. Os principais derivados PMAA encontrados na fração IV foram 2,3-Me₂-Rha, 2,3,4,6-Me₄-Glc, 2,3,6-Me₃-All e 2,3,6-Me₃-Gal numa razão molar de aproximadamente 1:1:1:1 (TABELA 10).

TABELA 10. Análise de ligação glicosídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7

PMAA ^a	Frações BioGel-P2 (%)			Ligação
	II	III	IV	
2,3,4-Me ₃ -Rha	4,1	2,0	3,4	<i>t</i> -Rhap-(1→
2,3-Me ₂ -Rha	26,7	31,3	45,4	→4)-Rhap-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	11,0	17,5	22,9	<i>t</i> -Glc ρ -(1→
2,3,4,6-Me ₄ -All	-	3,1	2,2	<i>t</i> -All ρ -(1→
2-Me-Rha	4,1	6,1	-	→3,4)-Rhap-(1→
2,3,6-Me ₃ -All	29,2	23,8	23,6	→4)-All ρ -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	6,1	1,9	-	→4)-Gal ρ -(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	18,8	14,3	2,5	→4)-Glc ρ -(1→

^a Derivados alditol acetato parcialmente O-metilados.
Valores representados em mol%.

As três frações foram submetidas à análise de ¹H-RMN (FIGURA 27). Em todos os espectros foram observados os sinais de CH₃-6 das unidades de Rha. As frações II e III apresentaram uma alta complexidade de sinais na região anomérica, bem como a presença de dois sinais característicos de substituição por O-acetil em δ 2.08 e δ 2.11. Ambas também apresentaram dois sinais em campo baixo (δ 5.87 e δ 5.92) atribuídos aos prótons do anel glicosídico onde se ligam os grupamentos O-acetil. O espectro da fração IV apresentou uma melhor resolução e uma menor complexidade de sinais anoméricos além de apresentar apenas um sinal de substituição por O-acetil. Esta fração apresentou dois sinais anoméricos em δ 4.69 e 4.88 com constantes de acoplamento de aproximadamente 7.1 Hz, sugerindo a presença de unidades de β -D-Glc ou β -D-All. O sinal encontrado em δ 4.92 foi atribuído à unidades de α -L-Rha, enquanto que os sinais que aparecem em δ 5.16 e 5.21 podem ser correspondentes à unidades de α -D-Glc β -L-Rha, respectivamente.

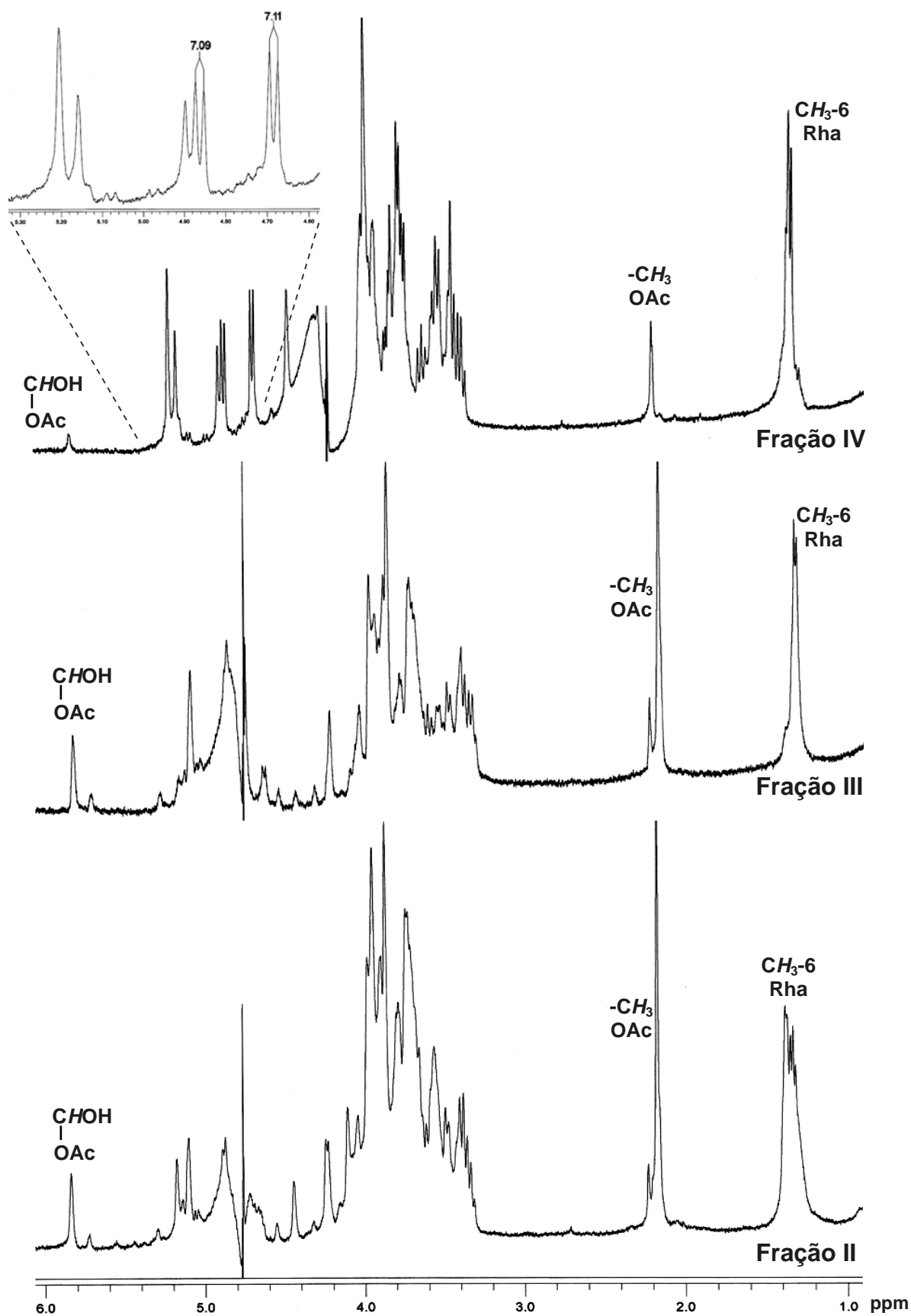


FIGURA 27. ¹H-RMN das frações oligossacarídicas isoladas em coluna BioGel-P2 após hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7. A região anomérica da fração IV é mostrada em detalhe com os valores de $J_{H/H}$ (em Hz).

Uma vez que não foram observadas unidades di-O-substituídas na fração IV suspeita-se de que essa fração seja formada por um oligossacarídeo linear, provavelmente um tetrassacarídeo formado por Rha, Glc e All, onde a unidade de Glc é o terminal não redutor da estrutura. O espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY mostra que a fração II apresenta sinais de correlação que não são encontrados na fração IV (FIGURA 28).

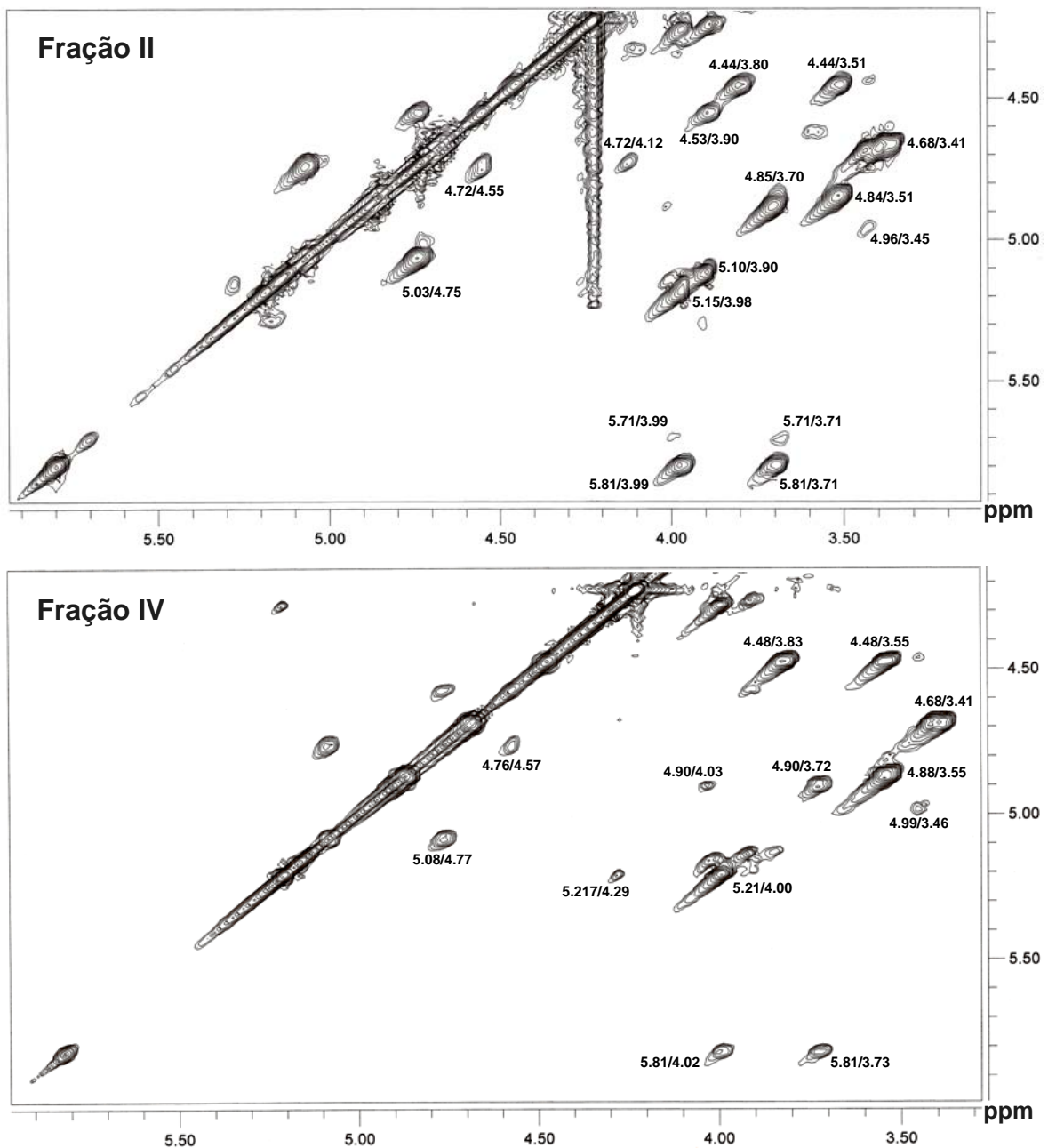


FIGURA 28. Espectros de correlação homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY das frações oligossacarídicas II e IV obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7.

A presença de dois sinais em campo baixo no espectro de ^1H -RMN da fração II gerou os sinais de correlação em δ 5.71/3.99, 5.71/3.71, 5.81/3.99 e 5.81/3.71 no espectro de COSY, sugerindo a presença de vários substituintes *O*-acetil. A fração IV apresentou apenas um sinal nessa região, e as correlações encontradas no espectro de COSY foram δ 5.81/4.02 e 5.81/3.73. Os sinais correspondentes ao grupamento metil dos substituintes *O*-acetil foram encontrados em ambos os espectros em δ 2.10, porém, não foram observadas correlações para esse sinal. As correlações encontradas em δ 3.29/1.72 e 4.02/1.73 foram atribuídas à H5/H6 de duas unidades de Rha presentes na estrutura. A análise de ^{13}C -RMN da fração IV (FIGURA 29) revelou a presença de quatro sinais na região anomérica, sendo que dois foram atribuídos ao C-1 redutor de uma unidade de Rha (δ 93.6 e 95.2). O sinal em δ 103.7 foi atribuído à sobreposição de dois sinais relativos à C-1 de uma unidade de hexose (Glc ou All) na configuração β e ao C-1 de uma unidade de Rha na configuração α . Os sinais de C-6 livre das unidades de Glc e All foram observados em δ 60.7 e 60.9, enquanto que o sinal de C-6 das unidades de Rha apareceu em δ 16.7. Três sinais característicos de ligação glicosídica em *O*-4 foram observados em δ 78.1, 81.9 e 82.3, confirmando os resultados de metilação para esta fração.

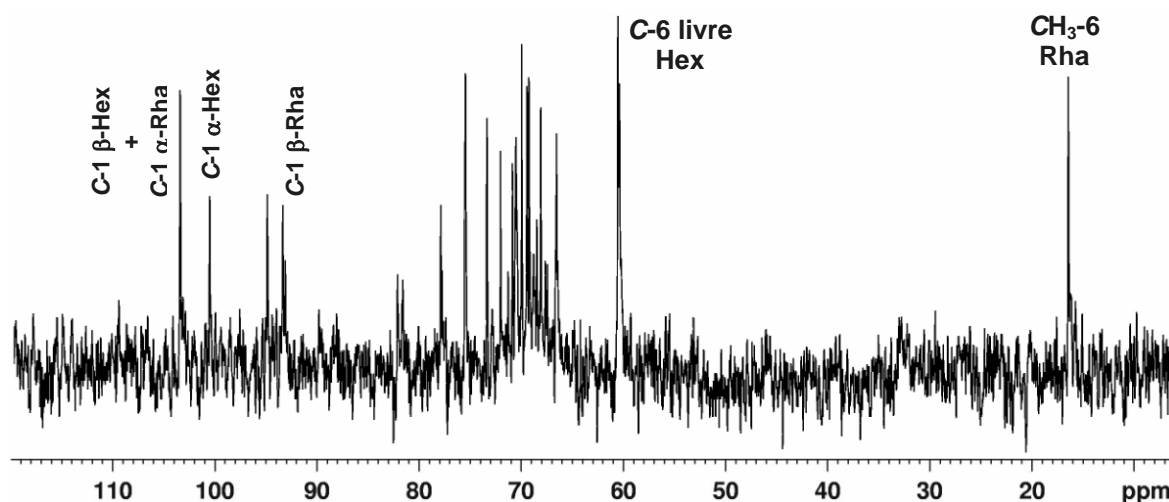


FIGURA 29. ^{13}C -RMN da fração IV obtida após cromatografia em BioGel-P2 do hidrolisado parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7.

4.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS EPS DE *H. RUBRISUBALBICANS* BA10 E BA16

Duas outras estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, BA10 e BA16, foram analisadas quanto à estrutura dos EPS produzidos. Ambas foram isoladas de bananeira (*Musa* sp.) e apresentaram grande produção de EPS quando crescidas em meio NFb malato, com rendimentos de aproximadamente 380 mg/L. Durante as análises químicas e espectroscópicas, as estruturas dos EPS produzidos por ambas as estirpes mostraram ser idênticas, e, portanto, os resultados mostrados são referentes à estirpe BA16, mas são representativos para as duas estirpes dentro de uma variabilidade experimental muito pequena.

Como mostrado anteriormente, a composição do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* BA10 e BA16 apresentou Rha, Glc, Gal e All na razão molar aproximada de 2:2:2:1. Este EPS, contudo, mostrou-se insolúvel em meio aquoso após o processo de liofilização, não permitindo que fossem realizadas outras análises na molécula intacta. Decidiu-se, portanto, hidrolisar parcialmente os polissacarídeos como descrito previamente para analisar a estrutura dos oligossacarídeos resultantes. O hidrolisado foi submetido à análise por MALDI-TOF em modo positivo (FIGURA 30). O espectro indicou o motivo da insolubilidade do material, uma vez que foram encontrados vários grupamentos O-acetil substituintes pela diferença de massa carga (m/z 42) entre os íons presentes no espectro. O sinal encontrado em m/z 1305 foi atribuído ao íon $[Rha_2;Hex_6 + Na]^+$, e pode ser encontrado também nas suas formas acetiladas como $[Rha_2;Hex_6-OAc + Na]^+$ (m/z 1347) e $[Rha_2;Hex_6-OAc_2 + Na]^+$ (m/z 1389). A perda de 146 unidades de massa (Rha) do sinal em m/z 1347 formou o íon $[Rha;Hex_6-OAc + Na]^+$ encontrado em m/z 1201. O sinal observado em m/z 547 foi atribuído ao trissacarídeo $[Hex_3-OAc + H]^+$, entretanto, este não possui nenhuma relação com os demais sinais do espectro. A presença de íons apresentando um acréscimo de 42 unidades de massa, sugere que esse trissacarídeo pode ser poli-O-acetilado, como observado pelos íons em m/z 631 e 673.

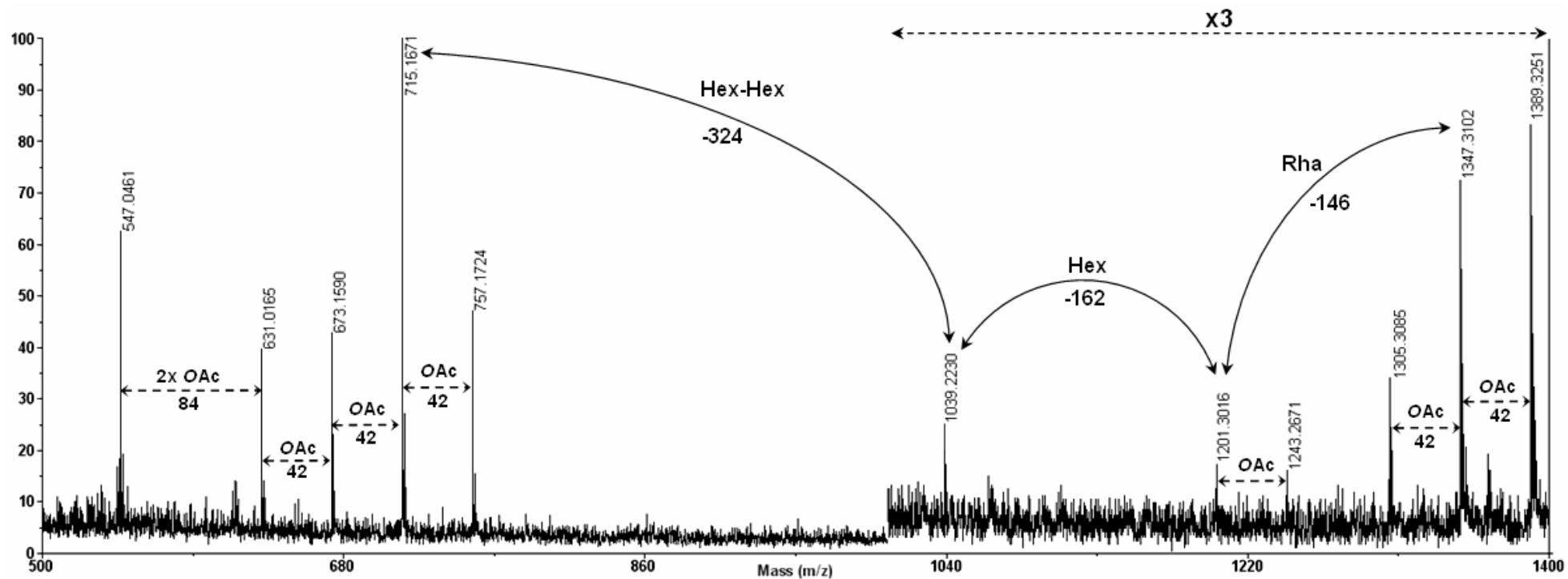


FIGURA 30. Espectro de MALDI-TOF em modo positivo dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* BA16. Hex = Glc, Gal ou All.

A mistura de oligossacarídeos foi eluída com água em coluna BioGel-P2 para fracionamento. O perfil de eluição do hidrolisado parcial obtido a partir dos EPS de *H. rubrisubalbicans* BA16 é mostrado na figura 31. Seis frações foram obtidas após a eluição do material.

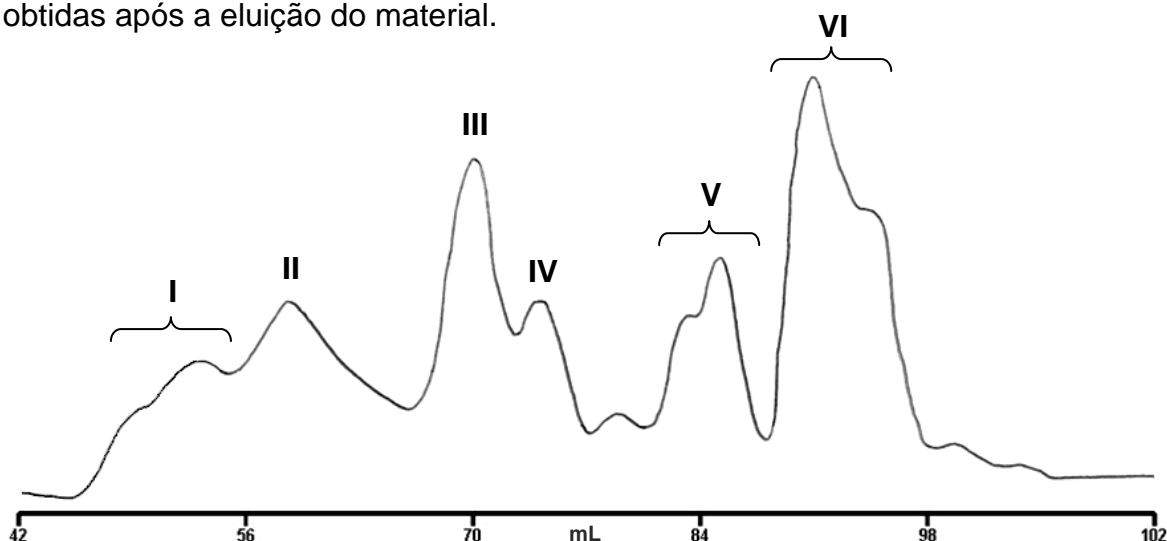


FIGURA 31. Perfil de eluição em BioGel-P2 dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise parcial dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* BA16.

As frações II, III e IV foram selecionadas para análise estrutural mais detalhada devido ao perfil de eluição mais homogêneo na cromatografia. A composição monossacarídica de cada uma destas foi determinada após análise em GC-MS dos derivados alditol acetado e per-O-TMS glicosídeos (TABELA 11).

TABELA 11. Composição monossacarídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* BA16.

	Derivados					
	Alditol Acetato ^a			Per-O-TMS ^b		
	II	III	IV	II	III	IV
Rha	19,9	11,5	13,2	1,0	1,0	1,0
All	27,3	25,5	32,1	1,4	2,2	2,5
Gal	26,9	5,1	12,8	1,4	0,5	1,0
Glc	25,9	58,1	41,9	1,3	4,9	3,1

^a Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise, redução com NaBH₄ e acetilação. Os valores para os derivados alditol acetato estão representados em mol% ^b Os monossacarídeos foram analisados como derivados per-O-trimetilsilil-metil glicosídeos após metanólise e tratamento com TRI-SIL. Os valores para os derivados per-O-TMS glicosídeos são representados em razão molar relativa às unidades de Rha.

A fração II apresentou em sua composição as unidades de Rha, All, Gal e Glc na razão molar aproximada de 2:3:3:3, enquanto que a fração III apresentou grande quantidade de Glc (58.1%) e baixo teor de Gal (5.1%) em sua composição. A fração IV apresentou as unidades de Rha, All, Gal e Glc na razão molar de 2:5:2:6. Estas frações foram submetidas ao processo de metilação para a formação dos derivados PMAA e análise de ligação glicosídica (TABELA 12). A fração II apresentou como derivados principais 2,3,6-Me₃-All, 2,3,6-Me₃-Gal, 2,3-Me₂-Rha e 2,3,6-Me₃-Glc na razão molar aproximada de 5:5:3:3, além de menores quantidades de outros derivados de Rha, All Glc e Gal. Esta fração também foi a única a apresentar pequenas quantidades de unidades de Gal e Glc 3,4-di-O-substituídas. As frações III e IV apresentaram alto teor de unidades terminais de Glc. A fração III apresentou grande quantidade de unidades 4-O-substituídas de Glc, enquanto que na fração IV esse derivado foi encontrado em menor quantidade. O oposto ocorre com os derivados 2,3,6-Me₃-Gal que é mais abundante na fração IV.

TABELA 12. Análise de ligação glicosídica das frações oligossacarídicas obtidas da hidrólise parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* BA16.

PMAA ^a	Frações BioGel-P2 (%)			Ligação
	II	III	IV	
2,3,4-Me ₃ -Rha	1,0	3,6	1,6	<i>t</i> -Rhap-(1→
2,3,4,6- Me ₄ -All	2,5	5,6	2,0	<i>t</i> -Allp-(1→
2,3-Me ₂ -Rha	16,9	7,9	6,6	→4)-Rhap-(1→
2,4-Me ₂ -Rha	2,0	-	-	→3)-Rhap-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	9,3	25,9	28,9	<i>t</i> -Glc _p -(1→
2,3,6-Me ₃ -All	24,5	19,7	30,1	→4)-Allp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	26,3	5,1	27,8	→4)-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	14,2	32,2	3,0	→4)-Glc _p -(1→
2,6-Me ₂ -Gal	1,6	-	-	→3,4)-Galp-(1→
2,6-Me ₂ -Glc	1,7	-	-	→3,4)-Glc _p -(1→

^a Derivados alditol acetato parcialmente O-metilados.
Valores representados em mol%.

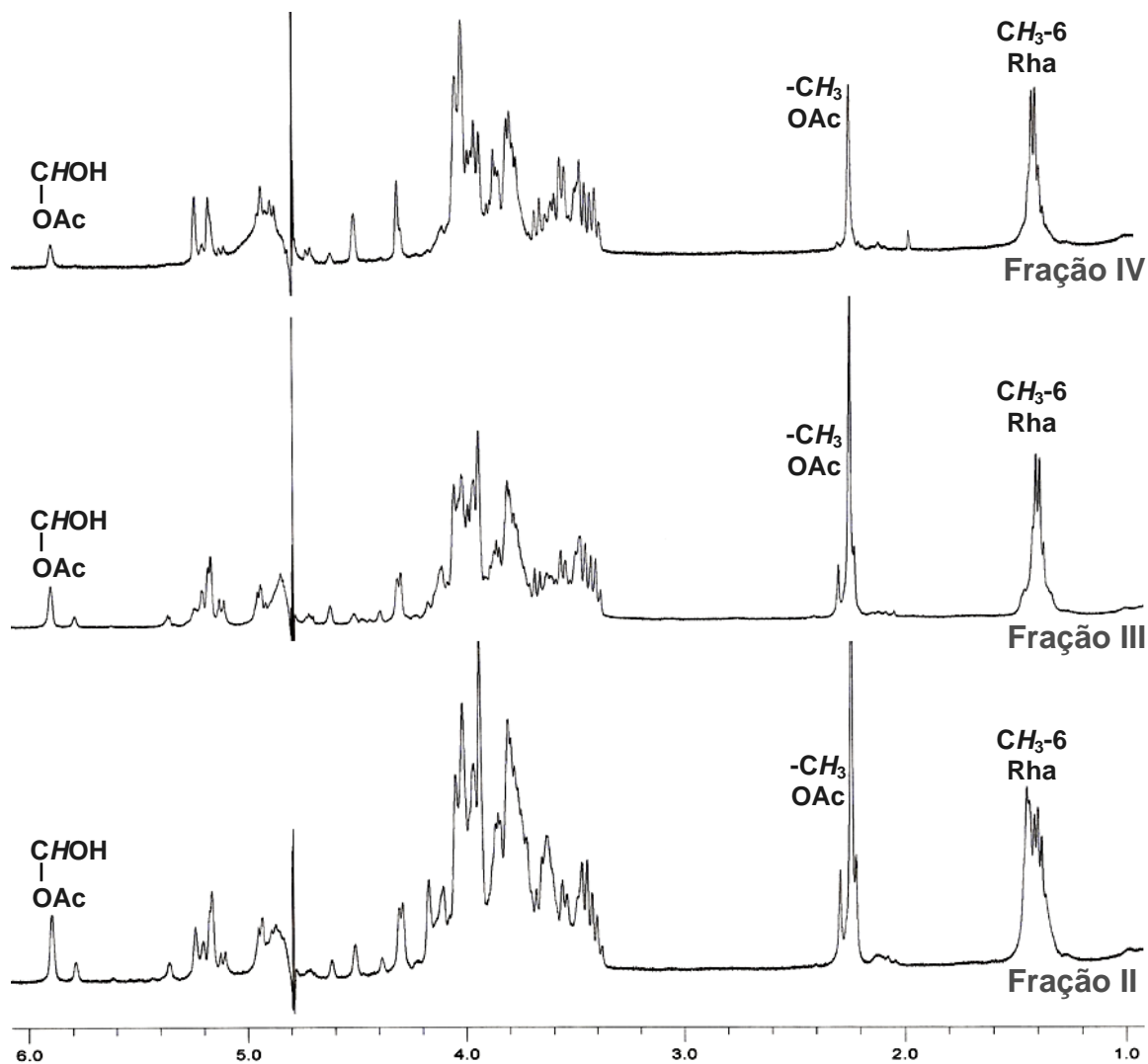


FIGURA 32. ^1H -RMN das frações oligossacarídicas isoladas em coluna BioGel-P2 após hidrólise parcial dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* BA16.

A análise de ^1H -RMN revelou a presença de sinais referentes às substituições por grupamento O-acetil em todas as frações oligossacarídicas. As frações II e III apresentaram três sinais característicos dessa substituição em δ 2.10, 2.12 e 2.16, enquanto na fração IV foi observado apenas um sinal em δ 2.12. Além destes, as frações III e IV ainda apresentaram dois sinais em δ 5.89 e 5.95, referentes aos prótons do anel glicosídico cujo grupamento O-acetil encontra-se ligado. A fração IV apresentou apenas um sinal nessa região em δ 5.95. Os sinais característicos de $\text{CH}_3\text{-6}$ das unidades de Rha foram observados e todas as frações (FIGURA 32).

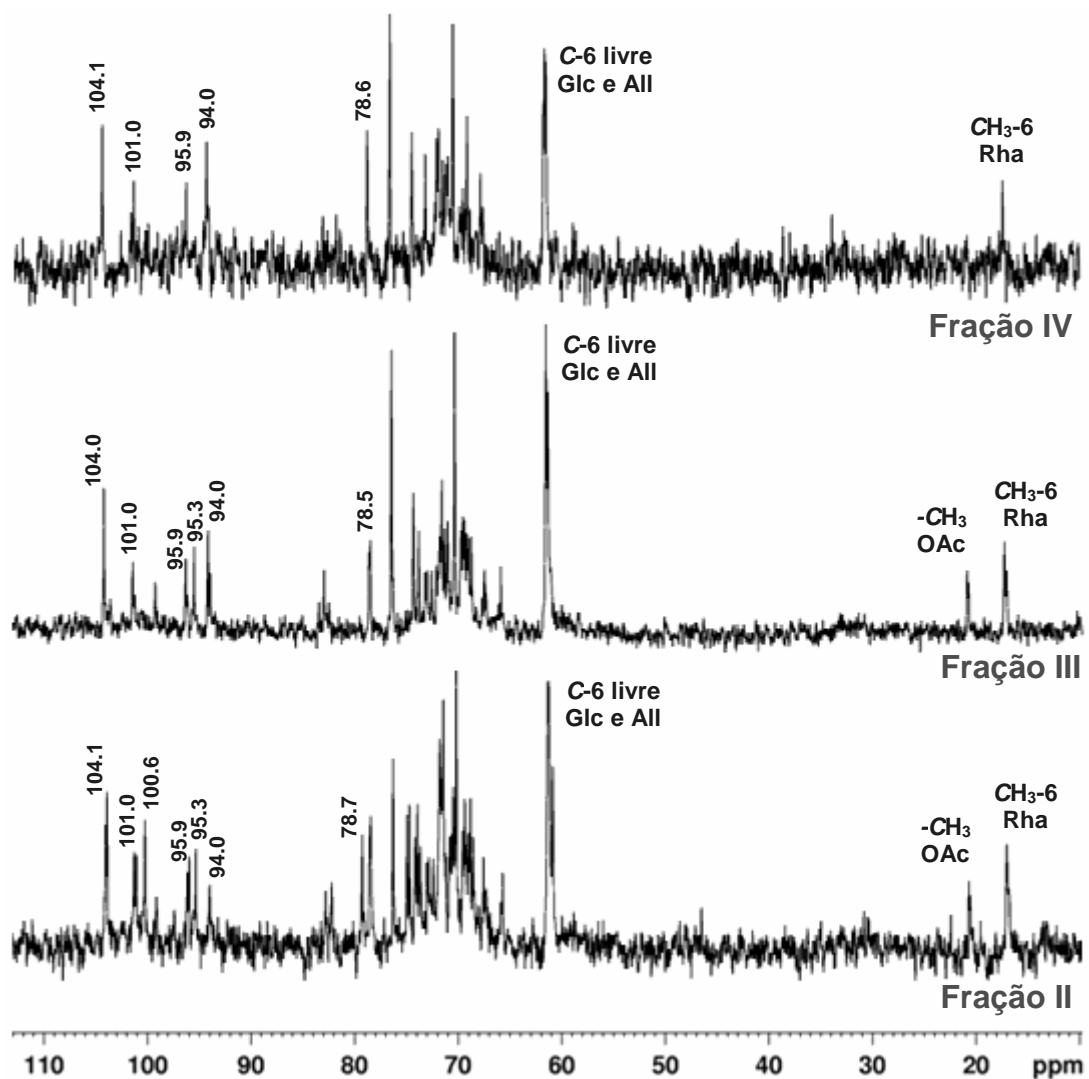


FIGURA 33. ^{13}C -RMN das frações oligossacarídicas obtidas após eluição em BioGel-P2 do hidrolisado parcial dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* BA16.

Os espectros de ^{13}C -RMN revelaram os sinais das unidades redutoras dos oligossacarídeos presentes em cada fração. A fração IV mostrou ser formada por um trissacarídeo por apresentar quatro sinais na região anomérica em δ 104.1, 101.0, 95.9 e 94.0, sendo os dois últimos referentes ao C-1 da unidade redutora nas configurações β e α respectivamente. As frações II e III mostraram a presença de vários sinais de C-1 redutor, sugerindo que essas frações são formadas por misturas de oligossacarídeos. Ambas as frações apresentaram sinais de substituinte *O*-acetil observados em 20.7 ppm, este sinal, entretanto, não foi encontrado no espectro da fração IV. Em todos os espectros foram encontrados sinais característicos de $\text{CH}_3\text{-6}$ (δ 17.1) das unidades de Rha (FIGURA 33).

Uma vez que a fração IV foi a que apresentou maior homogeneidade, esta foi selecionada para que fossem realizadas as análises bidimensionais de RMN. O espectro de COSY e TOCSY desta fração são mostrados abaixo (FIGURA 34).

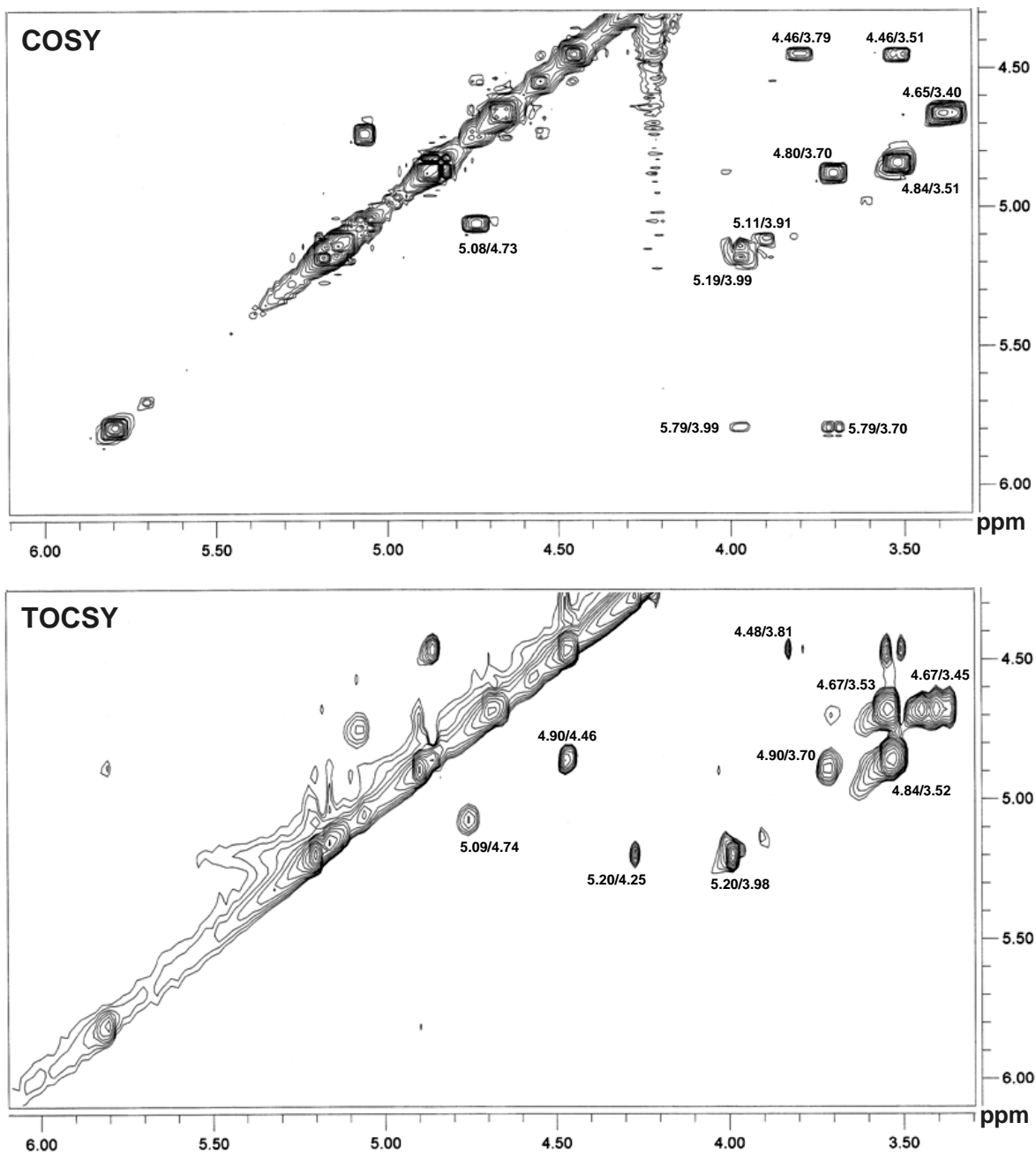


FIGURA 34. RMN bidimensionais de correlação homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ da fração IV obtida após eluição em BioGel-P2 do hidrolisado parcial do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* BA16.

O espectro de COSY da fração IV revelou fracas correlações em 5.79/3.99 e 5.79/3.70, mostrando que pode haver algum substituinte OAc na estrutura.

Os sinais característicos dessas substituições, contudo, não foram observados no espectro de ^{13}C -RMN desta fração.

Os dados de RMN da fração IV não são conclusivos para a elucidação da estrutura oligossacarídica. Em conjunto com os dados de metilação, entretanto, pôde-se afirmar que a fração contém um trissacarídeo contendo All, Gal e Glc na razão molar de 1:1:1, e que a unidade terminal não redutora é de Glcp, sendo as demais unidades ligadas por ligações 1→4. De acordo com os assinalamentos obtidos no espectro de ^{13}C -RMN, uma destas unidades está ligada na configuração α (δ 101.0) enquanto outra encontra-se ligada na configuração β (δ 104.1). Porém, não foi possível determinar se essas ligações eram das unidades de All ou Gal.

As frações II e III apresentaram uma mistura de oligossacarídeos uma vez que foram observados múltiplos sinais de carbonos anoméricos redutores nos espectros de ^{13}C -RMN. Estas, portanto necessitam de outro processo de purificação para que possam ser realizados os procedimentos de análise estrutural mais refinados.

4.6. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS LPS DE *HERBASPIRILLUM SPP.*

Diferentes estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67, Z78, ZA95, M2 e SmR1) e de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (M1 e M4) foram crescidas em meio NFb malato como descrito previamente e, após centrifugação e liofilização das células, cada estirpe foi submetida à extração fenol-água (ϕ/w) para a remoção dos LPS. Aproximadamente 1,0 g de células (peso seco) foram utilizadas em cada extração, e para cada estirpe foram obtidas duas frações, uma aquosa e outra fenólica, que foram dialisadas exaustivamente em membrana com limite de exclusão de 3.500 Da até a completa remoção do fenol em ambas as frações. Estas foram posteriormente liofilizadas e o rendimento de cada fração é mostrado na tabela 13.

TABELA 13. Rendimento das frações aquosas e fenólicas após extração ϕ/w das diferentes estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

Estirpe	Rendimento (mg)		Rendimento (%) ^a	
	Aquosa	Fenólica	Aquosa	Fenólica
<i>H. seropedicae</i>				
Z67	180,1	41,6	9,0	2,1
Z78	204,4	26,1	10,2	1,3
ZA95	153,3	16,6	7,7	0,8
M2	201,3	42,3	10,1	2,1
SmR1	240,9	47,8	12,0	2,2
<i>H. rubrisubalbicans</i>				
M1	106,5	54,8	5,3	2,3
M4	44,2	20,5	2,2	1,0

^a Rendimento em porcentagem, relativo ao peso de células secas utilizadas na extração.

É possível observar que o rendimento das frações aquosas é superior ao rendimento do material extraído na fração fenólica para todas as estirpes submetidas à extração ϕ/w . O rendimento das frações fenólicas ficou em aproximadamente 2% do peso total de células secas extraídas, exceto para as estirpes Z78, ZA95 e M2 que apresentaram baixo rendimento nessas frações. Ambas as estirpes de *H. rubrisubalbicans* apresentaram um rendimento considerável para as frações fenólicas em relação à quantidade de material

extraído na fase aquosa. Essa relação foi menor para os extratos das estirpes de *H. seropedicae*.

Cada uma das frações foi submetida à análise eletroforética em DOC-PAGE e a observação das bandas nos géis foi realizada após coloração com alcian blue seguido de coloração com nitrato de prata. A figura 35 mostra o perfil eletroforético das frações aquosas e fenólicas extraídas de cada uma das estirpes.

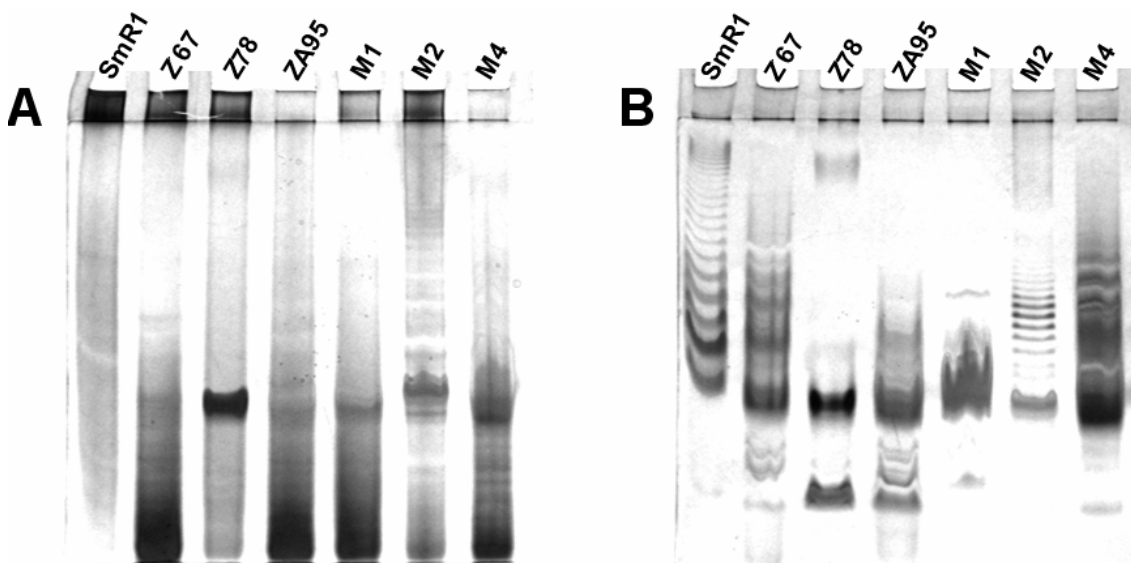


FIGURA 35. DOC-PAGE 18% das frações aquosas (A) e fenólicas (B) obtidas após extração ϕ/w das diferentes estirpes de *H. seropedicae* (SmR1, Z67, Z78, ZA95 e M2) e *H. rubrisubalbicans* (M1 e M4). Coloração com alcian blue seguida de coloração com AgNO_3 .

O perfil eletroforético dos extratos sugere que os lipopolissacarídeos encontravam-se principalmente nas frações fenólicas de cada extração devido ao padrão característico de bandas “*ladder-like*” presentes no gel. Os extratos aquosos apresentaram um perfil arrastado no gel, e a coloração intensa no gel de empilhamento sugere a presença de material de alta massa molecular, que não foi capaz de penetrar no gel de corrida. É possível ainda observar algumas bandas com padrão repetitivo de massa molecular, especialmente para a estirpe M2 de *H. seropedicae*, mas que, contudo, aparecem bastante indefinidas devido ao arraste do material. As frações fenólicas de cada extração foram submetidas à análise de seus derivados per-O-TMS por GC-MS para determinar a composição de ácidos graxos e monossacarídeos presentes em cada uma (TABELA 14).

TABELA 14. Derivados per-O-TMS das frações fenólicas obtidas após extração ϕ/w das células de diferentes estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

	Estirpes						
	SmR1	Z67	Z78	ZA95	M1	M2	M4
C_{12:0}	1,2	-	-	-	-	-	-
βOH-C_{10:0}	5,7	-	-	-	-	-	-
Rha	13,1	0,8	11,9	1,1	1,1	3,9	3,3
C_{14:0}	-	2,3	-	-	-	0,9	2,5
βOH-C_{12:0}	12,4	1,6	0,7	2,2	1,2	0,6	-
4-N-Ara	11,9	6,9	2,0	7,1	9,6	3,3	7,5
Gal	-	17,9	12,8	15,8	18,9	6,6	14,9
QuiNAc	-	6,1	4,1	5,0	-	9,5	4,5
C_{16:0}	9,4	23,1	38,8	24,5	16,2	20,1	11,1
Glc	16,0	-	-	-	-	-	-
Hep	-	37,5	26,6	40,1	46,9	54,0	51,8
Kdo	12,4	3,8	3,1	4,2	6,1	1,1	4,4
GlcNAc	17,9	-	-	-	-	-	-

Valores representados em mol%.

A composição encontrada para os extratos fenólicos das estirpes Z67, ZA95 e M4 foram bastante similares, todas apresentando altos teores de Hep, Gal e C_{16:0}. Esse resultado é compatível com a análise em DOC-PAGE dessas amostras, uma vez que o perfil eletroforético dessas amostras foi parecido. Pequenas quantidades de C_{12:0} e β OH-C_{10:0} foram encontradas apenas para a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. Contudo, esses ácidos graxos são comuns em LPS e provavelmente estão presentes nas outras estirpes, mas não sobressaem em relação à grande quantidade dos outros derivados. A estirpe SmR1 foi também a única que apresentou Glc e GlcNAc em sua composição em quantidades significativas, não sendo observada a presença da Hep, QuiNAc e Gal. O perfil eletroforético dos LPS dessa amostra também apresentou-se bastante diferente das demais estirpes.

A composição das frações aquosas mostrou uma grande variabilidade de derivados per-O-TMS entre as estirpes analisadas. Todas, entretanto, apresentaram uma grande quantidade de ribose em suas composições, provavelmente proveniente de RNA extraído durante o processo de extração fanol-água.

4.7. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LPS DE *H. SEROPEDICAE* SmR1 E DOS MUTANTES RAMEBB E RAMEBC

Os LPS da estirpe selvagem (SmR1) de *H. seropedicae* e de duas estirpes contendo genes *rmIB* (RAMEBB) e *rmIC* (RAMEBC), mutados por reação de transposon, foram extraídos e tiveram sua composição e estrutura determinadas. Após crescimento em meio NFb malato como descrito, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas repetidas vezes com solução salina 0,9% e posteriormente com água, e liofilizadas. As células secas (4,5 g) de cada estirpe mutante e da estirpe selvagem foram submetidas à extração ϕ/w como descrito, gerando cada uma duas frações, aquosa e fenólica, que foram separadas, dialisadas e liofilizadas para que fossem obtidos os rendimentos das extrações (TABELA 15).

TABELA 15. Peso seco das frações aquosa e fenólica obtidas após extração ϕ/w da estirpe selvagem e de ambos os mutantes de *H. seropedicae*.

Estirpe	Rendimento (mg)		Rendimento (%) ^a	
	Aquosa	Fenólica	Aquosa	Fenólica
<i>H. seropedicae</i> SmR1	580,3	101,1	14,5	2,5
<i>H. seropedicae</i> RAMEBB	170,8	90,3	4,2	2,2
<i>H. seropedicae</i> RAMEBC	240,2	93,6	6,0	2,3

^a Rendimento em porcentagem, relativo ao peso de células secas utilizadas na extração.

Os rendimentos obtidos de cada estirpe analisada mostram que as frações aquosas continham mais material extraído das células liofilizadas do que as frações fenólicas. Nota-se também que o rendimento da fração aquosa para a estirpe selvagem (SmR1) foi muito superior (14,5%) ao rendimento obtido nas frações aquosas de ambos os mutantes (4,2% e 6,3%), sendo esse um primeiro indício da diferença entre as características das células selvagens e mutantes. O rendimento das frações fenólicas, contudo, foi bastante similar para as três estirpes.

Todas as frações foram submetidas à análise por DOC-PAGE para observar o perfil eletroforético das moléculas extraídas (FIGURA 36). As frações aquosas obtidas na extração das três estirpes mostraram um perfil não-

característico de LPS, especialmente quando analisadas no gel corado com nitrato de prata. Estas frações formaram um arraste no gel, sugerindo a presença de algum material neutro que não sofre boa separação durante o processo eletroforético, reforçado ainda pelo fato desse material não ter sido observado com a coloração de alcian blue. Esse material pode ser proveniente de algum EPS neutro que possa ter sido extraído juntamente com os LPS na fase aquosa da extração.

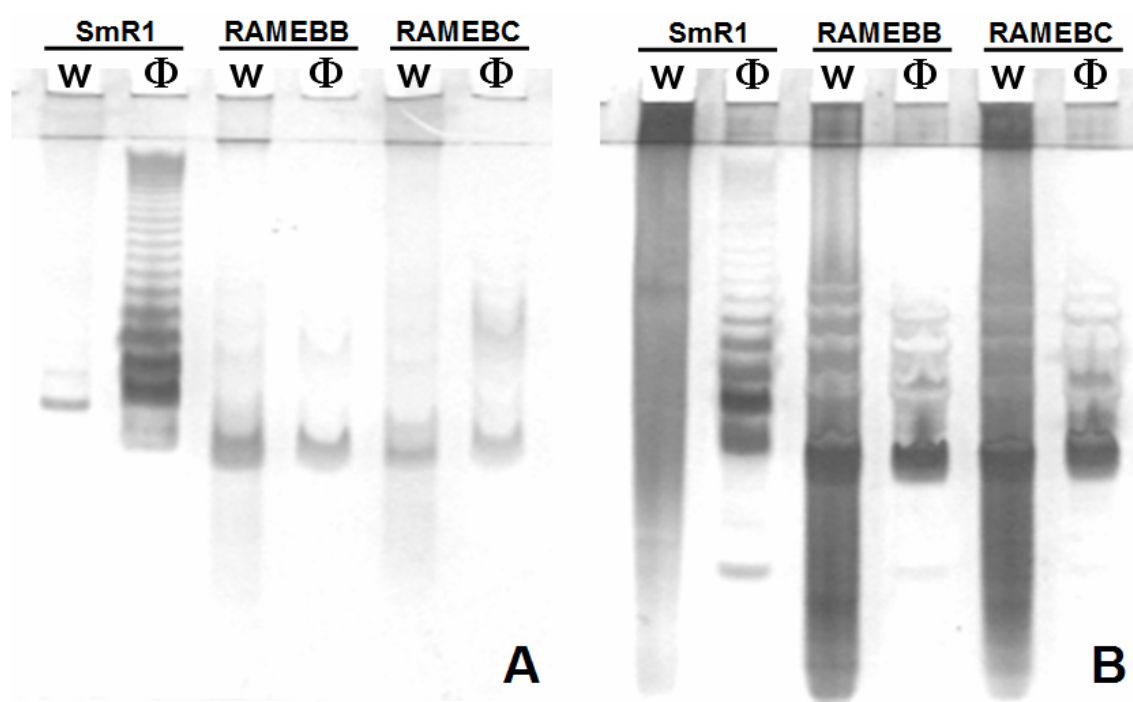


FIGURA 36. DOC-PAGE 18% das frações aquosas (w) e fenólicas (Φ) obtidas após extração ϕ/w das células de *H. seropedicae* SmR1 e dos mutantes RAMEBB e RAMEBC. **A)** coloração com alcian blue; **B)** coloração com alcian blue seguida de coloração com AgNO_3 .

As frações fenólicas apresentaram um perfil de bandas característico de LPS, especialmente na estirpe selvagem SmR1. Essa fração mostrou também a presença de um material de alta massa molecular que penetra pouco no gel. O perfil das frações fenólicas obtidas a partir das estirpes mutantes (RAMEBB e RAMEBC) também apresentou um bandejamento característico de LPS, bastante similares entre si, porém diferentes daquele observado para a estirpe selvagem, sugerindo uma diferença estrutural dos LPS presentes nas células de *H. seropedicae* SmR1 e nas células mutantes.

A análise de composição através dos derivados per-O-TMS das frações aquosa e fenólica das três estirpes, revelou diferenças bastante significativas entre SmR1 e ambos os mutantes. A comparação da composição das frações aquosas das três estirpes (FIGURA 37) revelou que todas apresentavam significativa quantidade de ribose, proveniente de contaminação por RNA extraídos juntamente com os LPS na fase aquosa da extração. A estirpe selvagem SmR1 apresentou grande quantidade de Glc em sua composição, enquanto que ambas as estirpes mutantes mostraram a presença de Hep e Gal, além de ácidos graxos de cadeia linear e hidroxilados. A composição obtida para as frações fenólicas das três estirpes (FIGURA 38), mostrou que estas não apresentavam contaminação por ribose. Como esperado, a principal diferença entre a estirpe SmR1 e os mutantes, foi a presença de grande quantidade de Rha na composição de SmR1, enquanto que este monossacarídeo encontrava-se completamente ausente para ambos os mutantes. SmR1 também apresentou grandes quantidades de Glc e GlcNAc, além das unidades de Kdo e 4-N-Ara. Em contrapartida, ambos os mutantes tiveram composições bastante diferenciadas, sendo confirmada a presença de Gal e de grandes quantidades de Hep na composição. Kdo, GlcNAc e 4-N-Ara não foram encontrados na composição dos mutantes. A composição de ácidos graxos também foi diferente entre SmR1 e os mutantes, especialmente no teor de β OH-C_{12:0} e C_{14:0}. A tabela 16 mostra a compilação dos resultados obtidos pelos derivados per-O-TMS das frações aquosas e fenólicas extraídas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC.

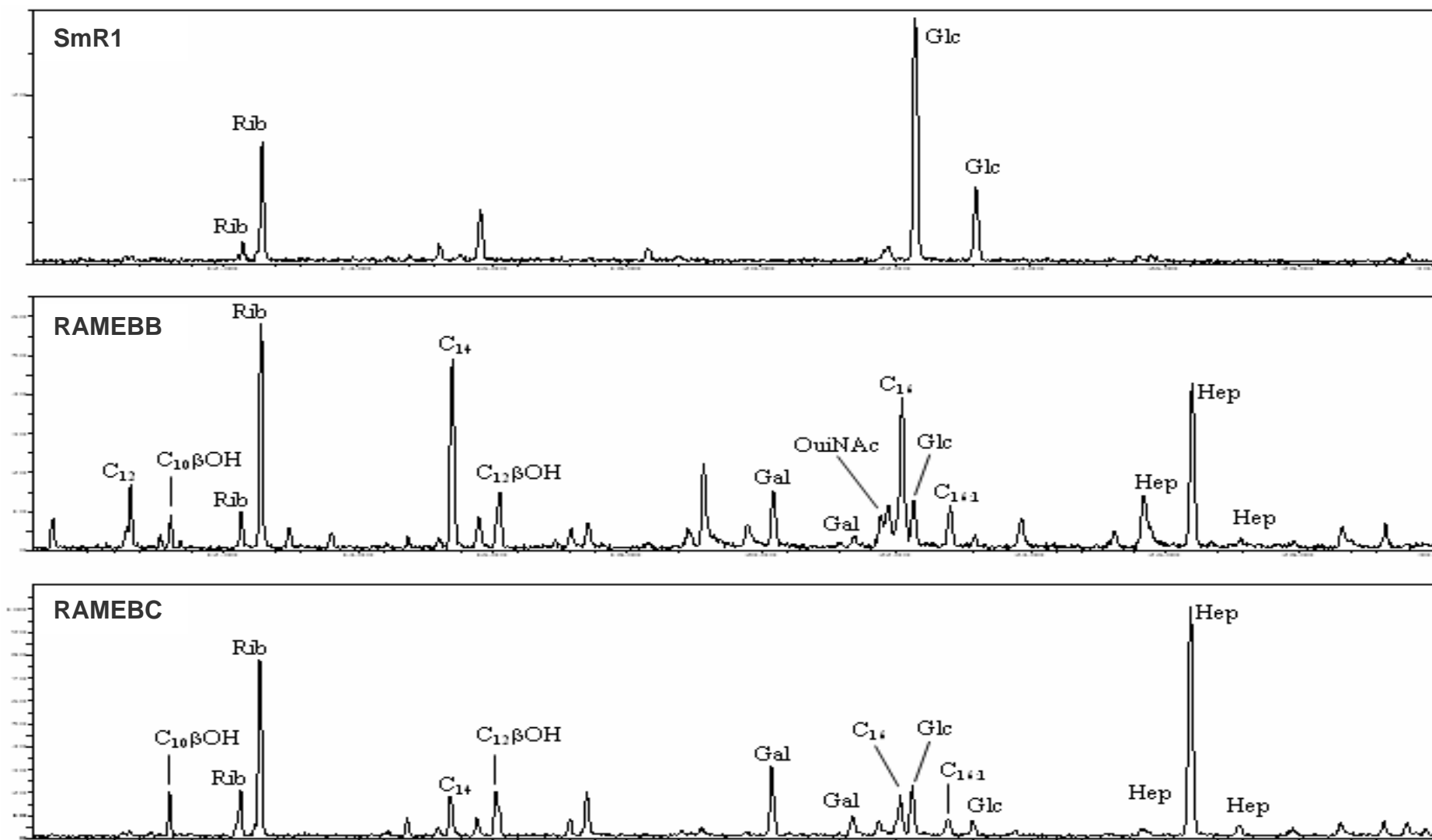


FIGURA 37. Cromatogramas dos derivados per-O-TMS obtidos das frações aquosas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC, mostrando diferenças na composição monossacarídica e de ácidos graxos em cada estirpe.

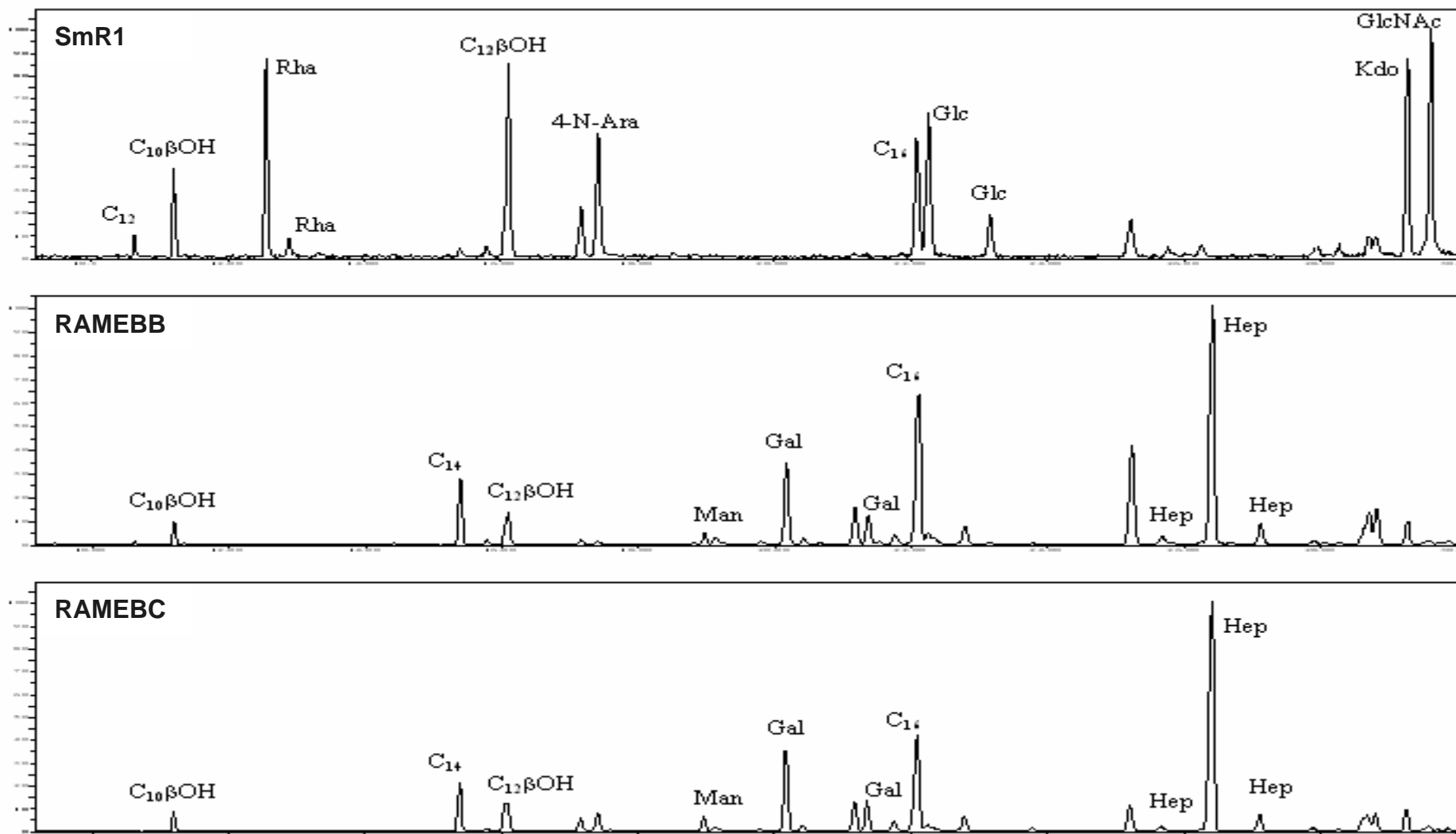


FIGURA 38. Cromatogramas dos derivados per-O-TMS obtidos das frações fenólicas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC, mostrando diferenças na composição monossacarídica e de ácidos graxos em cada estirpe.

TABELA 16. Composição monossacarídica e de ácidos graxos obtida através dos derivados per-O-TMS das frações aquosas e fenólicas extraídas das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de *H. seropedicae*.

	SmR1		RAMEBB		RAMEBC	
	Aquosa	Fenólica	Aquosa	Fenólica	Aquosa	Fenólica
C_{12:0}	-	1,4	3,9	-	-	-
βOH-C_{10:0}	-	4,2	2,0	1,9	3,2	1,7
Rib	23,8	-	15,5	-	18,1	-
Rha	-	11,9	-	-	-	-
C_{14:0}	-	0,7	13,5	7,5	4,1	5,8
βOH-C_{12:0}	-	14,4	5,4	5,1	6,3	5,5
4-N-Ara	-	12,5	4,3	0,6	7,2	4,4
Man	-	-	1,9	1,5	-	1,9
Gal	-	-	13,3	16,2	12,0	16,9
QuiNAc	-	-	-	1,6	1,2	1,8
C_{16:0}	-	9,4	15,4	23,0	5,9	15,5
Glc	76,2	15,9	5,5	1,7	8,2	1,0
Hep	-	-	17,0	40,2	31,9	44,5
Kdo	-	12,6	2,2	2,7	1,8	2,8
GlcNAc	-	16,1	-	0,7	1,8	0,9

* Valores mostrados em % relativo à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

A composição monossacarídica de todas as frações também foi analisada pelos derivados alditol acetato. Neste caso, somente são observados os monossacarídeos neutros presentes nos LPS, não sendo analisadas as unidades ácidas nem os ácidos graxos. A tabela 17 mostra a composição dos açúcares neutros de cada fração obtida através dos derivados alditol acetato. Os resultados obtidos foram compatíveis com aqueles encontrados para os derivados per-O-TMS. Como esperado, a fração fenólica de SmR1 apresentou grande teor de Rha, enquanto que ambos os mutantes não tiveram esse monossacarídeo em suas composições. Entretanto, RAMEBB e RAMEBC apresentaram grande quantidade de Gal e Hep principalmente nas frações fenólicas. Essa unidade não aparece em SmR1, que apresenta teor significativo de Glc e GlcNAc.

TABELA 17. Composição monossacarídica dos LPS extraídos de SmR1, RAMEBB e RAMEBC, obtida através de derivados alditol acetato.

	R _t (min)	SmR1		RAMEBB		RAMEBC	
		Aquosa	Fenólica	Aquosa	Fenólica	Aquosa	Fenólica
Rib	10,60	26,6	-	46,6	-	68,9	-
Rha	10,70	-	62,1	-	-	-	-
QuiNAc	15,52	-	-	3,4	6,6	3,1	10,9
Glc	18,41	73,4	20,0	5,2	1,2	4,1	-
Gal	18,72	-	-	15,3	30,2	11,5	43,0
GlcNAc	23,64	-	17,9	6,1	12,5	2,7	4,1
Hep	25,88	-	-	23,4	49,5	9,7	42,0

* Valores mostrados em % relativo à área dos sinais encontrados em GC-MS.

Uma vez que a composição dos LPS extraído nas frações aquosas apresentava uma grande quantidade de Rib, provavelmente proveniente de contaminação por ácidos nucleicos, apenas as frações fenólicas de SmR1 e de ambos os mutantes (RAMEBB e RAMEBC) foram utilizadas para caracterização química mais detalhada.

4.7.1. Caracterização Estrutural da Porção Lipídeo-A Isolada dos LPS de *H. seropedicae* SmR1 e dos Mutantes RAMEBB e RAMEBC

As três frações fenólicas contendo os LPS de SmR1, RAMEBB e RAMEBC, foram submetidas à hidrólise branda para a separação da porção lipídeo-A e dos oligossacarídeos que compõem cada LPS. A hidrólise realizada à 100°C utilizando ácido acético 1%, foi realizada até que a formação de um precipitado fosse observada. Para os LPS de SmR1, a duração da hidrólise foi de 45 min, enquanto que para os LPS extraídos dos mutantes foi observada a formação de precipitado apenas após 60 min de hidrólise. Essa diferença no tempo de hidrólise dos LPS pode ser um indicativo de mudanças estruturais no núcleo do LPS. Após o processo de hidrólise, o precipitado contendo a fração lipídeo-A foi separado do sobrenadante que continha os oligossacarídeos como descrito.

A porção lipídeo-A isolada dos LPS das três estirpes foi submetida à análise de composição através de derivados per-O-TMS (TABELA 18). Como esperado, todas as frações apresentaram unidades de N-acetil glucosamina, que formam o dissacarídeo β -GlcNAc-(1→6)-GlcNAc presente na porção lipídeo-A da maioria

dos LPS presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas. Interessantemente, foi observado o derivado correspondente ao monossacarídeo 4-amino-arabinose (N-Ara) apenas para o lipídeo-A de SmR1. Ambos os mutantes não apresentaram esse derivado, possivelmente uma diferença refletida pela mutação nos genes envolvidos na biossíntese de rhamnose. A composição de ácidos graxos mostrou que β OH-C_{12:0} está presente em quantidades significativas na porção lipídeo-A das três estirpes. As principais diferenças encontradas entre SmR1 e ambos os mutantes, é a presença de unidades de Hep em RAMEBB e RAMEBC, que não foram encontradas em SmR1, bem como a grande quantidade de ácido mirístico (C_{14:0}) presente nos mutantes em relação à SmR1.

TABELA 18. Derivados per-O-TMS obtidos para a porção lipídeo-A dos LPS extraídos na fração fenólica das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de *H. seropedicae*.

	Lipídeo-A		
	SmR1	RAMEBB	RAMEBC
C _{12:0}	2,5	-	-
β OH-C _{10:0}	9,8	5,8	3,4
C _{14:0}	1,8	19,0	17,8
β OH-C _{12:0}	48,7	20,5	21,6
4-N-Ara	6,5	-	-
C _{16:0}	26,2	47,3	46,5
Hep	-	4,3	6,5
GlcNAc	4,4	2,3	4,2

* Valores mostrados em % relativo à soma das áreas dos sinais encontrados no GC-MS.

Para a melhor quantificação dos ácidos graxos que constituem os lipídeo-A isolado dos LPS extraídos de SmR1, RAMEBB e RAMEBC, foi realizada uma derivatização para a formação de metil ésteres de ácidos graxos (FAME). Esse tipo de análise mostra exclusivamente os ácidos graxos presentes na fração, com uma maior sensibilidade para a quantificação mais precisa dos derivados, especialmente para os ácidos graxos de cadeia curta. Os resultados obtidos foram bastante similares àqueles observados pelos derivados per-O-TMS. A tabela 19 mostra a quantificação dos ácidos graxos das frações lipídeo-A obtida pelos derivados FAME.

TABELA 19. Derivados FAME obtidos para a porção lipídeo-A dos LPS extraídos na fração fenólica das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de *H. seropedicae*.

	R _t (min)	Lipídeo-A		
		SmR1	RAMEBB	RAMEBC
βOH-C _{10:0}	14,37	15,1	4,2	6,2
C _{12:0}	15,49	13,8	1,8	2,0
βOH-C _{12:0}	17,59	16,2	9,0	10,7
C _{14:0}	18,52	5,0	28,7	28,8
C _{16:0}	21,31	44,9	53,6	49,5

* Valores mostrados em % relativo à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

Uma análise por cromatografia de camada delgada (FIGURA 39) revelou a presença de duas espécies moleculares com baixa mobilidade na porção lipídeo-A de SmR1. Essas bandas encontram-se ausentes para os lipídeo-A de ambos os mutantes, sugerindo que as unidades de 4-N-Ara observadas nas análises de composição podem estar ligadas ao lipídeo-A da estirpe selvagem.

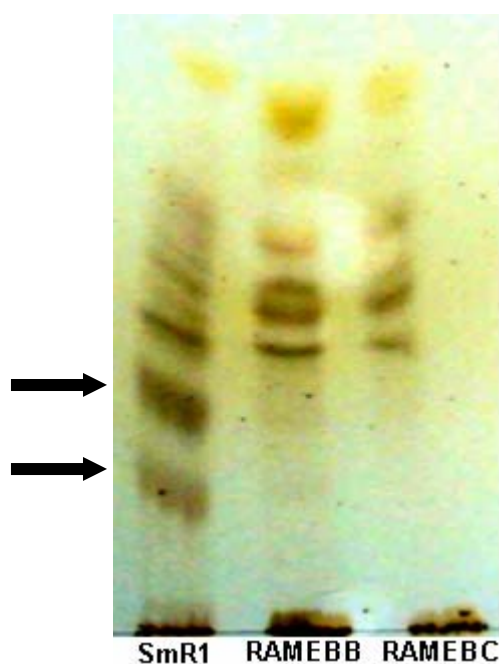


FIGURA 39. Cromatografia de camada delgada da porção lipídeo-A das estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC de *H. seropedicae*. Solvente: CHCl₃:MeOH:H₂O:NH₄OH (40:25:4:2 v/v/v/v). Revelador: ácido sulfúrico 10% em etanol.

Com a composição monossacarídica e de ácidos graxos dos lipídeo-A de SmR1 e de ambos os mutantes, foi possível analisar mais detalhadamente a

estrutura dessas frações utilizando espectrometria de massa. Cada fração contendo os lipídeos-A foi co-cristalizada utilizando THAP como matrix e analisada por MALDI-TOF em modo negativo. O espectro obtido para o lipídeo-A de SmR1 mostrou uma variedade estrutural bastante grande, sugerindo a substituição de ácidos graxos hidroxilados e lineares na estrutura, bem como a presença de 4-N-Ara na estrutura (FIGURA 40). Os sinais encontrados em m/z 1627, 1611 e 1595 representam a estrutura do lipídeo-A hexa-acilada, ou seja, contendo seis ácidos graxos ligados à estrutura do dissacarídeo de GlcNAc. Em contrapartida, os sinais encontrados em m/z 1457, 1441 e 1425 são representativos da estrutura penta-acilada. A diferença de 16 unidades de m/z entre cada um dos sinais, referente à perda um átomo de oxigênio, sugere a substituição de ácidos graxos hidroxilados por ácidos graxos lineares na estrutura, tanto no grupamento estrutural hexa-acilado como no grupamento penta-acilado. Os sinais correspondentes em cada grupamento, apresentam uma diferença de m/z 170 entre si, correspondente a uma unidade de $\beta\text{OH-C}_{10:0}$. Também foram observadas diferenças de 80 m/z , relativas à desfosforilação das estruturas ($-\text{PO}_3$) em cada grupamento. A presença de unidades de 4-N-Ara foi determinada pela diferença de m/z 131 entre os sinais correspondentes de cada grupamento.

Os espectros de MALDI-TOF obtidos para o lipídeo-A de ambos os mutantes (RAMEBB e RAMEBC) foram idênticos entre si (FIGURA 41), sendo possível observar que alguns íons formados para o lipídeo-A dos mutantes são compatíveis com alguns sinais observados em SmR1, como o sinal em m/z 1627. Contudo, o perfil de íons no espectro de ambos os mutantes, foi bastante diferente ao perfil observado para o lipídeo-A da estirpe selvagem. O principal sinal encontrado para os mutantes apareceu em m/z 1389. Não foi possível determinar se esse sinal é representativo de um lipídeo-A hexa- ou penta-acilado. Outro sinal de grande intensidade apareceu em m/z 1192. A diferença de massa entre estes dois sinais principais foi de 197 unidades, compatível com a massa de uma unidade de $\beta\text{OH-C}_{12:0}$. Também foi possível observar diferenças de 16 unidades de massa dentro de um grupamento de íons, correspondente à substituição de ácidos graxos hidroxilados por ácidos graxos lineares, bem como diferenças de m/z 28, sugerindo que possivelmente haja substituições de ácidos graxos de cadeia longa por outros de cadeia mais curta pela perda de $\text{CH}_2\text{-CH}_2$.

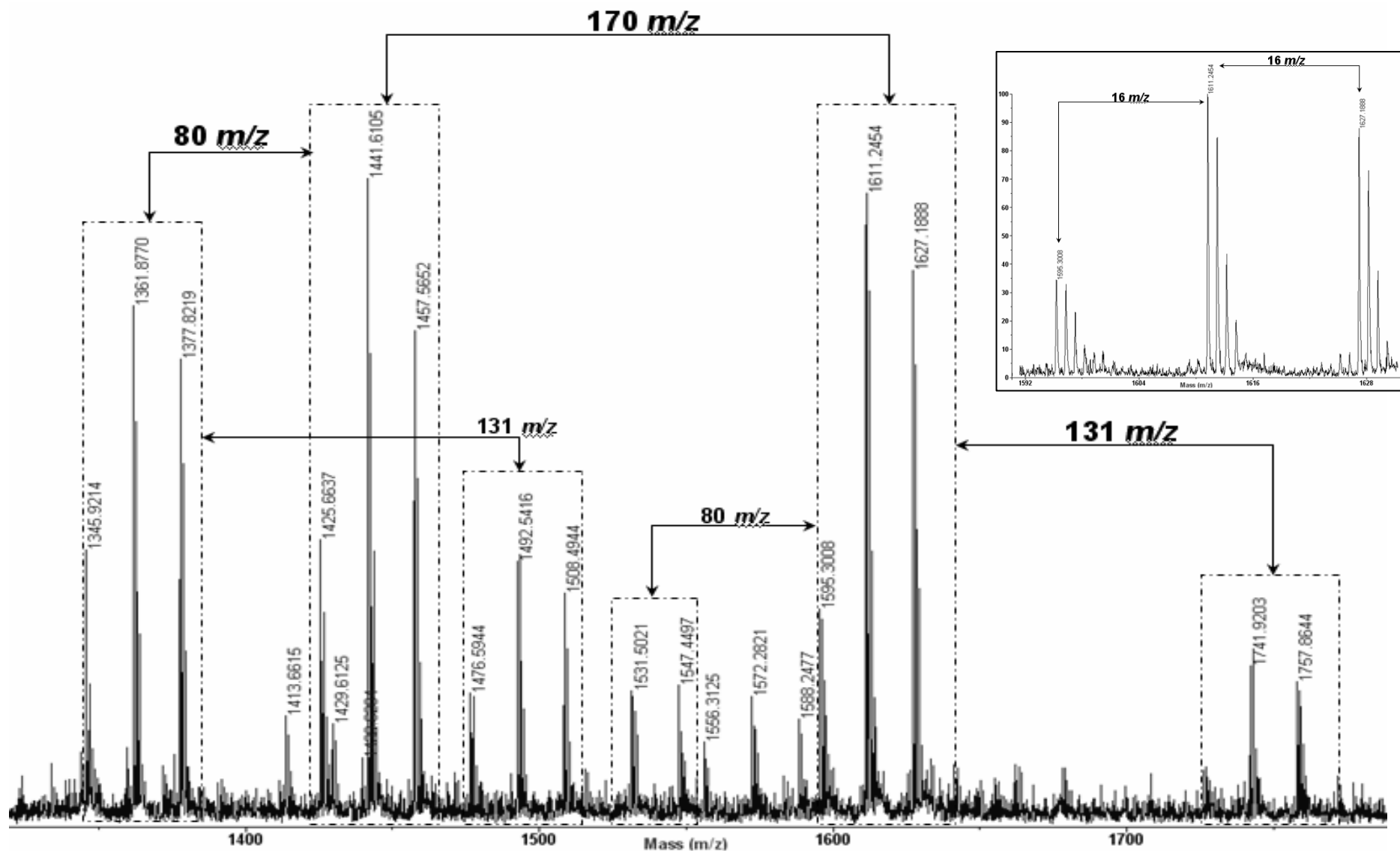


FIGURA 40. Espectro de MALDI-TOF no modo negativo do lipídeo-A de *H. seropedicae* SmR1. O inserto mostra em detalhes a diferença de massa no grupamento de íons correspondente ao lipídeo-A hexa-acetilado. Matriz utilizada: THAP.

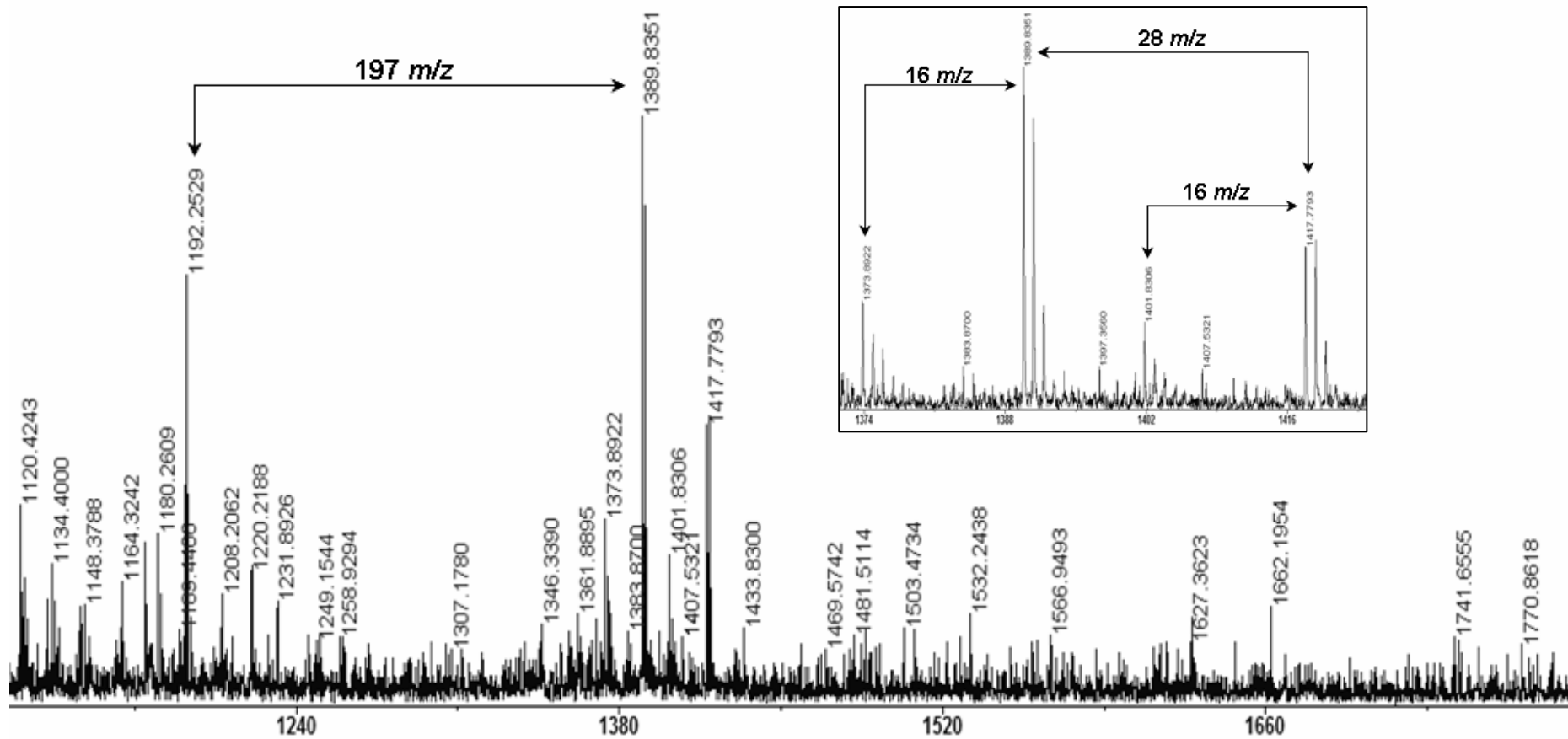


FIGURA 41. Espectro de MALDI-TOF no modo negativo do lipídeo-A da estirpe mutante RAMEBB de *H. seropedicae*. O inserto mostra a diferença de massa molecular, indicando a variabilidade de estruturas de lipídeo-A presente nos mutantes. Matriz utilizada: THAP.

As frações contendo lipídeo-A das três estirpes foram submetidas à de-O-acilação utilizando hidrazina anidra como descrito. Essa reação remove especificamente os ácidos graxos ligados por ligações do tipo éster, desta forma os ácidos graxos ligados por ligações do tipo amida permanecem ligados à estrutura. Após a de-O-acilação que formou os lipídeos-A de-O-acilados, foi realizada a análise de composição através dos derivados per-O-TMS (FIGURA 42) e FAME. A análise dos derivados per-O-TMS revelou que o lipídeo-A de-O-acilado da estirpe selvagem (SmR1) possuía em sua composição GlcNAc e 4-N-Ara como constituintes monossacarídicos. O único ácido graxo encontrado foi β OH-C_{12:0}, comprovando que esse é o ácido graxo ligado às duas unidades de GlcNAc por ligação do tipo amida. A presença das unidades de 4-N-Ara na composição comprova que esse monossacarídeo está de alguma forma ligado às unidades de GlcNAc na estirpe SmR1. A composição dos derivados per-O-TMS encontrada para o lipídeo-A de-O-acilado de ambos os mutantes (RAMEBB e RAMEBC) revelou a presença de β OH-C_{12:0} como ácido graxo constituinte da estrutura. Estranhamente foi encontrada grande quantidade de heptose na estrutura. Esse monossacarídeo é comumente encontrado no núcleo interno dos LPS, mas não na porção lipídeo-A.

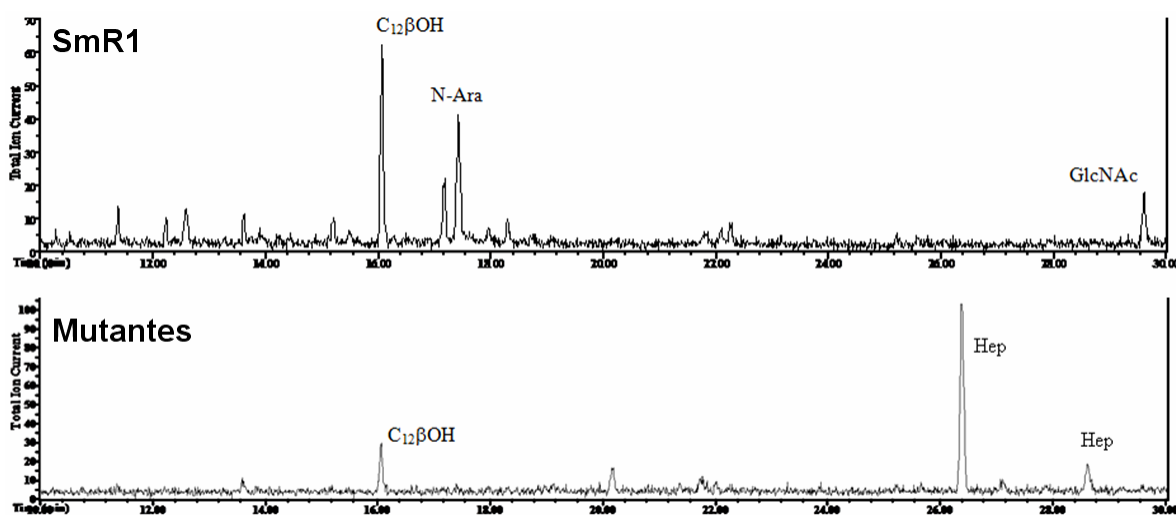


FIGURA 42. Cromatograma dos derivados per-O-TMS mostrando a composição monossacarídica e de ácidos graxos das frações lipídeo-A de-O-acilado da estirpe SmR1 e de ambos os mutantes de *H. seropedicae*.

A análise de MALDI-TOF em modo negativo dos lipídeos-A de-O-acilados mostrou uma menor complexidade de sinais em relação às análises dos lipídeos-A intactos. Para SmR1, foi observado um íon principal em m/z 896, bem como diferenças de unidades de massa iguais a m/z 80 e m/z 131, revelando a presença de grupamentos fosfato ($-PO_3$) e unidades de 4-N-Ara respectivamente. Em conjunto com os dados de composição obtidos para os lipídeos-A de-O-acilados, foi possível determinar que o íon principal em m/z 896 corresponde à estrutura mostrada abaixo (FIGURA 43).

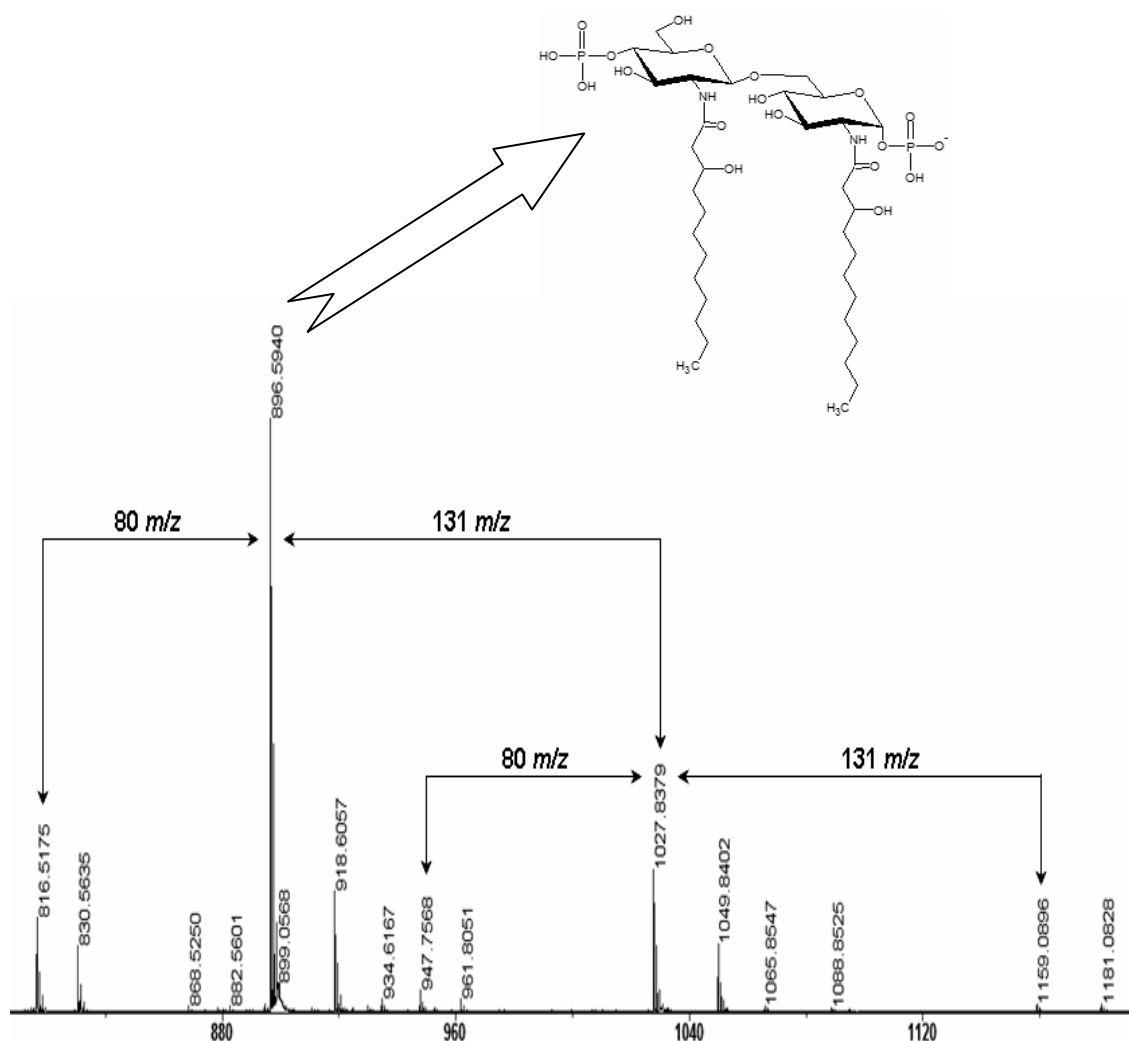


FIGURA 43. Espectro de MALDI-TOF em modo negativo do lipídeo-A de-O-acilado da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*.

Considerando a presença das unidades de 4-N-Ara na estrutura do lipídeo-A de SmR1 indicada pelas análises de composição e pela diferença de 131 m/z no espectro de MALDI-TOF, bem como o perfil de fragmentação dos íons no

espectro, foi possível determinar que estas unidades ligam-se à ambos os grupamento fosfatos. O sinal em m/z 1159, portanto, é representativo da estrutura fina do lipídeo-A de SmR1, desprovido dos ácidos graxos *O*-ligados (FIGURA 44).

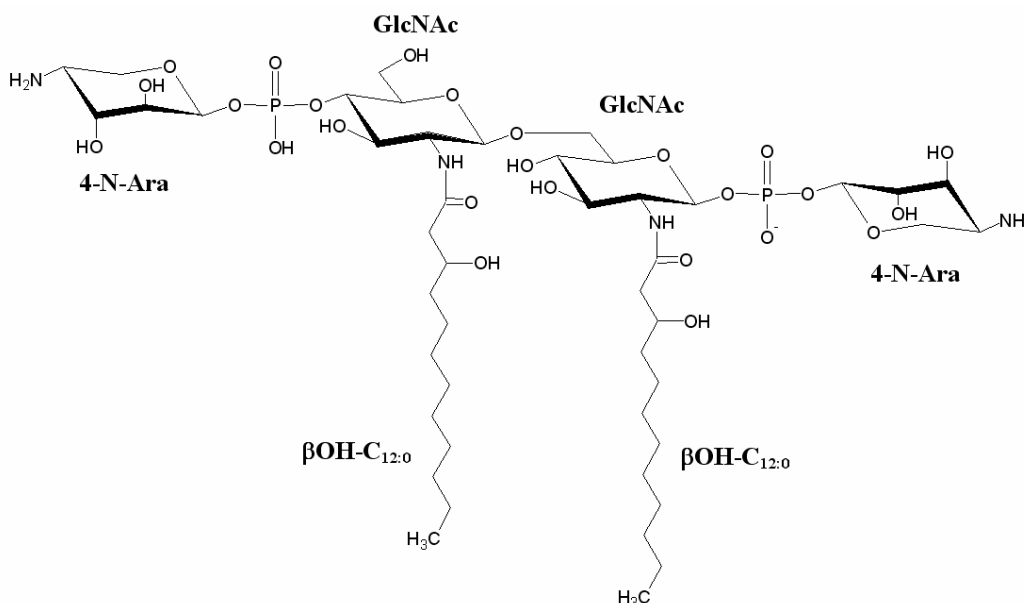


FIGURA 44. Estrutura de-*O*-acilada do lipídeo-A produzido por *H. seropedicae* SmR1.

O espectro de MALDI-TOF do lipídeo-A de-*O*-acilado obtido para ambos os mutantes mostrou o íon em m/z 896 (FIGURA 45), correspondente à mesma estrutura básica presente na estirpe selvagem. Apesar de não ter sido observada a presença de 4-N-Ara através da análise de composição por derivados per-*O*-TMS, foi observada a diferença de m/z 131 no espectro. Possivelmente este monossacarídeo esteja presente em pequenas quantidades, uma vez que o sinal em m/z 1027 aparece bastante pequeno no espectro, e sendo representativo da presença de apenas uma unidade de 4-N-Ara. Não foi encontrado sinal em m/z 1159, como visto para SmR1. Aparentemente, foi encontrada apenas uma unidade de fosfato substituinte, uma vez que a diferença de m/z 80 foi observada apenas entre íons m/z 816 e 896. O sinal mais intenso encontrado no espectro apareceu em m/z 830, contudo, não foi possível determinar nenhuma correlação desse sinal com os demais. A estranha presença de unidades de Hep nessa fração, como determinado na composição por derivados per-*O*-TMS, pode ser de

alguma forma relacionada com esse sinal, porém, também não foram encontradas correlações entre a perda de massa de uma unidade de Hep (m/z 192) com o sinal em m/z 830.

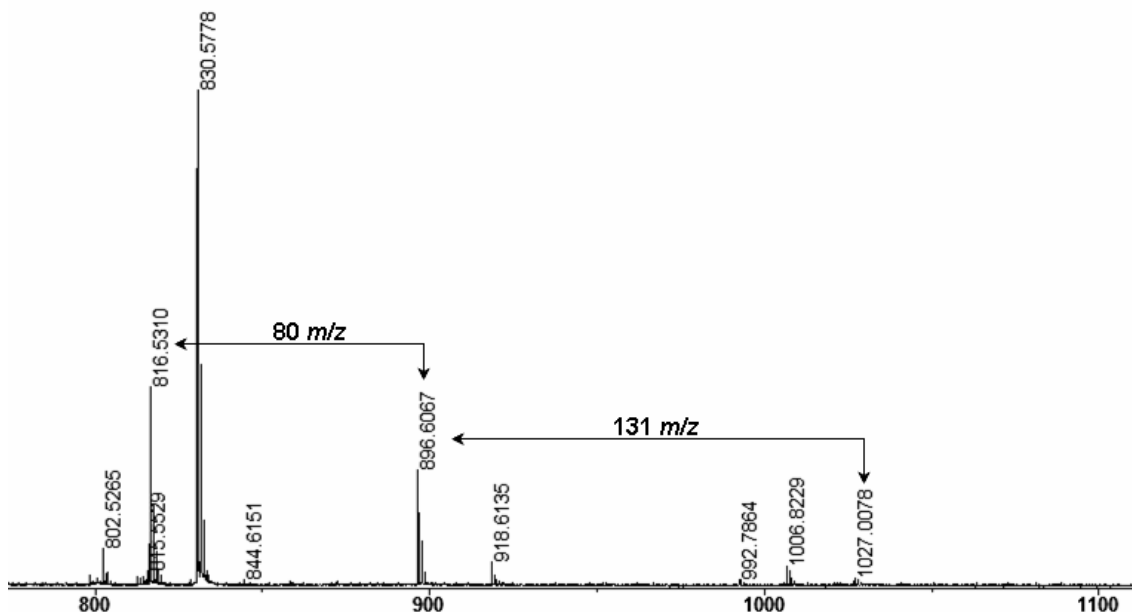


FIGURA 45. Espectro de MALDI-TOF em modo negativo do lipídeo-A de-O- acilado da estirpe mutante RAMEBB de *H. seropedicae*. Matriz utilizada: THAP.

A confirmação da estrutura básica dos lipídeo-A das três estirpes foi realizada por análise de MALDI-TOF em modo negativo dos lipídeos-A defosforilados após tratamento com ácido fluorídrico como descrito. A remoção dos grupamentos fosfato promoveu também a remoção das unidades de 4-N-Ara, confirmando que estas ligavam-se à estrutura do lipídeo-A através dos fosfatos. Tanto para a estirpe selvagem (SmR1) quanto para ambos os mutantes (RAMEBB e RAMEBC), foram encontrados sinais em m/z 736, correspondentes à duas unidades de GlcNAc, cada uma substituída uma unidades de β OH-C_{12:0} através de ligações do tipo amida. (FIGURA 46).

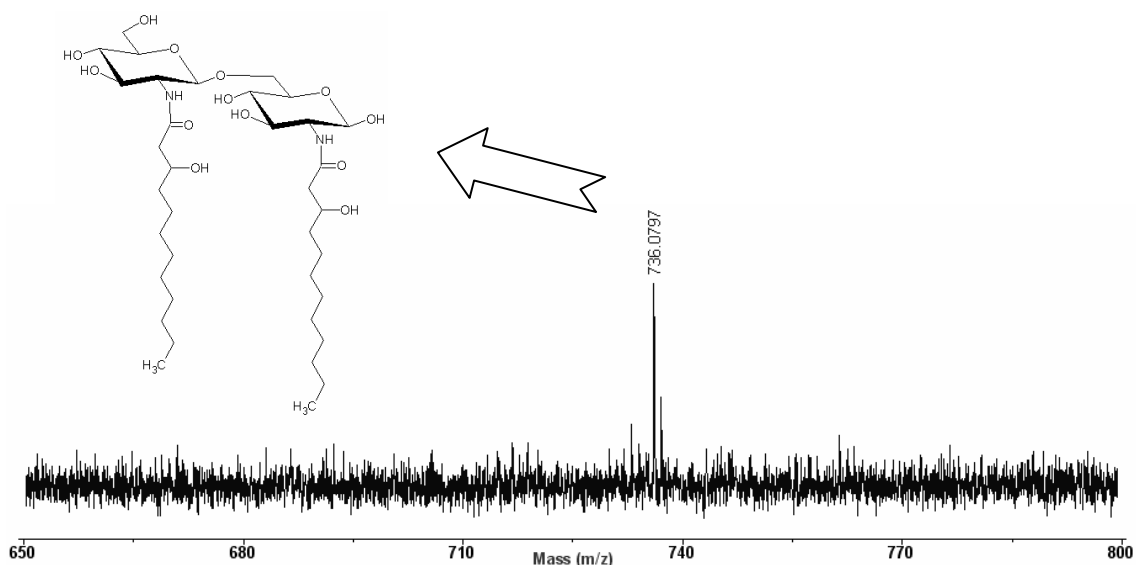


FIGURA 46. Espectro de MALDI-TOF em modo negativo do lipídeo-A de-O-acilado e desfosforilado de *H. seropedicae*. (Representativo para a estirpe selvagem e para ambos os mutantes).

4.7.2. Caracterização Estrutural dos Oligossacarídeos Isolados dos LPS de *H. seropedicae* SmR1 e dos Mutantes RAMEBB e RAMEBC

Após o processo de hidrólise branda dos LPS obtidos nas frações fenólicas de SmR1, RAMEBB e RAMEBC, os oligossacarídeos resultantes foram recuperados como material solúvel após a centrifugação para remoção da porção lipídeo-A. A análise de composição monossacarídica desses oligossacarídeos, obtidos das três estirpes de *H. seropedicae*, revelou diferenças bastante grandes entre a estirpe selvagem (SmR1) e os mutantes (RAMEBB e RAMEBC). Os cromatogramas na figura 47 mostram os derivados per-O-TMS encontrados nessa análise. Quantidades significativas de Rha foram encontradas para a estirpe SmR1, e, como esperado, ambos os mutantes mostraram-se desprovidos desta unidade monossacarídica. Além desta, unidades de Kdo, Glc, GlcNAc e 4-N-Ara foram encontradas para a estirpe selvagem, uma composição bastante diferente daquela encontrada para os oligossacarídeos dos mutantes que apresentaram grande quantidade de Hep, além de Gal, QuiNAc e Man. De fato, a única similaridade entre a composição encontrada para SmR1 e para os mutantes foi a presença de pequenas quantidades de 4-N-Ara.

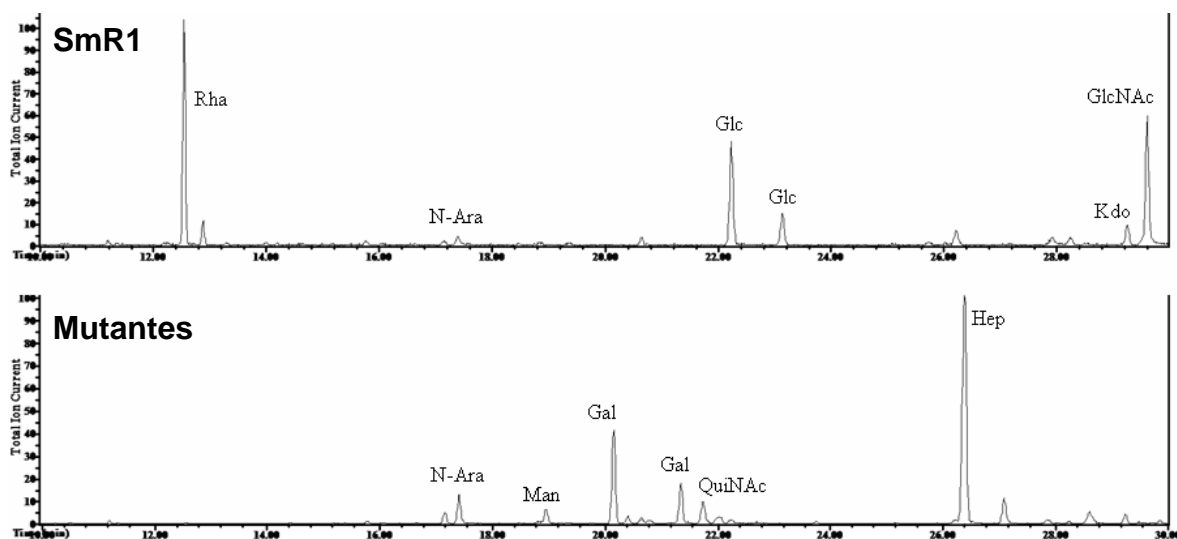


FIGURA 47. Cromatogramas dos derivados per-O-TMS obtidos da porção oligossacarídica dos LPS de SmR1 e dos mutantes de *H. seropedicae*.

Todas as frações oligossacarídicas foram também avaliadas quanto a sua composição utilizando derivados alditol acetato, que revela apenas as unidades neutras, porém com maior confiabilidade. A tabela 20 sumariza a quantificação dos derivados per-O-TMS e alditol acetatos encontrados para os oligossacarídeos de *H. seropedicae*, estirpes SmR1, RAMEBB e RAMEBC.

TABELA 20. Composição por derivados AA e per-O-TMS dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise branda dos LPS de SmR1 e dos mutantes de *H. seropedicae*.

	per-O-TMS			Alditol Acetato		
	SmR1	RAMEBB	RAMEBC	SmR1	RAMEBB	RAMEBC
Rha	35,9	-	-	39,1	-	-
4-N-Ara	2,1	7,3	7,6	-	-	-
Man	-	2,8	3,4	-	5,2	7,0
Gal	-	24,7	26,6	-	33,0	35,7
QuiNAc	-	4,8	5,1	-	3,1	8,7
Glc	27,5	-	-	29,9	-	-
Hep	-	60,5	57,3	-	58,7	48,6
Kdo	6,2	-	-	-	-	-
GlcNAc	28,5	-	-	31,0	-	-

* Valores mostrados em mol% relativo à soma das áreas dos sinais encontrados no GC-MS.

A mistura de oligossacarídeos obtida para cada estirpe foi purificada por coluna de gel filtração em Sephacryl S-100 utilizando 50 mM de formato de amônio como eluente como descrito. Após eluição dos oligossacarídeos foram obtidas cinco frações purificadas para cada estirpe. Os perfis de eluição para ambos os mutantes foram praticamente idênticos. As frações I de cada estirpe foram subdivididas em subfrações, sendo três subfrações para SmR1 (I-A, I-B e I-C) e duas subfrações para os mutantes (I-A e I-B). A figura 48 mostra o perfil de eluição dos oligossacarídeos de cada estirpe.

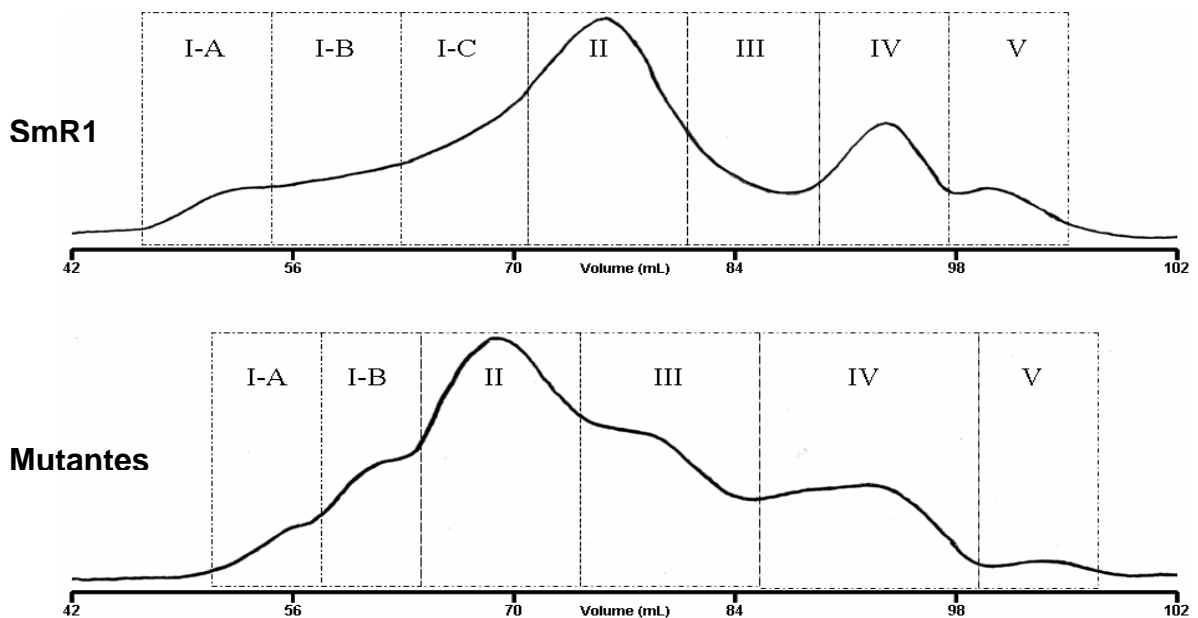


FIGURA 48. Perfil cromatográfico em coluna Sephacryl S-100 dos oligossacarídeos obtidos após hidrólise branda dos LPS de SmR1 e do mutante RAMEBB de *H. seropedicae* (Representativo para o mutante RAMEBC).

As frações II e IV das três estirpes foram selecionadas pelos seus perfis cromatográficos e foram submetidas à derivatização para terem sua composição determinada (TABELA 21). A fração II de SmR1 apresentou Rha, Glc e GlcNAc em sua composição, enquanto que a fração IV desta estirpe apresentou apenas Glc e GlcNAc. Ambas as frações obtidas para cada estirpe mutante apresentaram grande quantidade de Hep em suas composições, além de quantidades significativas de Gal. Interessantemente, a fração II, tanto de RAMEBB quanto de

RAMEBC mostrou conter QuiNAc, enquanto que a fração IV de ambos os mutantes apresentaram 4-N-Ara em suas composições.

TABELA 21. Derivados per-O-TMS dos oligossacarídeos obtidos após fracionamento em Sephacryl S-100 da porção O-antígeno dos LPS extraídos na fração fenólica das células de SmR1, RAMEBB e RAMEBC.

	Frações Oligossacarídicas					
	SmR1		RAMEBB		RAMEBC	
	II	IV	II	IV	II	IV
Rha	33,2	-	-	-	-	-
4-N-Ara	-	-	-	19,7	-	21,8
Gal	-	-	26,5	13,9	23,8	10,9
QuiNAc	-	-	7,2	-	9,2	-
Glc	52,9	84,3	-	-	-	-
Hep	-	-	66,3	66,4	67,0	67,3
GlcNAc	13,9	15,7	-	-	-	-

* Valores mostrados em mol% relativo à soma das áreas dos sinais encontrados no GC-MS.

Análises por MALDI-TOF em modo positivo foram possíveis somente para as fração II e IV de SmR1 uma vez que os espectros obtidos para as outras frações oligossacarídicas dos mutantes não apresentaram uma resposta adequada. Para a fração II (FIGURA 49) o sinal base foi encontrado em m/z 1750, correspondendo à massa aproximada de um decassacarídeo, sendo sua forma dissodiada encontrada em m/z 1772. Foi possível observar uma possível fosforilação desse oligossacarídeo, uma vez que foram encontrados sinais em m/z 1830 e m/z 1670 com diferenças correspondentes à adição e subtração destes substituintes (m/z 80) respectivamente. O sinal em m/z 1708 sugere também a presença de grupamentos O-acetil na molécula, por apresentar uma diferença de m/z 42 em relação ao sinal base. A fração IV (FIGURA 50) apresentou o sinal base em m/z 877, possivelmente correspondendo à um pentassacarídeo. À partir deste sinal foi encontrada uma diferença de 146 unidades de massa, correspondente à uma unidade de rhamnose, que gerou o íon encontrado em m/z 731. Aparentemente, várias substituições por grupamentos O-acetil encontram-se presentes nessa fração, uma vez a diferença de 42 unidades de massa foi observada diversas vezes.

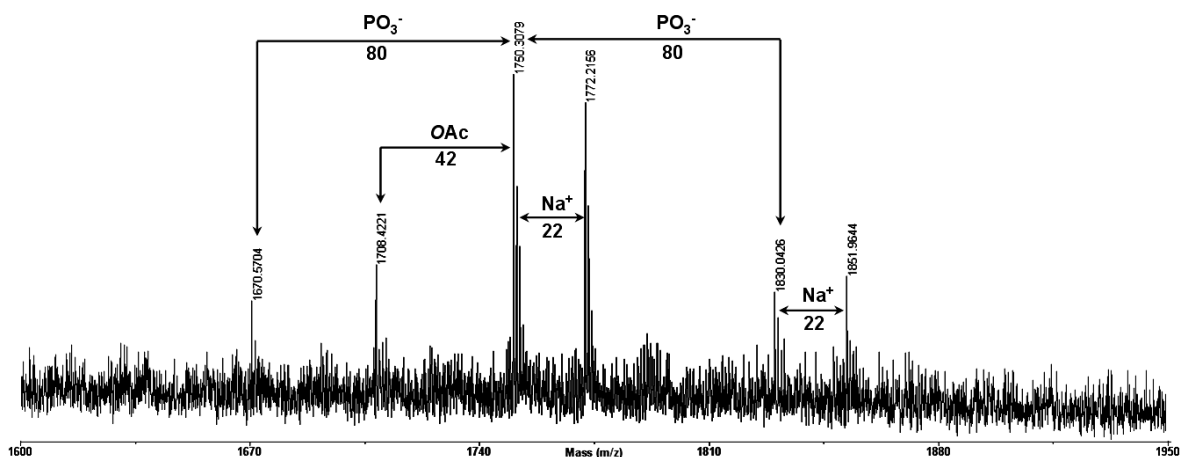


FIGURA 49. Espectro de MALDI-TOF em modo positivo da fração II dos oligossacarídeos de SmR1 isolados em coluna Sephacryl S-100. Matriz utilizada: DHB

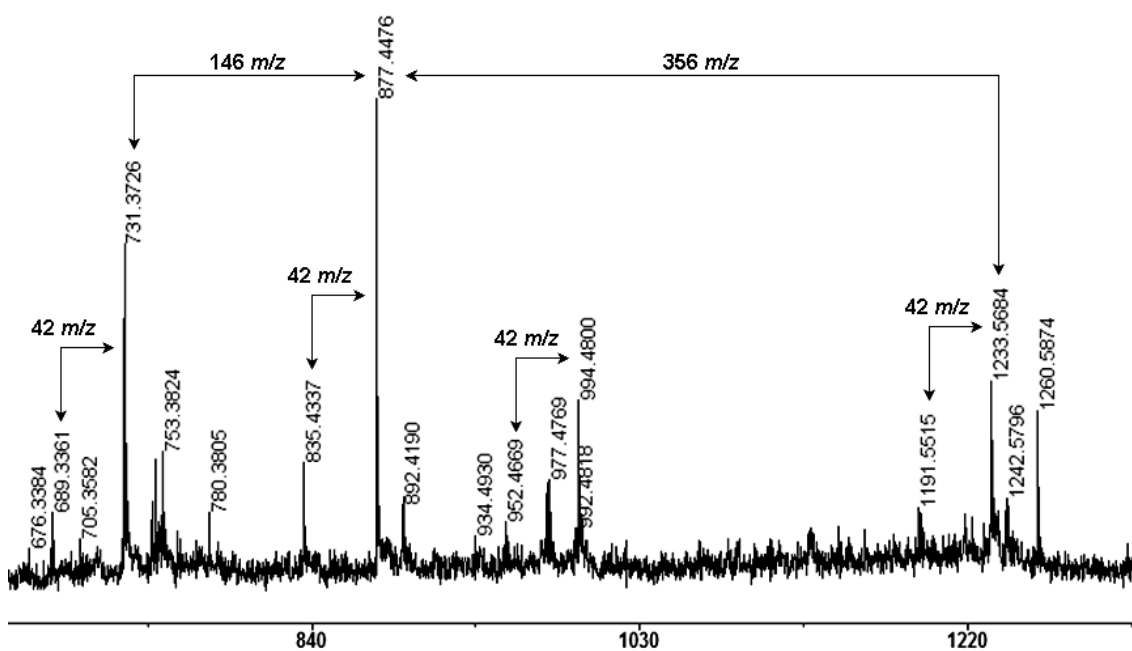


FIGURA 50. Espectro de MALDI-TOF em modo positivo da fração IV dos oligossacarídeos de SmR1 isolados em coluna Sephacryl S-100. Matriz utilizada: DHB.

Análises mais detalhadas das frações oligossacarídicas não puderam ser realizadas devido à pequena quantidade de material isolado. Entretanto, as diferenças observadas na composição das frações revelam que as estirpes

mutantes RAMEBB e RAMEBC apresentam uma região O-antígeno bastante diferentes da estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1. Essa diferença pode ser considerada quando observado o fenótipo de adesão dessas células às raízes de milho. Os mutantes RAMEBB e RAMEBC de *H. seropedicae* apresentam uma capacidade de adesão 100 vezes menor em relação à estirpe selvagem SmR1³.

4.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi o primeiro de uma nova linha de pesquisa no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, sendo fruto de uma colaboração entre o Laboratório de Química de Carboidratos e o Núcleo de Fixação de Nitrogênio, dois grupos com nível de excelência em pesquisa científica. Pela primeira vez foram analisadas as estruturas dos EPS produzidos por *Herbaspirillum*, ainda não descritas na literatura para nenhuma das espécies deste gênero.

A realização da modelagem molecular *in silico* do EPS produzido por *Burkholderia tropica* Ppe8, também é uma novidade nesse trabalho, e mostrou-se ser uma ferramenta interessante na análise de distribuição espacial de polissacarídeos e de seus substituintes. Sem dúvida essa metodologia é de extrema importância para o entendimento do íntimo relacionamento intermolecular que ocorre no processo de interação planta-bactéria.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam ainda a complexidade estrutural dos LPS de *H. seropedicae*, bem como as diferenças estruturais causadas pela deficiência na biossíntese de rhamnose. Apesar da reação específica de transposon para os genes *rmIB* e *rmIC*, o efeito causado pela inativação desses genes certamente afeta outras vias relacionadas aos demais açúcares na célula bacteriana. A diferença observada na composição do LPS dos mutantes, especialmente na porção O-antígeno, é reflexo desta drástica alteração.

Este trabalho revela apenas uma pequena fração do potencial que há no estudo estrutural de EPS e LPS produzido por diazotrofos, e, certamente, serviu para fortalecer a colaboração entre os grupos para a continuação desta linha de pesquisa.

³ BALSANELLI, E. et al. (resumo) Analysis of *rmIB* and *rmIC* mutant strains of *Herbaspirillum seropedicae*. Anais da XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

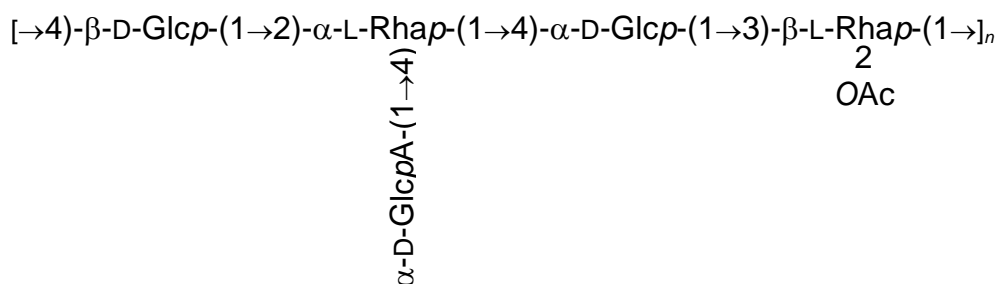
- Das estirpes avaliadas pelo crescimento em meio sólido contendo calcofluor (200 µg/L), foi possível observar que quantidades consideráveis de EPS foram produzidas apenas pelas espécies do gênero *Burkholderia* quando crescidas em meio JMV. As estirpes de *Herbaspirillum* apresentaram menor intensidade de fluorescência

- O crescimento e produção de EPS por *H. seropedicae* SmR1 não foi influenciado pela presença dos flavonóides naringenina e quercitina no meio NFb malato em nenhuma das concentrações utilizadas.

- A composição de carboidratos encontrada nos meios de cultura após crescimento de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em meio NFb malato, revelou uma grande variabilidade entre essas duas espécies. Alguma variabilidade também foi encontrada em diferentes estirpes dentro da mesma espécie de *Herbaspirillum*. Ambas as estirpes de *Burkholderia* analisadas apresentaram, contudo, uma composição bastante semelhante de carboidratos encontrados no meio de cultura após crescimento em JMV.

- Os resultados de microscopia fluorescente das células de *H. seropedicae* SmR1 (RAM4) crescidas em meio NFb na presença de calcofluor, mostraram uma abundante presença de polissacarídeos na superfície celular, bem como a possível presença de modestas quantidades de EPS produzidos por essa estirpe.

- A compilação dos dados de composição, análise de ligação glicosídica, RMN e MALDI-TOF revelou que o EPS produzido pelo diazotrofo *B. tropica* Ppe8 possui a estrutura do pentassacarídeo repetitivo mostrada abaixo:



- A modelagem molecular do EPS produzido por *B. tropica* Ppe8 revelou que as unidades de GlcA e os grupamentos O-acetil encontram-se preferencialmente expostos ao ambiente, podendo ser importantes locais de reconhecimento destes EPS pelo hospedeiro no processo de interação planta-bactéria.
- O EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7 apresentou-se insolúvel em meio aquoso e com uma complexidade estrutural bastante grande, contendo Rha, Glc e All em sua composição na razão molar de 1:1:1 em diversas combinações de ligação glicosídica. A análise de MALDI-TOF dos oligossacarídeos obtidos da hidrólise parcial do EPS revelaram que parte deste pode ser formado pela sequência Hex–Hex–Rha–Hex–Hex–Hex–Rha, onde Hex pode representar unidades de Glc ou All.
- As análises estruturais dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* BA10 e BA16 mostraram que ambos são formados por Rha, Glc, Gal e All na razão molar de 2:2:2:1 respectivamente. Estes diferenciam-se do EPS produzido por *H. rubrisubalbicans* AB7 principalmente pela presença de Gal na estrutura.
- Os perfis em DOC-PAGE dos LPS obtidos após o processo de extração fenol-água realizado nas diferentes estirpes de *Herbaspirillum* mostraram que os LPS foram extraídos principalmente na fração fenólica. O rendimento das frações em comparação com o peso seco das células, entretanto, foi maior para as frações aquosas.
- As estirpes mutantes de *H. seropedicae*, RAMEBB e RAMEBC, apresentaram perfis eletroforéticos de LPS bastante alterados em relação à estirpe SmR1. A composição dos LPS extraídos na fase fenólica também mostrou-se bastante diferente para os mutantes. A presença de Rha na composição de SmR1 e a consequente ausência desse monossacarídeo na composição de ambos os mutantes é uma possível indicação da alteração da biossíntese de açúcares em decorrência da inativação dos genes *rmIB* e *rmIC*.

- A grande quantidade de Hep encontrada na composição dos LPS das estirpes RAMEBB e RAMEBC de *H. seropedicae*, bem como a ausência de Kdo, Glc e GlcNAc também refletem a dramática alteração do metabolismo de carboidratos nesse diazotrofo pela inativação dos genes responsáveis pela biossíntese da Rha. Entretanto, a fosforilação de unidades monossacarídicas pode estar escondendo a real composição dos LPS destas estirpes.

- A estrutura básica da porção lipídeo-A de *H. seropedicae* SmR1 e de ambos os mutantes mostrou-se inalterada. Todas apresentaram o dissacarídeo fosforilado $\text{PO}_3\text{-GlcNAc-(1}\rightarrow\text{6)-GlcNAc-PO}_3$ com a presença de $\beta\text{OH-C}_{12:0}$ em cada unidade de GlcNAc ligados por ligações do tipo amida

- Dados de composição e MALDI-TOF revelaram que a porção lipídeo-A do LPS de *H. seropedicae* SmR1 possui unidades de 4-N-Ara ligadas aos grupamentos fosfato da estrutura. Essas unidades foram encontradas em quantidades reduzidas na porção lipídeo-A dos LPS dos mutantes RAMEBB e RAMEBC.

- Os dados obtidos para a porção O-antígeno dos LPS de *H. seropedicae* SmR1, RAMEBB e RAMEBC mostraram que esta foi a região mais afetada pela mutação dos genes *rmIB* e *rmIC* respectivamente, devido à grande diferença de composição observada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M.H.; HEULIN, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from versitol microagregates in Martinique. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 2, p. 787-794, 1999
- ALI, T.; WEINTRAUB, A.; WIDMALM, G. Structural determination of the O-antigenic polysaccharide from *Escherichia coli* O166. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 274-278, 2007
- ALVES, P.S.A. (1991) Efeito de alguns nutrientes na formação da goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LMI-3. **Tese de Mestrado**, Rio de Janeiro, Instituto de Química, UFRJ
- AN, J.; CARLSON, R.W.; GLUSHKA, J.; STREETER, J.G. The structure of a novel polysaccharide produced by *Bradyrhizobium* species within soybean nodules. **Carbohydr. Res.**, v. 269, p. 303-317, 1995
- ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **App. Environ. Microbiol.**, v. 19, p. 253-260, 1993.
- ASPINALL, G.O. (1970) Other carbohydrate containing macromolecules. In: **Polysaccharides**, Ed. G.O. ASPINALL, Pergamon Press, pp. 223.
- AYERS, A.R.; AYERS, S.B.; GOODMAN, R.N. Extracellular Polysaccharide of *Erwinia amylovora*: a Correlation with Virulence, **Appl. Environ. Microbiol.**, v 38, p. 659-666, 1979
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREIDER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov.: A root-associated nitrogen-fixing bacterium, **Int. J. syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986
- BALDANI, J.I.; POR, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 46, n.3, p. 802-810, 1996
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumen plants. **Soil Biol. Biochem.**, Bethesda, v. 29, n. 5, p. 911-922, 1997

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v.13, p. 65-73, 1992

BALDANI, V.L.D. (1996) Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. **Tese de Doutorado**, Seropédica, RJ, UFRRJ.

BARRAQUIO, W.L.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 867-873, 1983.

BATTISTI, L.; LARA, J.C.; LEIGH, J.A. Specific oligosaccharide of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodules invasion in alfafa. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 5625-5629, 1992

BAYER, E.M.; BAYER, M.H. Biophysical and structural aspect of the bacterial capsule. **ASM News**, v. 60, p. 192-198, 1994

BEHRENDT, U.; ULRICH, A.; SCHUMANN, P.; ERLER, W.; BURGHARDT, J.; SEYFARTG, W. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 297-308, 1999

BEJAR, V.; LLAMAS, V.; CALVO, C.; QUESADA, E. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. **J. Biotech.**, v. 61, p. 135-141, 1998

BEVERIDGE, T.J.; GRAHAM, L. Surface layers of bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 684-705, 1991

BHAT, U.R.; CARLSON, R.W. Chemical characterization of pH-dependent structural epitopes of lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2230-2235, 1992

BHAT, U.R.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 14402-14410, 1994

BORGES, C.D.; MOREIRA, A.N.; MOREIRA, A.S.; DEL PINO, F.A.B.; VENDRUSCOLO, C.T. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 327-332, 2004

BREEDVELD, M.W.; HADLEY, J.A.; MILLER, K.J. A novel cyclic β -1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 6346-6351, 1995

BRETT, P.J.; DeSHAZER, D.; WOODS, D.E. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. **Epidemiol. Infect.**, v. 118, p. 137-148, 1997

BRETT, P.J.; DeSHAZER, D.; WOODS, D.E. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 1, p. 317-320, 1998

BURDMAN, S.; JURKEVICH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, v. 144, p. 1989-1999, 1998

BURDMAN, S., JURKEVICH, E., SORIA-DÍAZ, M. E., SERRANO, A. M. G., OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 189, p. 259-264, 2000

BURKHOLDER, Wh. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**. St. Paul, v. 40, p. 115-117, 1950

CARLSON, R.W.; SHATTERS, R.; DUH, J.L.; TURNBULL, E.; HANLEY, B.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC, M.A. The isolation and partial characterization of the lipopolysaccharide from several *Rhizobium trifolii* mutants affected in root hair infection. **Plant Physiol.**, v. 84, p., 421-427, 1987a

CARLSON, R.W.; KALEMBASA, S., TUROWSKI, D.; PACHORI, P.; NOEL, K.D. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 4923-4928, 1987b

CARLSON, R.W.; REUHS, B.; CHEN, T.B.; BHAT, U.R.; NOEL, K.D. Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 11783-11788, 1995

CARLSON, R.W.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; KANNENBERG, E.L. (1999) Rhizobial cell surface carbohydrates: their structures, biosynthesis, and functions, In: **Genetics of bacterial polysaccharides**. Ed. J.B. GOLDBERG, Ann Arbor Press, Ann Arbor, p. 53-90

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 2431-2447, 2003

CASTRO, C.; BEDINI, E., NUNZIATA, R.; RINALDI, R.; MANGONI, L.; PARRILLI, M. Elucidation of the O-chain structure from the lipopolysaccharide of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 1891-1894, 2003

CASTRO, C.; BEDINI, E.; GAROZZO, D.; STURIALE, L.; PARRILLI, M. Structural determination of the O-chain moieties of the lipopolysaccharide fraction from *Agrobacterium radiobacter* DSM 30147. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 18, p. 3842–3849, 2004

CÉRANTOLA, S.; MONTROZIER, H. Production in vitro, on different solid culture media, of two distinct exopolysaccharides by a mucoid clinical strain of *Burkholderia cepacia* **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, p. 129-133, 2001

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by acidic lactic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 87, p. 113-130, 1990

CHOU, F.L.; CHOU, H.C.; LIN, Y.S.; YANG, B.Y.; LIN, N.T.; WENG, S.F. TSENG, Y.H. The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 233, p. 265-269, 1997

CHOUDHURY, B.; CARLSON, R.W.; GOLDBERG, J.B. The structure of the lipopolysaccharide from a *galU* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* serogroup-O11. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2761-2772, 2005

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

CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugar-cane in Luisiana. **J. Agricult. Res.**, v. 41, p. 256, 1932

CIUCANU, J., KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 13, p. 209-217, 1984

COLLINS, P.M.; FERRIER, R.J. (1995) **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**, p. 463 - 524, Ed. John Wiley & Sons

COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M.; MORRIS, V. J. NMR studies of acetan and the related bacterial polysaccharide, CR1/4, produced by a mutant strain of *Acetobacter xilinum*. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1995

CORZO, J.; PÉRES-GALDONA, R.; LEÓN-BARRIOS, M.; GUTIÉRREZ-NAVARRO, A.M.; Alcian blue fixation allows silver staining of the isolated polysaccharide component of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 12, p. 439-441, 1991

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESY, G.G.; LADD, T.L.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435-464, 1987

COSTERTON, J.W.; LAWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial Biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* sp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **App. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2375-2379, 2001

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W. GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998

DAZZO, F.B.; TRUCHET, J.E.; SHERWOOD, E.M.; HRABAK, M.; ABE, M.; PANKRATZ, S.H. Specific phases of root hair attachment in *Rhizobium trifolii* clover symbiosis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, p. 1140-1150, 1984

DENNY, T. Involvement of bacterial exopolysaccharides in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 33, p. 173-197, 1995

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-216, 1961

DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; LAZARINI, A.C. (1988) New N₂ fixing bacteria in association with cereals and suga-cane. In: **Nitrogen fixation: hundred years after**. Ed. H. BOTHE, F.J. DE BRUJIN, W.E. NEWTON. Stuttgart, Fischer, p. 717-722.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1992

DUBOIS, M.; GILLERS, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microb. Infect.**, v. 4, p. 837-851, 2002

ERTESVAG, E.; VALLA, S. Biosynthesis and application of alginates. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 59, p. 85-91, 1998

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. (1992) Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: **Biological Nitrogen Fixation** Ed. G. STACEY; R.H. BURRIS; H.J. EVANS. New York: Chapman and Hall, p. 1-42.

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

FEDONENKO, Y.P.; ZATONSKY, G.V.; KONNOVA, S.A.; ZDOROVENKO, E.L.; IGNATOV, V.V. Structure of the O-specific polysaccharide of the

lipopolisaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 869-872, 2002

FETT, W.F.; WELLS, J.M.; CESCUTI, P.; WIJEL, C. Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent *Pseudomonas* associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 513-517, 1995

FONTAINE, T.; STPHAN, M.P.; DEBARBIEUX, L.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Lipopolysaccharides from six strains of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 132, p. 45-50, 1995

FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 2747-2757, 1998

FORSBERG, L.S.; BAHT, U.R.; CARLSON, R.W. Structural Characterization of the O-antigenic Polysaccharide of the Lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* Strain CE3: a unique O-acetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6-deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-methyl-L-fucose. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 18851-18863, 2000

FRANCO, A. A.; DOBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 20, p. 68-74, 1994

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

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERTERS, K. (1991) Taxonomy relationship between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and *Aquaspirillum autotrophicus*. In: **Nitrogen Fixation**, Ed. M. POLSINELLI, R. MATEREASSI, M. VICENZINI, Dordrecht: Klumer Acad. Publis., p. 292-294

GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyfasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and the proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **Int. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 274-289, 1995

GIL-SERRANO, A.M.; GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, I.; MATEO, P.T.; BERNABÉ, M.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; MEGIAS, M.; ROMERO-VÁZQUEZ, J.R. Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Carbohydr. Res.**, v. 275, p. 285-294, 1995

GLASER, L. Bacterial cell surface polysaccharides. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 42, p. 91-112, 1973

GLAZE BROOK, J.; WALKER, G.C. A Novel exopolysaccharide can function in place the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfafa by *Rhizobium meliloti*. **Cell**, v. 56, p. 661-627, 1989

GOLDMANN, D.A.; KLINGER, J.D. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **J. Pediatrics**, St. Louis, v. 108, p.806-812, 1986

GONZÁLES, J. E., REUHS, B. L.; WALKER, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 8636–8641, 1996

GOOSEN-DEROO L.; DE MAAGD R.A.; LUGTENBERG, B.J.; Antigenic changes in lipopolysaccharide I of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in root nodules of *Vicia sativa* subsp. *nigra* occur during release from infection threads. **J Bacteriol.**, v. 173, p. 3177-3183, 1991

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. **Can. J. Chem.**, v. 44, p. 993-998, 1966

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, v. 128, p. 119-132, 1984

HAAHTELA, K.; WARTIORAARA, T.; SUNDMANN, V.; SKUJINS, J. Root-associated N₂-fixation (acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 4, p. 203-206, 1981

HALE, C.N.; WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **J. Agricult. Res.**, v. 15, p. 448-456, 1972

HALVERSON, L.S.; STACEY, G. Signal exchange in plant microbial interactions. **Microbiol. Rev.**, v. 50, p. 193-225, 1986

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clin. Chim. Acta**, v. 323, p. 59-72, 2002

HISAMATSU, M.; ABE, J.; AMEMARU, A.; HARADA, A. Structural elucidation of succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium rumefaciens* Ti plasmid. **Agricult. Biol. Chem.**, v. 44, p. 1049-1055, 1980

HISAMATSU, M. Cyclic (1→2)-β-D-glucans (cyclophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. **Carbohydr. Res.**, v. 231, p. 137-146, 1992

JACOBSEN, C.S. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* DBO1 (pRO101) in 2,4D contaminated soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 189, p.139-144, 1997

JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Identification and colonization of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Botany**, v. 45, p. 757-766, 1994

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

JANSSON, P.E.; LINDBERG, A.A.; LINDBERG, B.; WOLLIN, R. Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from Enterobacteriaceae. **Eur. J. Biochem.**, v. 115, p. 571-577, 1981

JOFRÉ, E.; LAGARES, A.; MORI, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 231, p. 267-275, 2004

KANNENBERG, E.L.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. (1998) Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: **The Rhizobiaceae**. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, pp. 154

KARAPETYAN, G.; KACZYNSKI, Z.; IACOBELLIS, N.S.; EVIDENTE, A.; HOLST, O. The structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 930-934, 2006

KARUNARATNE, D.N.; RICHARDS, J.C.; HANCOCK, R.E.W. Characterization of lipid A from *Pseudomonas aeruginosa* O-antigenic B band lipopolysaccharide by 1D and 2D NMR and mass spectral analysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 299, p. 368-376, 1992

KASAI, N.; ARATA, S.; MASHIMO, J.; AKIYAMA, Y.; TANAKA, C.; EGAWA, K.; TANAKA, S. *Pseudomonas diminuta* LPS with a new endotoxic lipid A structure. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 142, p. 972-978, 1987

KASAPIS, S.; MORRIS, E.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. **Carbohydr. Polym.**, v. 23, p. 55-64, 1994

KAWAHARA, K.; DEJSIRILERT, S.; EZAKI, T. Characterisation of three capsular polysaccharides produced by *Burkholderia pseudomallei* **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 169, p. 283-287, 1998

KENNE, L.; LINDBERG, B. (1983) Bacterial Polysaccharides In: **The Polysaccharides**, Ed. G.O. ASPINALL, v. 2, p. 287-363, Academic Press.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial

species that occurs in C4-fiber plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 157-168, 2001

KOMURO, T.; GALANOS, C. Analysis of *Salmonella* lipopolysaccharides by sodium deoxycholate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v. 450, p.381-387, 1988

LADHA, J.K.; BARRAQUIO, W.L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 1301-1308, 1983

LAGATOLLA, C.; SKERLAVAJ, S.; DOLZANI, L.; TONIN, E.A.; BRAGADIN, C.M.; BOSCO, M.; RIZZO, R.; GIGLIO, L.; CESCUTTI, P. Microbiological characterisation of *Burkholderia cepacia* isolates from cystic fibrosis patients: investigation of exopolysaccharides produced **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 209, p. 99-106, 2002

LAUS, M.C.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; KIJNE, J.W. Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. **MPMI**, v. 18, p. 1123-1129, 2005

LEIGH, J. A., REED, J. W., HANKS, J. F., HIRSCH, A. M. and WALKER, G. C. *Rhizobium melioli* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. **Cell**, v. 51, p. 579-587, 1987

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

LEIGH, J.A., WALKER, G.C. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. **Trends in Genet.**, v. 10, p. 63-67, 1994

LIN, C.C.; CHEN, Y.C.; SONG, S.C.; LIN, L.P. Flavonoids as inducers of extracellular proteins and exopolysaccharides of *Sinorhizobium fredii*. **Biol. Fertil. Soils**, v. 30, p. 83-89, 1999

LINKER, A.; EVANS, L.R.; IMPALLOMENI, G. The structure of a polysaccharide from infectious strains of *Burkholderia cepacia* **Carbohydr. Res.**, v. 335, p. 45-54, 2001

LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O.; STAUBE, A.M.; NIKAIDO, H. (1971) Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: **Microbial Toxins**, Ed. G. WEINBAUM, S. KADIS, S.J. ALI, Academic Press, New York, v. 4, capítulo 4, p. 145-233.

L'VOV, V.L.; SHASHKOV, A.S.; KNIREL, Y.A.; ARIFULINA, A.E.; SENCHENKOVA, S.N.; YAKOVLEV, A.V.; DMITRIEV, B.A. Structure of the O-specific polysaccharide chain of *Shigella boydii* type 5 lipopolysaccharide: a repeated study. **Carbohydr. Res.**, v. 279, p. 183-192, 1995

MAAGD, R.A.; WIJFFELMAN, C.A. PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. (1988) Isolation and characterization of three classes of mutants of *Rhizobium leguminosarum* with altered lipopolysaccharides. In: **Nitrogen fixation: hundred years after**. Ed. H. BOTHE, F.J. DE BRUJIN, W.E. NEWTON. Stuttgart, Fischer, pp. 473-492.

MAAGD, R.A.; WIENTIES, F.B.; LUGTENBERG, B.J. Evidence for divalent cation (Ca²⁺)-stabilized oligomeric proteins and covalently bound protein-peptidoglycan complexes in the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3989-3995, 1989

MAAGD, R.A.; LUGTENBERG, B.J.J. (1989) Lipopolysaccharide: a signal in the establishment of the rhizobium/legume symbiosis?. In: **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions**. Ed. B.J.J. LUGTENBERG. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 337-344.

MARS, A.E.; HOUWING, J.; DOLFING, J.; JANSSEN, D.B. Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 62, p. 886-891, 1996

MATTHYSSE, A.G. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 13, p. 281-307, 1986

MATTOS, K.A.; JONES, C.; HEISE, N.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis* **Eur. J. Biochem**, v. 268, p. 3174-3179, 2001

MATTOS, K.A.; TODESCHINI, A.R.; HEISE, N.; JONES, C.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia brasiliensis* produces a novel yersinirose A-containing O-polysaccharide. **Glycobiology**, v. 15, p. 313-321, 2005

McCLUNG, C.R.; PATRIQUIN, D.G. Isolation of a nitrogen fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Can. J. Microbiol.**, v. 26, p. 881-886, 1980

McLOUGHLIN, F.J.; QUINN, J.P.; BETTRMANN, A.; BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, p.1760-1763, 1992

METTS, J.; WEST, J.; DOARES, S.; MATTHYSSE, A.G. Characterization of three *Agrobacterium tumefaciens* avirulent mutants with chromosomal mutations that affect induction of *vir* genes. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1080-1087, 1991

MIKHAIL, I.; YILDIRIM, H.H.; LINDAHL, E.C.; SCHWEDA, E.K. Structural characterization of lipid A from nontypeable and type f *Haemophilus influenzae*: variability of fatty acid substitution. **Anal. Biochem.**, v. 340, p. 303-316, 2005

MORAN, A.P.; SCHOLZ, D.; ZÄHRINGER, U. Application of methylation analysis in the determination of the structure of disaccharides containing 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose (GlcN3N) associated with the backbone of lipid A. **Carbohydr. Res.**, v. 231, p. 309-316, 1992

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

NOEL, K.D.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5317-5324, 2000

NOEL, K.D.; DUELLI, D.M. (2000) *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. In: **Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process**, Ed. E.W. TRIPLETT, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., pp. 415-431.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fert. Soil.**, v. 21, p. 197-200, 1996

ORGAMBIDE, G.; MONTROZIER, H.; SERVIN, P.; ROUSSEL, J.; TRIGALET-DEMERY, D.; TRIGALET, A. High heterogeneity of the exopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 8312-8321, 1991

OSMAN, S.F.; FRETT, W.F.; FISHMAN, M.L. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **J. Bacteriol.**, v. 166, p. 66-71, 1986

OVOD, V.V.; ZDOROVENKO, E.L.; SHASHKOV, A.S.; KOCHAROVA, N.A.; KNIREL, Y.A. Structural diversity of O-polysaccharides and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and other strains of genomospecies 4. **Microbiology**, v.73, p. 666-677, 2004

PACE, G.W.; RIGHELATO, R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 15, p. 41-70, 1980

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nif* A and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdã, v. 23, p. 95-101, 1984

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. (1980) **Microbiologia**, v. 1, Ed. McGraw-Hill do Brasil

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141 (1), p.13-39, 1992

PERRY, M.B.; MACLEAN, L. Structural characterization of the antigenic O-chain of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* serotype O65. **Carbohydr. Res.**, v. 322, p. 57-66, 1999

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991

PREVIATO, J.O.; JONES, C.; STEPHAN, M.P.; ALMEIDA, L.P.A.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Structure of the repeating oligosaccharide from the lipopolysaccharide of the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus* strain PAL 5. **Carbohydr. Res.**, v. 298, p. 311-318, 1997

PUEPPKE, S.G. (1984) Adsorption of bacteria to plant surfaces. In: **Plant-Microbe Interactions**. Ed. T. KOSUGE; E.W. NESTER. New York, Macmillan. pp. 215-261

QUADT-HALLMAN, A.; BENHAMOU, N.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 577-582, 1997

QUE, N.L.S.; LIN, S.; COTTER, R.J.; RAETZ, C.R.H. Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*: Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 28006-28016, 2000

RAETZ, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 129-70, 1990

RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 635-700, 1992

RAETZ, C.R.H.; REYNOLDS, C.M.; TRENT, M.S.; BISHOP, R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v.76, *in press*, 2007

RAHIM, R.; BURROWS, L.L.; MONTEIRO, M.A.; PERRY, M.B.; LAM, J.S. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 146, p. 2803-2814, 2000

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 139-144, 1998

REIS, V.M.; SANTOS, P.E.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.; SCHIMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 2155-2162, 2004

REUHS, B.L.; STEPHENS, S.B.; GELLER, D.P.; KIM, J.S.; GLENN, J.; PRZYTYCKI, J.; OJANEN-REUHS, T. Epitope identification for a panel of anti-*Sinorhizobium meliloti* monoclonal antibodies and application to the analysis of K antigens and lipopolysaccharides from bacteroids. **Appl Environ Microbiol.**, v. 65, p. 5186-5191, 1999.

RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis, **Microbiol Rev.**, v. 59, p. 124-142, 1995

RIDLEY, B.L. (2000) Plant cell wall and bacterial cell surface polysaccharides in plant-microbe interactions: the role of oligogalacturonides and lipopolysaccharides. **Tese de Doutorado**, The University of Georgia, Athens, GA, USA, pp. 159

BRENT L.R.; JEYARETNAM B.S.; CARLSON R.W. The type and yield of lipopolysaccharide from symbiotically deficient *Rhizobium* lipopolysaccharide mutants vary depending on the extraction method. **Glycobiology**, v. 10, p. 1013-1023, 2000.

ROBERSON, E.; FIRESTONE, M. Relationship between desiccatin and exopolysaccharide production by soil *Pseudomonas* sp.. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1284-1291, 1992

ROLIN, D.B.; PFEFFER, P.E.; OSMAN, S.F.; SZWERGOLD, B.S.; KAPPLER, F.; BENESI, A.J. Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1,3)(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1116, p. 215-225, 1992

RUSSA, R.; BRUNETEAU, M.; SHASHKOV, A.S.; URBANIK-SYPNIEWSKA, T.; MAYER, H. Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its nonnodulating mutant WL113. **Arch. Microbiol.**, v. 165. p. 26-33. 1996

SABRA, W. (1998) Microaerophilic production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. **Tese de Doutorado**, Fakultät der Technischen Universität Caloro-Wilhelmina, Alexandria, Egito, pp.143

SADASIVAN, L.; NEYRA C.A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharide and cyst formation. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 716-723, 1985

SANDFORD, P.A. Exocellular microbial polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 36, p. 265-313, 1979

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v.340, p.731-739, 2005

SCHNAITMAN, C.A; KLENA, J.D. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 655-682, 1993.

SCHMIDT, M.W.; BALDRIDGE, K.K.; BOATZ, J.A.; ELBERT, S.T.; GORDON, M.S.; JENSEN, J.H.; KOSEKI, S.; MATSUNAGA, N.; NGUYEN, K.A.; SU, S.J.; WINDUS, T.L.; DUPUIS, M.; MONTGOMERY, J.A. General atomic and molecular electronic structure system. **J. Comput. Chem.**, v. 14, p. 1347-1363, 2004

SERRATO, R.V. (2004) Produção de exopolissacarídeos pela bactéria diazotrófica endofítica *Burkholderia tropicalis*: estrutura química e fisiologia. **Tese de Mestrado**, Curitiba, Universidade Federal do Paraná, UFPR.

SERRATO, R.V.; SASSAKI, G.L.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.O.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 489-493, 2006

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.O.; CHOUDHURY, B.; CARLSON, R.W.; IACOMINI, M. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Carbohydr. Pol.**, *In Press*, 2008

SHARON, N. (1975) **Complex carbohydrates. Their chemistry, biosynthesis and functions.**, Ed. Addison-Wesley Publis. Co., pp. 129

SILIPO, A.; LANZETTA, R.; GAROZZO, D.; CANTORE, P.L.; IACOBELLIS, N.S.; MOLINARO, A.; PARRILLI, M.; EVIDENTE, A. Structural determination of lipid A of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas reactans*. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 2498-2505, 2002

SILIPO, A.; MOLINARO, A.; JIANG, Y.; XU, P.; XU, L.H.; LANZETTA, R.; PARRILLI, M. The O-chain structure from the LPS of the bacterium *Naxibacter alkalitolerans* YIM 31775. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 757-761, 2007

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, Washington DC, v. 224, p. 1095-1096, 1984

SIST, P.; CESCUTTI, P.; SKERLAVAJ, S.; URBANI, R., LEITÃO, J.H.; SÁ-CORREIA, I.; RIZZO, R. Macromolecular and solution properties of Cepacian: the exopolysaccharide produced by a strain o *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 1-7, 2003

SKVORTSOV, I.M.; IGNATOV, V.V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 165, p. 223-229, 1998

SMITH, A.R.W.; MUNRO, S.M.; WAIT, R.; HIGNETT, R.C. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolated of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, v. 140, p. 1585-1593, 1994

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. (1990) **Nitrogen fixing organisms**. London. Chapman and Hall, 2ed., 256p

STACEY, F.R.S.; BARKER, S.A. (1960) **Polysaccharides of micro-organisms**, p. 75-113, Oxford Press

STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (1992) **Biological Nitrogen Fixation**. New York, Chapman and Hall, 943p

STEAD, D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 281-295, 1992

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 487-506, 2000

STEINMETZ, I.; NIMTZ, M.; WRAY, V.; HAUBLER, S.; REGANZEROWSKI, A.; BRENNEKE, B. Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei* **Acta Tropica**, v. 74, p. 211-214, 2000

SUTHERLAND, I. W. Structural studies on the colanic acid, the common exopolysaccharide found in the enterobacteriaceae, by partial acid hydrolysis; oligosaccharides from colanic acid. **Biochem. J.**, v. 155, p. 935-948, 1969

SUTHERLAND, I. W. Bacterial polysaccharides. **Adv. Microb. Physiol.**, V. 8, p. 143-213, 1972

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

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 23, p. 79-150, 1982

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

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **Int. Rev. Cytology**, v. 113, p. 187-231, 1988

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

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 222-227, 2001

TAO, H.; BREWIN, N.J.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. **J. Bacteriol.**, v. 174 p. 2222-2229, 1992

TEGTMEYER, B.; WECKESSER, J.; MAYER, H.; IMHOFF, J.F. Chemical composition of the lipopolysaccharides of *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas acidophila*, and *Rhodopseudomonas blastica*. **Arch. Microbiol.**, v. 143, p. 32-36, 1985

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2006) **Microbiology**, 9th Ed., Benjamin-Cummings Pub. Co., pp. 1424.

TRAN VAN, V.; GILLIS, M.; HEBBER, K.P.; FERNANDEZ, M.; SEGERS, P.; MARTEL, M.H.; BERGE, O.; MEYER, J.M.; HEULIN, T. Isolation from the rice rhizosphere of a new species of nitrogen-fixing Proteobacteria, belonging to the genus *Burkholderia*. In: **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**, sixth, 1994, Cairo. Proceedings. Cairo: American University in Cairo Press, 1994, p. 299-309

TROY, F.A. The chemistry and biosynthesis of selected bacterial polymers. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 33, p. 519-560, 1979

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

TSAI, C.M.; FRISCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 119, p. 115-119, 1982

VAILLARD, V.; POIRIER, I.; COURNOYER, B.; HAURAT, J.; WIEBKIN, S.; OPHEL-KELLER, K.; BALANDREAU, J. *Burkholderia graminis* sp. nov., and reassessment of [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 2, p. 549-563, 1998

VANHAVERBEKE, C.; HEYRAUD, A.; ACHOUAK, W.; HEULIN, T. Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. **Carbohydr. Res.**, v.334, p. 127-133, 2001

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

VAN DER SPOEL, D.; VAN BUUREN, A.R.; APOL, E.; MEULENHOF, P.J.; TIELEMAN, D.P.; SIJBERS, A.L.T.M.; HESS, B.; FEENSTRA, K.A.; LINDAHL, E.; VAN DRUNEN, R.; BERENDSEN, H.J.C. (2001) **Gromacs User Manual**, v. 3.0, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, pp. 254

VINOGRADOV, E.; MÜLLER-LOENNIES, S.; PETERSEN, B.O.; MESHKOV, S.; THOMAS-OATES, J.E.; HOLST, O.; BRADE, H. Structural investigation of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter Haemolyticus* Strain NCTC 10305 (ATCC 17906, DNA Group 4). **Eur. J. Biochem.**, v. 247, p. 82-90, 1997

VINOGRADOV, E. Structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Bordetella hinzii*. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 961-963, 2002

VINOGRADOV, E. FRIRDICH, E.; MACLEAN, L.L.; PERRY, M.B.; PETERSEN, B.O.; DUUS, J.O.; WHITFIELD, C. Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*: elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O-chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O-chains. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 25070-25081, 2002

VINOGRADOV, E.; NOSSOVA, L.; SWIERZKO, A.; CEDZYNSKI, M. The structure of the O-specific polysaccharide from *Ralstonia pickettii*. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2045-2047, 2004

WANG, Y.; HOLLINGSWORTH, R.I. The structure of the O-antigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s, **Carbohydr. Res.**, v. 260, p. 305-317, 1994

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p. 110-113, 1999

WECKESSER, J.; MAYER, H. Different lipid A types in lipopolysaccharides of phototrophic and related non-phototrophic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 143-153, 1988

WEIBGEN, U.; RUSSA, R.; YOKODA, A.; MAYER, H. Taxonomic significance of the lipopolysaccharide composition of the three biovars of *Agrobacterium tumefaciens*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 166-182, 1993

WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 83-91, 1965

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963-a.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963-b.

WOOD, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. **Carb. Res.**, v. 85, p. 271-287, 1980

XAVIER, J.B.; FOSTER, K.R. From the cover: cooperation and conflict in microbial biofilms. **Prod. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 876-881, 2007

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, Y.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v. 36, p. 1251-1275, 1992

YOKOTA, S.; KAYA, S.; KAWAMURA, T.; AKARY, Y.; ITO, T. The structure of the O-specific chain of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IID 1008 (ATCC 27584). **J. Biochem.**, v. 99, p. 1551-1561, 1986

YOUNG, J. P. W. (1992) Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**, Ed. G. STACEY, R.M. BURRIS, H.S. EVANS, New York, London Chapman & Hall, p. 43-86

ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHEL, E.T. (1999) Endotoxin in Health and Disease In: **Endotoxins**. Ed. H. BRADE; S.M. OPAL; S.N. VOGEL; D.C. MORRISON. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 93-114,

ZHOU, Z.; RIBEIRO, A.A.; LIN, S.; COTTER, R.J.; MILLER, S.I., RAETZ, C.R.H. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 43111-43121, 2001

ANEXOS

ANEXO 01 - Genes de *Herbaspirillum seropedicae* com homologia para proteínas envolvidas no metabolismo e biossíntese de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos de outros microrganismos.

ORF	Gene	Produto	Organismo	E	Identidade	Similaridade
Contig 234						
234.0134	<i>blr4974</i>	Glicosil transferase	<i>Methylobacillus flagellatus</i>	2e-161	134/166 (80%)	151/166 (90%)
			<i>Pseudomonas syringae</i>	5e-92	111/166 (66%)	135/166 (81%)
234.0150	<i>epsA</i>	Proteína transportadora de EPS	<i>Janthinobacterium</i> sp.	3e-79	100/180 (55%)	140/180 (77%)
			<i>Azoarcus</i> sp. BH72	3e-130	125/166 (75%)	144/166 (86%)
234.0179	<i>epsH</i>	EpsH	<i>Zoogloea ramigera</i>	1e-162	82/106 (77%)	97/106 (91%)
			<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	2e-40	21/52 (40%)	29/52 (55%)
234.0186	<i>epsM</i>	O-antígeno ligase – núcleo do LPS	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	3e-109	135/166 (81%)	153/166 (92%)
			<i>Ralstonia solanacearum</i>	4e-06	25/78 (32%)	37/78 (47%)
234.0200	<i>bll630</i>	Provável glicosil transferase	<i>Pseudomonas entomophila</i>	6e-169	22/58 (37%)	27/58 (46%)
			<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	5e-139	21/52 (40%)	29/52 (55%)
234.0264	<i>exoT</i>	UDP-N-acetil-D-manosaminuronato transferase	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	1e-121	140/257 (54%)	174/257 (67%)
			<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	1e-73	83/146 (56%)	107/146 (73%)
234.0275	<i>manC</i>	GDP-manose pirofosforilase	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	4e-179	192/312 (61%)	233/312 (74%)
			<i>Burkholderia thailandensis</i>	7e-177	135/212 (63%)	168/212 (79%)
234.0294	<i>ugd</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	0.0	183/266 (68%)	217/266 (81%)
			<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	0.0	184/268 (68%)	219/268 (81%)
Contig 262						
262.0125	<i>bll630</i>	UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerase	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	3e-149	234/369 (63%)	282/369 (76%)
			<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	7e-56	68/163 (41%)	97/163 (59%)
262.0189	<i>galE</i>	UDP-galactose 4-epimerase	<i>Nitrosospira multiformis</i>	7e-163	83/150 (55%)	106/150 (70%)
			<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	8e-129	119/158 (75%)	138/158 (87%)
262.0198	<i>bll630</i>	UDP-N-acetil-manosaminuronato desidrogenase	<i>Geobacter metallireducens</i>	8e-174	81/156 (51%)	109/156 (69%)
			<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	2e-155	119/158 (75%)	138/158 (87%)
262.0240	<i>bll631</i>	Glicosil transferase para síntese de LPS	<i>Nitrosospira multiformis</i>	2e-129	83/150 (55%)	106/150 (70%)
			<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	1e-51	67/123 (54%)	88/123 (71%)
Contig 263						
263.0144	<i>bll292</i>	Ribulose-5-fosfato-4-epimerase	<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	8e-98	160/212 (75%)	182/212 (85%)
			<i>Pseudomonas syringae</i>	4e-93	151/211 (71%)	179/211 (84%)
263.0243	<i>wcaJ</i>	UDP-galactosil transferase	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	5e-92	147/187 (78%)	165/187 (88%)

			<i>Rhizobium leguminosarum</i>	2e-84	135/187 (72%)	159/187 (85%)
263.0258	<i>wecB</i>	UDP-N-acetil glucosamina 2-epimerase	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	2e-170	250/374 (66%)	293/374 (78%)
			<i>Rickettsia felis</i>	6e-163	167/247 (67%)	207/247 (83%)
263.0284	<i>rfbD</i>	dTDP-6-deoxi-L-manose-desidrogenase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	5e-85	80/163 (49%)	111/163 (68%)
			<i>Rickettsia typhi</i>	3e-82	167/247 (67%)	207/247 (83%)
263.0446	<i>lpxD</i>	UDP-βOH-C _{14:0} glucosamina N-aciltransferase.	<i>Silicibacter</i> sp. TM1040	4e-23	50/115 (43%)	69/115 (60%)
			<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2e-19	48/130 (36%)	64/130 (49%)
263.0536	<i>rfaD</i>	ADP-L-glicero-D-manoheptose-6-epimerase	<i>Coxiella burnetii</i>	9e-159	201/276 (72%)	236/276 (85%)
			<i>Sinorhizobium medicae</i>	2e-80	62/129 (48%)	86/129 (66%)
263.0557	<i>nodL</i>	NodL – aciltransferase	<i>Chromobacterium violaceum</i>	7e-99	141/185 (76%)	159/185 (85%)
			<i>Ralstonia eutropha</i> H16	3e-80	26/44 (59%)	33/44 (75%)

Contig 283

283.0421	<i>rfbD</i>	dTDP-4-rhamnose desidrogenase	<i>Nitrosococcus oceani</i>	8e-84	116/204 (56%)	141/204 (69%)
			<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	8e-82	140/292 (47%)	183/292 (62%)
283.0790	<i>gmd</i>	CDP-glucose-4,6-desidratase	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	2e-119	106/207 (51%)	136/207 (65%)
			<i>Burkholderia pseudomallei</i>	7e-112	101/174 (58%)	132/174 (75%)
283.0806	<i>rfbB</i>	dTDP-glucose 4,6-desidratase	<i>Ralstonia solanacearum</i>	1e-149	122/162 (75%)	139/162 (85%)
			<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	1e-145	116/162 (71%)	136/162 (83%)
283.0812	<i>rfbC</i>	dTDP-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf5	4e-75	115/182 (63%)	135/182 (74%)
			<i>Pseudomonas syringae</i>	6e-73	113/182 (62%)	137/182 (75%)
283.0838	<i>fcl</i>	GDP-4-ceto-fucose-3,5-epimerase-4-redutase	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	9e-96	85/154 (55%)	114/154 (74%)
			<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	2e-91	84/159 (52%)	116/159 (72%)
283.0853	<i>galU</i>	GlcNAc-1-fosfato-uridililtransferase	<i>Pseudomonas entomophila</i>	3e-65	58/81 (71%)	67/81 (82%)
			<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	1e-26	41/80 (51%)	52/80 (65%)
283.0930	<i>glmU</i>	dTDP-4-desidrorhamnose oxidoreductase	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	4e-65	96/196 (48%)	132/196 (67%)
			<i>Ralstonia solanacearum</i>	9e-79	101/196 (51%)	134/196 (68%)
283.0969	<i>glmS</i>	D-frutose-6-fosfato aminotransferase	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	0.0	326/399 (81%)	367/399 (91%)
			<i>Burkholderia xenovorans</i>	2e-77	96/195 (49%)	130/195 (66%)
283.1178	<i>fucK</i>	L-fuculoquinase	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1e-83	71/136 (52%)	93/136 (68%)
			<i>Mesorhizobium loti</i>	2e-79	79/136 (58%)	102/136 (75%)
283.1247	<i>srlD</i>	Glucitol-6-fosfato desidrogenase	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1e-83	71/136 (52%)	93/136 (68%)
			<i>Rhizobium leguminosarum</i>	4e-70	71/136 (52%)	94/136 (69%)

Fonte: GENOPAR (www.genopar.org)

ANEXO 02. Composição do meio de cultura JMV (BALDANI et al., 1996)

As quantidades mostradas abaixo são relativas ao preparo de 1 litro de meio:

Manitol	5,0 g
K ₂ PO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,2 g
Solução de Microelementos ¹	2,0 mL
Solução de Fe EDTA 1,64%	4,0 mL
Solução de Biotina 100 µg/ml	1,0 mL

Ajustar o pH para 4,5 e autoclavar. Adicionar glutamato de sódio pré-autoclavado até a concentração final de 10 mM.

¹ SOLUÇÃO DE MICROELEMENTOS (quantidades suficientes para 200 mL)

Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ • H ₂ O	235 mg
H ₃ BO ₃	280 mg
CuSO ₄ • 5H ₂ O	8 mg
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	24 mg

* Para o preparo de meio sólido foram adicionados 15 g/L de ágar ao meio.

ANEXO 03. Composição do meio de cultura NFb Malato (PEDROSA & YATES, 1984)

As quantidades mostradas abaixo são relativas ao preparo de 1 litro de meio:

Ácido Málico	5,0 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	20 mg
FeSO ₄ • 7H ₂ O	20 mg
Biotina	100 µg/mL
Solução de Ác. Nitrilotriacético 0,56%	10 mL
Solução de Microelementos ¹	2,0 mL
Solução de Fe EDTA 1,64%	4,0 mL
Solução de Fosfatos ²	50 mL

Ajustar o pH para 6,5 e autoclavar. Adicionar NH₄Cl pré-autoclavado até a concentração final de 20 mM. Autoclavar a solução de fosfatos² separadamente antes de adicionar ao restante do meio.

¹ SOLUÇÃO DE MICROELEMENTOS (quantidades suficientes para 200 mL)

Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ • H ₂ O	235 mg
H ₃ BO ₃	280 mg
CuSO ₄ • 5H ₂ O	8 mg
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	24 mg

² SOLUÇÃO DE FOSFATOS (quantidades suficientes para 100 mL)

K ₂ HPO ₄	1,78 g
KH ₂ PO ₄	15,95 g

* Para o preparo de meio sólido foram adicionados 15 g/L de ágar ao meio.

NOTE / NOTE

Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*

Rodrigo V. Serrato, Guilherme L. Sasaki, Leonardo M. Cruz, Fábio O. Pedrosa, Philip A.J. Gorin, and Marcello Iacomini

Abstract: The endophytic diazotrophic bacterium *Burkholderia tropica*, strain Ppe8, produced copious amounts of exopolysaccharide (EPS) on batch growth in liquid synthetic media containing mannitol and glutamate as carbon and nitrogen sources. The effect of various aeration regimes and carbon source concentrations on EPS production was determined, as well as the effects of temperature and time of growth. The degree of aeration had a great influence on the yield of EPS, in contrast with the C:N ratio of the medium. Growth temperature also affected the EPS yield after the first 24 h of culture but seemed to be irrelevant after that. After isolation and purification, the EPS was analyzed by high-performance size exclusion chromatography and multiangle laser light scattering (HPSEC-MALLS), revealing a molecular mass of 300 kDa. The acid hydrolyzate of EPS was examined by HPLC and found to contain Glc, Rha, GlcA, and an aldobiouronic acid. The latter was found to have a GlcA and a Rha unit. Carboxy-reduced EPS contained Glc and Rha (3:2). The monosaccharide composition of the native acidic EPS was calculated as GlcA, Glc, and Rha in a molar ratio of 1:2:2.

Key words: *Burkholderia*, endophyte, diazotrophic, exopolysaccharide, EPS.

Résumé : La bactérie endophyte diazotrophe *Burkholderia tropica*, souche Ppe8, produit des quantités copieuses d'exopolysaccharides (EPS) lors d'une culture discontinue en milieu liquide synthétique contenant du mannitol et du glutamate comme sources de carbone et d'azote. Nous avons déterminé l'impact des différents régimes d'aération et des concentrations de sources de carbone, de même que de la température et du temps de culture sur la production d'EPS. Le degré d'aération avait une énorme influence sur le rendement d'EPS, contrairement au rapport C:N du milieu. La température de croissance a également affecté les rendements d'EPS dans les premières 24 h de culture mais n'a pas semblé être pertinente après cela. Suite à une isolation et une purification, les EPS ont été analysés par HPSEC-MALLS ce qui a révélé une masse moléculaire de 300 kDa. L'hydrolysate acide des EPS fut analysé par HPLC et s'est avéré contenir du Glc, Rha, GlcA et un acide aldobiouronique. Ce dernier renfermait une unité GlcA et Rha. Le EPS réduit en carboxy contenait du Glc et du Rha (3:2). La composition en monosaccharides du EPS acide natif fut calculé comme étant GlcA, Glc et Rha dans un rapport molaire de 1:2:2.

Mots clés : *Burkholderia*, endophytes, diazotrophes, exopolysaccharides, EPS.

[Traduit par la Rédaction]

The genus *Burkholderia* contains about 30 different species described to date (Coenye and Vandamme 2003), and the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* is the type species (Yabuuchi et al. 1992). The ability of bacteria in this

genus to fix N₂ has long been recognized in only one species, *Burkholderia vietnamiensis*, isolated from the rhizosphere of rice plants (Gillis et al. 1995). Recently, endophytic species of *Burkholderia* isolated from a variety of plants were found to be nitrogen fixing (Estrada et al. 2002; Caballero-Mellado et al. 2004). A novel diazotrophic plant-associated species, *Burkholderia tropica* Ppe8, a sugar-cane associated bacterium (Reis et al. 2004), also showed an amplified 16S rDNA restriction analysis pattern identical to that in pineapple isolates (Cruz et al. 2001). The cells of *B. tropica* are slightly curved rods, approximately 1.5–1.6 µm long and 0.7–0.8 µm wide. They are motile by means of one to four polar flagella and the isolates are Gram negative. Growth and acetylene reduction to ethylene were observed in nitrogen-

Received 8 November 2005. Revision received 5 December 2005. Accepted 12 December 2005. Published on the NRC Research Press Web site at <http://cjn.nrc.ca> on 11 May 2006.

R.V. Serrato, G.L. Sasaki, L.M. Cruz, F.O. Pedrosa, P.A.J. Gorin, and M. Iacomini.¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19046, CEP-81531-990 Curitiba, Brazil.

¹Corresponding author (e-mail: iacomini@ufpr.br).

Table 1. Effect of aeration and mannitol concentration on cell growth, final pH, and exopolysaccharide (EPS) production by *Burkholderia tropica* Ppe8 on a 72 h culture.

Mannitol concn. (g·L ⁻¹)	Aeration	Final OD ₆₀₀	Final pH	EPS yield (g·L ⁻¹) ^a	OD ₄₉₀ /OD ₆₀₀
5 (low C:N)	+++	8.12±0.11	7.42±0.02	0.910±0.070	0.18
	++	4.02±0.19	7.37±0.02	0.612±0.019	0.24
	+	1.48±0.20	7.22±0.11	0.363±0.016	0.38
10	+++	8.04±0.09	7.44±0.04	0.860±0.095	0.17
	++	3.96±0.08	7.33±0.02	0.460±0.031	0.18
	+	1.40±0.15	7.07±0.07	0.240±0.042	0.27
15 (high C:N)	+++	8.00±0.14	7.43±0.03	0.980±0.056	0.19
	++	4.16±0.07	7.37±0.02	0.384±0.055	0.14
	+	1.40±0.15	7.08±0.04	0.253±0.048	0.27

Note: Mean values of samples analyzed in triplicate. +++, 100 mL of JMV (high aeration); ++, 250 mL of JMV (moderate aeration); and +, 400 mL of JMV (low aeration).

^aDetermined by the PhOH-H₂SO₄ method at 490 nm (Dubois et al. 1956).

free semisolid media showing that this strain has an aerobic metabolism but fixes nitrogen microaerobically (Reis et al. 2004).

Microbial exopolysaccharides (EPSs) are found in a broad range of organisms. Soil bacteria that produce EPSs may influence the stability of soil aggregates, which in turn determines the mechanical and physical properties of soil (Burdman et al. 1999). This has a marked impact on a range of processes influencing crop yield. The capacity for adsorption of EPS on mineral surfaces is strongly dependent on the specific conformational properties of the polysaccharide (Vanhaverbeke et al. 2003). Once a suitable location is reached by an organism, resistance to its removal becomes a selective advantage (Romantschuk 1992). The ability of a microorganism to surround itself in a highly hydrated layer of polysaccharide may provide it with protection against desiccation and predation (Whitfield 1988). Also, cells buried within an EPS matrix may, for instance, bind and affect penetration into the cell surface of both useful and toxic molecules (Costerton et al. 1987).

EPSs produced by leguminous nodulating nitrogen-fixing bacteria have also been reported to play an important role in plant-bacteria association and colonization (Leigh and Walker 1994; Gage and Margolin 2000). Studies on *Sinorhizobium meliloti* revealed the production of two EPSs, namely a succinoglycan and a galactoglucan (González et al. 1996). Plant invasion by *Sinorhizobium meliloti* require production of these EPSs (Leigh et al. 1985). The free-living N₂-fixing bacteria of the genus *Azospirillum* live in close association with the roots of gramineous plants, where they exert beneficial effects on plant growth and yield of many crops (Okon and Labandera-González 1994). Nitrogen-fixing endophytes are reported to produce exocellular polysaccharides involved in attachment to root cells (Steenhoudt and Vanderleyden 2000) and the production of EPS by *Azospirillum* spp. has been demonstrated previously (Burdman et al. 2000; Jofré et al. 2004). Several EPS structures have been reported for other bacteria of the genus *Burkholderia*, such as *B. cepacia* (Linker et al. 2001) and *Burkholderia caribensis* (Vanhaverbeke et al. 2001). However, further investigation to determine the role of these EPSs is necessary.

We report the production of an acidic EPS by the endophytic Gram-negative nitrogen-fixing bacterium, *B. tropica* Ppe8 (= ATCC BAA-831(T) = LMG 22274(T) = DSM 15359(T)). This strain was furnished by the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Seropédica, Brazil, and was maintained on 50% aqueous glycerol at -20 °C. Batch cultures in JMV liquid medium containing mannitol and glutamate (Baldani et al. 1996) have shown EPS production when the culture became more viscous. Three different mannitol concentrations were used to evaluate the influence of the carbon-nitrogen ratio (C:N) on EPS production, which was 15.0 g·L⁻¹ (high C:N), 10.0 g·L⁻¹, and 5.0 g·L⁻¹ (low C:N), with the glutamate concentration remaining constant (2.0 g·L⁻¹). In parallel, variations on aeration levels were performed using different volumes of medium in 500 mL Erlenmeyer flasks as follows: 400 mL of JMV for low aeration, 250 mL for moderate aeration, and 100 mL for high aeration. All flasks were shaken (120 r·min⁻¹) at 30 °C and the cultures examined up to 72 h. The cell density at 600 nm (OD₆₀₀) was determined using a spectrophotometer. After cell removal by centrifugation (4000g, 5 min), total sugar of the medium was measured by the phenol-sulfuric acid (PhOH-H₂SO₄) method at 490 nm (Dubois et al. 1956). High aeration promoted an intense cell growth (OD₆₀₀ ~8.0) at all concentrations of mannitol. Cell growth was compromised when aeration was diminished and the OD₆₀₀ values were ~4.0 and ~1.4 for moderate and low aeration regimes, respectively, irrespective of the C:N ratio. The yield of EPS obtained under high aeration was three- to four-fold higher than under low aeration conditions for all mannitol concentrations. However, the amount of sugar in the medium compared with cell growth (OD₄₉₀/OD₆₀₀) shows that the EPS yield per cell was greater under low aeration regimes. Even though cell growth was compromised with low aeration, the production of EPS increased proportionally (Table 1). The final pH was close to neutrality under all conditions.

Two different growth temperatures were used, 26 °C and 30 °C, both for 24 and 72 h incubations using 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of JMV, as described. The temperature of growth was also found to have a great influence on the amount of extracellular material produced,

Table 2. Amount of exopolysaccharide (EPS) produced by *Burkholderia tropica* Ppe8 at different temperatures and growth times.

Temperature (°C)	Growth time (h)	EPS yield (g·L ⁻¹) ^a
26	24	0.350±0.033
	72	0.929±0.061
30	24	0.572±0.042
	72	0.940±0.074

Note: Mean values from triplicates relative to 1 L culture ± SD.

^aDetermined by the PhOH-H₂SO₄ method at 490 nm (Dubois et al. 1956).

which mainly occurred during the first 24 h, yielding 350 and 572 mg·L⁻¹ of EPS at 26 °C and 30 °C, respectively, as determined by the PhOH-H₂SO₄ method. Differences in the total sugar in the medium were not significant after 72 h culture at either temperature (Table 2).

To obtain appreciable amounts of EPS for further analysis, three 2 L Erlenmeyer flasks, each containing 500 mL of JMV (5.0 g·L⁻¹ of mannitol), were inoculated with a pregrown fresh culture (OD₆₀₀ set to 0.05) and shaken (120 r·min⁻¹) at 30 °C for 72 h. Aliquots of 1 mL were taken every 2 h from each flask to analyze cell density and total sugar in the medium. The culture reached its late exponential phase (OD₆₀₀ ~ 8.0) after approximately 24 h. The amount of EPS increased until the 30th h of culture when it reached a plateau of close to 900 mg·L⁻¹, which remained constant until the end of the culture after 72 h (Fig. 1).

Cells were removed by centrifugation (4000g, 5min) and the medium was concentrated under reduced pressure. Three volumes of ethanol was added, the material was kept overnight at -20 °C, and the resulting precipitate was centrifuged (10 000g, 15 min). The supernatant was tested with PhOH-H₂SO₄ and showed minimum amounts of sugar. The resulting precipitate recovered from the centrifugation was resolubilized in water, dialyzed against running tap water for 48 h in a 14 kDa molecular mass cut-off membrane (MMCO), and retained material was freeze dried (980 mg). A portion (100 mg) was purified by anion-exchange chromatography using a Q-Sepharose fast-flow column (bed volume of 30 mL; 170 × 15 mm inside diameter; Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey.) coupled to a fast performance liquid chromatography system. Elution was carried out using a continuous NaCl gradient of up to 1 mol·L⁻¹. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and collection was made in test tubes at 1 min intervals. The elution in each tube was followed by detection of total carbohydrate using PhOH-H₂SO₄. The only carbohydrate-containing sample was eluted when the NaCl concentration reached 520 mmol·L⁻¹. This fraction was collected, dialyzed as described, and freeze dried, yielding the purified acidic EPS (85 mg), which was then analyzed.

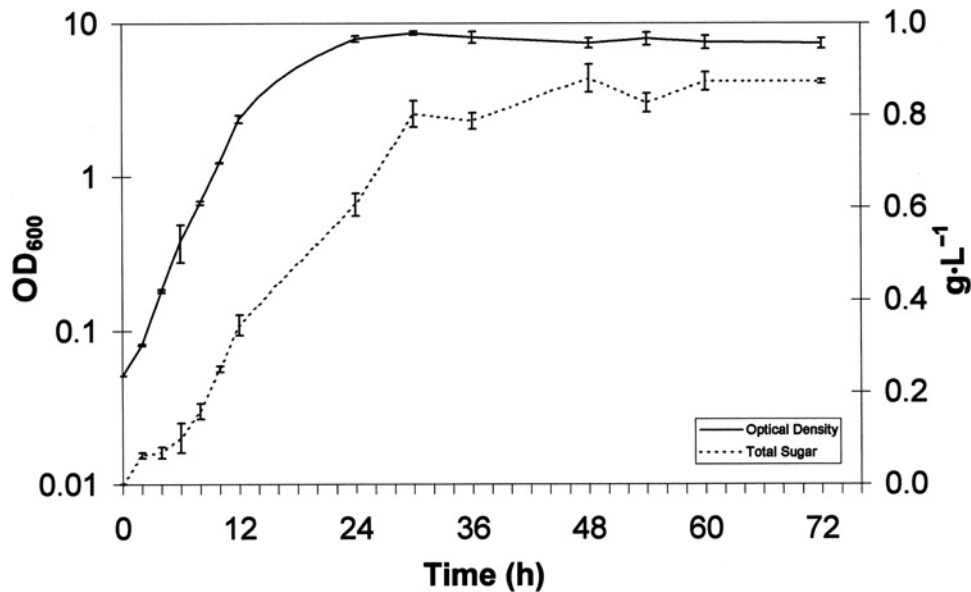
The EPS was examined by high-performance size exclusion chromatography using four Waters Ultrahydrogel 2000/500/250/120 columns (Waters, Milford, Massachusetts) connected in series coupled to a differential refractometer and a Dawn-F multiangle laser light scattering system (Wyatt Technology, Santa Barbara, California). Samples were solubilized in 100 mmol·L⁻¹ NaNO₃ at concentrations of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1 mg·mL⁻¹. Sequential injections (250 µL loop) were performed for dn/dc (differential refractive index increment

of the solvent-solute solution with respect to a change in solute concentration) and molar mass calculation. The elution was carried out in 100 mmol·L⁻¹ NaNO₃ with 200 ppm aqueous NaN₃. The analysis revealed an EPS with a molecular mass of 3.0 × 10⁵ g·mol⁻¹. The value of dn/dc, measured at 633 nm, was 0.141.

The analysis of total uronic acid content of the native EPS was carried out using an *m*-hydroxydiphenyl colorimetric method in which neutral sugars do not interfere (Filisetti-Cozzi and Carpita 1991). The amount of uronic acid in the sample was determined to be 22% using glucuronic acid as standard. The EPS was then carboxy reduced, as described by Taylor and Conrad (1972), to reduce uronic acid units to their corresponding neutral ones. Approximately 20 mg of EPS was dissolved in 0.2 mol·L⁻¹ 2-*N*-morpholine-ethanesulfonic acid at pH 4.75 with a further addition of *N*-cyclohexyl-*N'*-[β-(methyl-morpholine)ethyl]-carbodiimide *p*-toluenesulfonate under constant agitation for 2 h. The solution was then neutralized with 2 mol·L⁻¹ Tris buffer (pH 7.0) and NaBH₄ was added up to 2 mol·L⁻¹. After 12 h reduction, the solution was neutralized with HCl to pH 5.0 and dialyzed for 48 h (using a 14 kDa MMCO membrane) before freeze drying. The efficiency of the process to give reduced EPS (EPS-Red), was demonstrated by infrared spectroscopy (RI) coupled to a Fourier transformation, performed with a Bomem Hartmann (MB series) spectrophotometer using 100 mg KBr disks containing 2% of the material. Carboxy-reduction was complete, since the band corresponding to carboxyl groups (1740 cm⁻¹) was not present.

Both acidic EPS and EPS-Red (5 mg) were submitted to hydrolysis with 2 mol·L⁻¹ trifluoroacetic acid (TFA) at 100 °C for 8 h. After freeze drying to remove the acid, the residues were analyzed by HPLC coupled to an RI detector (RID 10A) maintained at 40 °C. The column used was an HPX-87H 300 × 7.8 mm Aminex[®] ion exclusion column (Bio-Rad, Hercules, California) and the elution was carried out with 8 mmol·L⁻¹ H₂SO₄ in helium degassed water. The system was maintained in an oven (CTO 10A) at a constant temperature of 65 °C, and a flux of 0.6 mL·min⁻¹. Samples were solubilized in water at 1 mg·mL⁻¹ and injected using a 20 µL loop. The native acidic EPS contained 43.5% glucose (Glc; 10.39 min), 28.3% rhamnose (Rha; 11.67 min), and a small amount (2.3%) of glucuronic acid (GlcA; 9.26 min). A peak with a characteristic retention time for aldobiouronic acids (8.34 min) was also found (25.9%). The small amount of GlcA units found was probably formed from the aldobiouronic acid group, which has a strong glycosidic linkage between its acid and reducing unit, and thus was not completely hydrolyzed. This was confirmed when the EPS-Red showed only Glc (62.0%) and Rha (38.0%), indicating that the acidic unit from the aldobiouronic acid, which is not present in the chromatogram for EPS-Red, is actually GlcA that was reduced to its corresponding Glc unit and observed as an increase in the glucose amount for the EPS-Red hydrolyzate. The aldobiouronic acid sample was collected by an automatic fraction collector (FRC 10A) coupled to the HPLC system. Barium carbonate was added to the material to neutralize the sulfuric acid from the carrier liquid, and insoluble material was then removed by centrifugation (10 000g, 15 min). A more drastic hydrolysis, 4 mol·L⁻¹ TFA at 100 °C for 12 h, was carried out for the

Fig. 1. Growth kinetics for *Burkholderia tropica* Ppe8 and total sugar found in the JMV medium during batch culture.



aldobiouronic acid to determine its monosaccharide composition. After freeze drying for acid removal, the material was solubilized in water ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and reinjected in the HPLC. The hydrolyzate gave rise to GlcA (53.8%) and Rha (46.2%), thus showing that the aldobiouronic acid is formed by GlcA and Rha in a 1:1 ratio. Neutral monosaccharide composition of all hydrolyzates was confirmed after reduction with NaBH_4 followed by acetylation, and their resulting alditol acetate derivatives were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry according to their retention times and electron impact mass spectrometry profiles.

Once the Glc:Rha ratio obtained after hydrolysis of the acidic EPS was approximately 1.5:1 and the aldobiouronic acid was determined to contain both a GlcA and a Rha unit, we assumed that the native acidic EPS has a monosaccharide composition formed by GlcA, Glc, and Rha in a 1:2:2 ratio, respectively. Due to the reduction of GlcA units from the acidic EPS to their corresponding Glc units, the EPS-Red monosaccharide composition was only Glc and Rha in a ratio of 3:2, respectively. The monosaccharide units that form the acidic EPS produced by *B. tropica* Ppe8 are similar to those found in EPS produced by other *Burkholderia* species (Mattos et al. 2001; Linker et al. 2001). These results might suggest a fairly conserved structure among the EPSs produced by bacteria of the genus *Burkholderia*, which, in turn, could be an indication that these molecules play an important role in plant–bacteria recognition. However, further studies are necessary to confirm this hypothesis. What is certain is that the highly hydrated layer of exocellular polysaccharides gives the bacterium additional protection against desiccation and favors the formation of bacterial aggregates, together with soil particles, which is of ecological interest to the life cycle and survival of these microorganisms.

Several authors have reported the correlation of EPS production with variations in cultivation parameters. Konnova et al. (2003) observed that an increase in pH reduced the period of exponential growth and yield of polysaccharide-containing complexes in *Azospirillum brasilense* during

fermentation. Changes in carbon sources or a prolonged cultivation also modified the monosaccharide composition of the EPS. The carbon–nitrogen ratio has also been reported to be an important factor in EPS production (Degeest and De Vuyst 1999; Konnova et al. 2003). However, we now observe that the C:N ratio does not influence the amount of EPS produced by *B. tropica* Ppe8. Instead, the growth temperature and aeration were found to be key factors in EPS biosynthesis. High aeration promoted elevated cell growth, but a low amount of EPS was produced per cell. On the other hand, low aeration conditions impaired cell development, thus deviating the sugar biosynthesis pathway to the synthesis of EPSs. Assuming that the production of EPS is an important step in plant–bacteria interactions leads one to understand the importance of learning how to control its production by modifying the medium and growth conditions. This is certainly of great interest when selecting suitable bacteria and culture conditions to produce novel inoculants.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and the Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná (UFPR) for the isolation and characterization of the bacterial strain. The investigation was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and PRONEX-Carboidratos.

References

- Baldani, J.I., Por, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L.D., Olivares, F.L., Hoste, B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., and Dobreiner, J. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 802–810.

- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., and Okon, Y. 1999. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, **145**: 1145–1152.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M.E., Serrano, A.M.G., and Okon, Y. 2000. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 259–264.
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., and Estrada-De Los Santos, P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1165–1172.
- Coenye, T., and Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **5**: 719–729.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and diseases. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435–464.
- Cruz, L.M., Maltempi-de Souza, E., Weber, O.B., Baldani, J.I., Döbereiner, J., and Pedrosa, F.O. 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 275–279.
- Degeest, B., and De Vuyst, L. 1999. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modeling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2863–2870.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.
- Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., and Caballero-Mellado, J. 2002. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Can. J. Microbiol.* **48**: 285–294.
- Filiseti-Cozzi, T.M.C.C., and Carpita, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* **197**: 157–162.
- Gage, D.J., and Margolin, W. 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 613–617.
- Gillis, M., Tràn Van, V., Bardin, R., Goor, M., Hebban, P., Willems, A., Segers, P., Kersters, K., Heulin, T., and Fernandez, M.P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 274–289.
- González, J.E., Reuhs, B.L., and Walker, G.C. 1996. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 8636–8641.
- Jofré, E., Lagares, A., and Mori, G. 2004. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**: 267–275.
- Konnova, S.A., Fedonenko, Y.P., Makarov, O.E., and Ignatov, V.V. 2003. Effect of cultivation conditions on the composition of extracellular polysaccharide-containing substances in the bacterium *Azospirillum brasilense*. *Biol. Bull.* **30**: 354–360.
- Leigh, J.A., and Walker, G.C. 1994. Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**: 63–67.
- Leigh, J.A., Signer, E.R., and Walker, G.C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**: 6231–6235.
- Linker, A., Evans, L.R., and Impallomeni, G. 2001. The structure of a polysaccharide from infectious strains of *Burkholderia cepacia*. *Carbohydr. Res.* **335**: 45–54.
- Mattos, K.A., Jones, C., Heise, N., Previato, J.O., and Mendonça-Previato, L. 2001. Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3174–3179.
- Okon, Y., and Labandera-Gonzalez, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1591–1601.
- Reis, V.M., Estrada-De Los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffles, M., Guyon, S., Mavingui, P., Baldani, V.L.D., Schmid, M., Baldani, J.I., Balandreau, J., Hartmann, A., and Caballero-Mellado, J. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2155–2162.
- Romantschuk, M. 1992. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 225–243.
- Steenhoudt, O., and Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 487–506.
- Taylor, R.L., and Conrad, H.E. 1972. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, **11**: 1383–1388.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Achouak, W., and Heulin, T. 2001. Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. *Carbohydr. Res.* **334**: 127–133.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., and Mazeau, K. 2003. Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: impact on the interaction with soils. *Biopolymers*, **69**: 480–497.
- Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **34**: 415–420.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov., and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **36**: 1251–1275.



Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*

Rodrigo V. Serrato^a, Guilherme L. Sasaki^a, Philip A.J. Gorin^a, Leonardo M. Cruz^a, Fábio O. Pedrosa^a, Biswa Choudhury^b, Russell W. Carlson^b, Marcello Iacomini^{a,*}

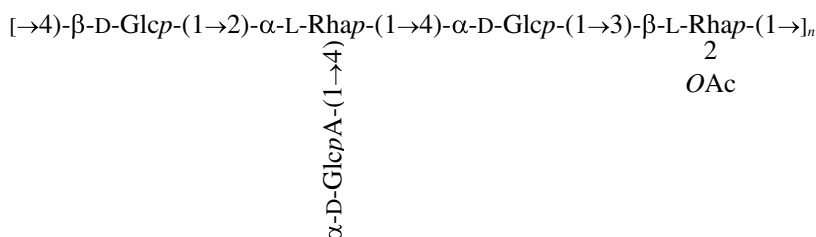
^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81.531-990 Curitiba, PR, Brazil

^b Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA 30602, United States

Received 23 November 2007; received in revised form 17 December 2007; accepted 27 December 2007

Abstract

An acidic exopolysaccharide (EPS) produced by the diazotrophic bacterium *Burkholderia tropica*, strain Ppe8, was isolated from the culture supernatant of bacteria grown in a synthetic liquid medium containing mannitol and glutamate. Monosaccharide composition showed Rha, Glc and GlcA in a 2.0:2.0:1.0 molar ratio, respectively. Further structural characterization was performed by a combination of NMR, mass spectrometry and chemical methods. Partial acid hydrolysis of EPS provided a mixture of acidic oligosaccharides that were characterized by ESI-MS, giving rise to ions with *m/z* 193 (GlcA-H)⁻, 339 (GlcA,Rha-H)⁻, 501 (GlcA,Rha,Glc-H)⁻, 647 (GlcA,Rha₂,Glc,-H)⁻, 809 (GlcA,Rha₂,Glc₂,-H)⁻ and 851 (GlcA,Rha₂,Glc₂,OAc-H)⁻. Carboxy-reduced EPS (EPS-CR) had Glc and Rha in a 3:2 ratio, present as D- and L-enantiomers, respectively. Methylation and NMR analysis of EPS and EPS-CR showed a main chain containing 2,4-di-*O*-Rhap, 3-*O*-Rhap and 4-*O*-Glc_p. A GlcA side chain unit was found in the acidic EPS, substituting O-4 of α-L-Rhap units. This was observed as a non-reducing end unit of glucopyranose in the EPS-CR. Acetyl esters occurred at O-2 of β-L-Rhap units. From the combined results herein, we determined the structure of the exocellular polysaccharide produced by *B. tropica*, Ppe8, as being a pentasaccharide repeating unit as shown:



© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Burkholderia*; EPS; Endophytic; Diazotrophic; Exopolysaccharide

1. Introduction

Microbial exopolysaccharides (EPS) are found ubiquitously in nature and occur in several soil bacteria. They

can influence soil stability and the physical properties of soil aggregates and since their associated microenvironments and mechanical characteristics are in continuous evolution, a wide range of effects can occur, including influence of crop yields (Burdman, Jurkevitch, Schwartzburd, & Okon, 1999). The highly hydrated layer of EPS that surrounds the bacteria offers a safe environmental protection

* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1655; fax: +55 41 3266 2042.
E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini).

against desiccation and the mechanical removal from the soil (Romantschuk, 1992; Whitfield, 1988). The conformational characteristics of EPS affect the binding of useful and/or toxic molecules available to its cells (Costerton, Geesy, & Cheng, 1987).

As far as biological activity is concerned, EPS produced by nitrogen-fixing bacteria have been reported to serve as molecular signals during plant invasion. In the case of the *Rhizobiaceae*, numerous EPS structures are produced and, in the case of legume hosts that form indeterminate nodules, are required for invasion of the host cells and the formation of functional N₂-fixing nodules (Carlson, Reuhs, Forsberg, Kannenberg, & Goldberg, 1999). A specific example is that of *Sinorhizobium meliloti* and its host, alfalfa. *Sinorhizobium meliloti* can produce two EPS, namely a succinoglycan and a galactoglucan (González, Reuhs, & Walker, 1996). Bacterial invasion and formation of functional N₂-fixing nodules require these EPS (Leigh, Signer, & Walker, 1985), although their function is not yet clear. Non-nodulating, free-living diazotrophs such as *Azospirillum* spp., have also been reported to produce EPS (Burdman, Jurkevitch, Soria-Díaz, Serrano, & Okon, 2000), which are involved in attachment to grass root cells (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

To date, approximately 30 different species are recognized as belonging to the genus *Burkholderia* (Coenye & Vandamme, 2003). For an extended period, the ability for nitrogen fixation in *Burkholderia* was recognized only for *B. vietnamiensis*, which was isolated from the rhizosphere of rice plants (Gillis et al., 1995). Recently, endophytic species of *Burkholderia* have been isolated from a variety of plants, and were found to be nitrogen-fixing (Caballero-Mellado, Martínez-Aguilar, Paredes-Valdez, & Estrada-De Los Santos, 2004; Estrada et al., 2002), and some of which were found to produce exopolysaccharides. *B. brasiliensis* synthesizes two EPS (Mattos, Jones, Heise, Previato, & Mendonça-Previato, 2001), one of which is a linear *O*-acetylated EPS with the pentasaccharide repeating unit: $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 2\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-L-Rhap[2OAc]-(1}\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$. Rare sugar units were found in the EPS produced by *B. caribensis*, strain MWAP71 and *B. pseudomallei*. The former produces an extracellular polysaccharide containing D-Glcp, L-6dTalp (6-deoxy-L-talose), Kdop (3-deoxy-2-manno-2-octulosonic acid) and *O*-acetyl substituents (Vanhaverbeke, Heyraud, Achouak, & Heulin, 2001). *B. pseudomallei* also produced a Kdo-containing polysaccharide (Steinmetz et al., 2000) which was characterized as a tetrasaccharide repeating group of $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Galp[2OAc]-(1}\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 5\text{-}\beta\text{-Kdop-(2}\rightarrow$. *Burkholderia cepacia* has been described as the type species for the genus (Yabuuchi et al., 1992). It was originally described as a plant pathogen (Burkholder, 1950), and has become an important opportunistic pathogen in patients with cystic fibrosis. *B. cepacia* was reported to produce a complex EPS containing an unusual tri-*O*-substituted α -GlcpA resi-

due (Linker, Evans, & Impallomeni, 2001), which confers interesting rheological properties (Sist et al., 2003). A second EPS with the disaccharide repeating group $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 3\text{-}[4,6\text{-O-(1-carboxylethylidene)]-\alpha\text{-D-Galp}$ has also been described (Cérantola, Marty, & Montrozier, 1996). The involvement of these EPS in the interactions of clinical isolates of *B. cepacia* (Govan & Deretic, 1996) and *B. pseudomallei* (Steinmetz, Rhode, & Brennek, 1995) with their host cells has been suggested.

The nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*, strain Ppe8, is an endophyte isolated from sugar cane (Reis et al., 2004), which showed an amplified 16S rDNA restriction pattern identical to that of pineapple isolates (Cruz et al., 2001). When grown in a liquid synthetic medium containing mannitol and glutamate, *B. tropica* Ppe8 produced copious amounts of a 300-kDa acidic exopolysaccharide containing Glc, Rha and GlcA in a molar ratio of 2:2:1, respectively (Serrato et al., 2006). We now report the complete structural characterization of the EPS produced by *B. tropica* Ppe8, using chemical, spectrometric and spectroscopic techniques.

2. Experimental

2.1. Bacterial strain and growth conditions

Burkholderia tropica, strain Ppe8 (=ATCC BAA-831(T)=LMG 22274(T)=DSM 15359(T)), was furnished by the *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (EMBRAPA), Seropédica, Brazil, and was maintained on 50% aq. glycerol at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cells were grown in 2 L Erlenmeyer flasks containing 500 mL of synthetic JMV medium (Baldani et al., 1996) containing mannitol (5.0 g L^{-1}) and glutamate (2.0 g L^{-1}). Batch cultures were maintained at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h under constant orbital shaking (120 rpm).

2.2. Purification methodology

After cell removal by centrifugation, the medium was concentrated and added to excess cold ethanol (3 v/v). The resulting precipitate was recovered by centrifugation (8000g, 10 min) the pellet re-solubilized in water, and dialyzed for 48 h against dH₂O in a 14 kDa molecular weight cut-off (MWCO) membrane. Retained material was then purified by anion-exchange chromatography using a Q-Sepharose fast-flow column (170 × 15 mm id) coupled to a FPLC system. A continuous NaCl gradient was used up to 1 M.

The acidic EPS was submitted to partial hydrolysis with M CF₃CO₂H at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h in order to obtain oligosaccharides. After freeze-drying, the material was dissolved in water and added to excess cold ethanol. The resulting precipitate was removed by centrifugation and the supernatant containing the mixture of oligosaccharides was freeze-dried, diluted in dH₂O (5.0 mg mL^{-1}) and loaded onto a BioGel P-2 column (120 × 10 mm id) and eluted with degassed dH₂O.

All fractions obtained were analyzed for their carbohydrate content using the PhOH–H₂SO₄ method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

2.3. Carboxy-reduction of acidic EPS

A portion of the purified acidic EPS was carboxy-reduced in order to reduce uronic acid units to their neutral analogues. To 10 mg of EPS were added 10 mL of 200 mM 2-*N*-morpholine-ethanesulfonic acid (MES buffer) at pH 4.75. The material was kept under constant stirring for 2 h with further additions (10 mL) of *N*-cyclohexyl-*N'*-[β-(methyl-morpholine)ethyl]-carbodiimide *p*-toluenesulfonate. The solution was then neutralized with 2 M TRIS buffer pH 7.0 and NaBH₄ was added up to 2 M. The reaction was left overnight and the pH then adjusted to 5.0 with HCl (Taylor & Conrad, 1972). The solution was dialyzed for 48 h (14 kDa MWCO membrane) and freeze-dried. The carboxy-reduction process was repeated twice to guarantee the complete reduction of all uronic acid units. The resulting product (EPS-CR) was then analyzed by infrared spectroscopy coupled to Fourier transform (FT-IR), performed with a Bomem Hartman (MB-Series) spectrophotometer using 100 mg KBr disks containing 2% of material.

2.4. Derivatization methodology and GC–MS analysis

Monosaccharide composition of each sample was determined by GC–MS as trimethylsilylated methyl glycosides (per-*O*-TMS-glycosides), which were obtained after methanolysis (1 M HCl in anhydrous methanol; 18 h at 80 °C) followed by trimethylsilylation using TRI-SIL reagent (Pierce) for 20 min at 80 °C (York, Darvill, McNeil, Stevenson, & Albersheim, 1985). The resulting methyl per-*O*-trimethylsilylglycosides were then analyzed by GC–MS using a DB-1 capillary column (Hewlett–Packard HP 5890 GC interfaced to a 5970 MSD). The temperature program used for GC–MS analysis was: 50–160 °C (20 °C min⁻¹), hold for 2 min, increase to 200 °C at a rate of 2 °C min⁻¹ and then to 250 °C at 10 °C min⁻¹. Neutral monosaccharides were also analyzed as their alditol acetate derivatives after hydrolysis (1 M TFA, 8 h at 100 °C), overnight reduction with NaBH₄ and acetylation of the material (Wolfrom & Thompson, 1963a, 1963b). GC–MS conditions were the same as described above.

Glycosyl linkage analysis was performed by the preparation of partially methylated alditol acetates (PMAA) according to Ciucanu and Kerek (Ciucanu & Kerek, 1984). The resulting PMAA derivatives were analyzed by GC–MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, with a DB-225 capillary column. Analyses were carried out from 50 to 220 °C at 40 °C min⁻¹, then maintaining the temperature (30 min). The products were identified by their typical retention times and electron impact profiles (Sasaki, Gorin, Souza, Czelusniak, & Iacomini, 2005).

The enantiomeric configuration of monosaccharides forming the acidic EPS and EPS-CR was determined by their 2-octyl-glycoside acetate derivatives as described by Leontein, Lindberg, and Lönngrén (1978) except that (–)-2-octyl-glycoside was used and that the column used was DB-23.

2.5. NMR spectroscopy

NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker DRX Avance spectrometer. Samples were deuterium exchanged by repeated freeze-drying from 99.8% D₂O (Aldrich) and then solubilized in 350 μL D₂O (100% D; Cambridge Isotope Laboratories) and transferred to 5 mm tubes. Analyses were carried out at 70 °C, acetone being used as chemical shift reference for ¹H (δ 2.22) and ¹³C (δ 31.5). Several 1D and 2D NMR experiments were done to assign the chemical shifts of constituent sugars. ¹H–¹H COSY and TOCSY, both collected with 64 pulses of 1024 × 256 data points (*t*₁ × *t*₂) and mixing time of 80 ms. Carbon chemical shifts were assigned by comparing COSY and TOCSY with 1D ¹³C NMR and 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) experiment. ¹J_{C–H} coupling constants were determined from the proton couples ¹³C NMR experiment.

2.6. ESI-MS of oligosaccharides

The oligosaccharide mixture obtained after partial hydrolysis of the acidic EPS was dissolved in MeOH:H₂O (1:1 v/v) (30 μg/mL) and analyzed using a Micromass Quattro LC spectrometer by direct injection. Analysis was carried out on negative mode using a single quadrupole with a mass window of *m/z* 150–950. The parameters used for the acquisition of ions were: capillary 5 kV, cone 200 V and ion energy 1.9 V.

3. Results

3.1. EPS purification and carboxy-reduction

Burkholderia tropica, strain Ppe8, was grown for 72 h in liquid JMV medium until its exponential phase was reached (OD₆₀₀ ~ 8.0). The medium was freed of cells by centrifugation and the resulting supernatant was concentrated, treated with excess cold ethanol and the resulting precipitate dialyzed. The product was then applied to a Q-Sepharose column eluted with a gradient of NaCl up to 1 M. A single carbohydrate-containing fraction was eluted at 520 mM NaCl, providing purified acidic EPS. The amount of material obtained after purification corresponded to approximately 850 mg L⁻¹ of liquid culture. A portion of the EPS was submitted to carboxy-reduction to give neutral EPS-CR. Reduction was complete when FT-IR analysis showed the absence of a band corresponding to carboxyl groups at 1740 cm⁻¹. The yield of the material recovered as neutral EPS-CR was approximately 95%.

3.2. Monosaccharide composition and enantiomeric characterization

Both native EPS and EPS-CR had their monosaccharide composition determined by their per-*O*-TMS-methyl glycosides. The acidic EPS contained Rha, Glc and GlcA in an approximate molar ratio of 2.0:2.0:1.0, while carboxy-reduced EPS (EPS-CR) had Rha and Glc in a 1.0:1.5 molar ratio, respectively. Neutral sugars were also analyzed as their alditol acetate derivatives. As acidic units are not represented on GC–MS of alditol acetate derivatives, both the acidic EPS and EPS-CR gave rise to Rha and Glc, although EPS-CR showed a higher amount of Glc, resulting from the reduction of the GlcA unit of the acidic EPS to its corresponding neutral analogue. Results on the monosaccharide composition are summarized on Table 1. The hydrolyzate of EPS and EPS-CR were also derivatized to form (–)-2-octyl glycoside acetates, which were then submitted to GC–MS analysis. The chromatogram profiles were very similar for both samples, each containing eight peaks with retention times and fragmentation profiles corresponding to L-rhamnose and D-glucose. Since the chromatogram for EPS-CR showed only (–)-2-octyl-D-glucosyl acetate derivatives, it was assumed that the glucuronic acid unit present on the native EPS structure was present as the D-enantiomer.

3.3. Linkage analysis and NMR results for EPS and EPS-CR

Methylation analysis of acidic EPS (Table 1) showed the presence of 3-*O*- and 2,4-di-*O*-substituted Rhap and 4-*O*-substituted Glcp units. The molar ratio found for the PMAA derivatives was 1.0:1.1:2.0 for 2,4-Me₂-Rhap, 3-Me-Rhap and 2,3,6-Me₃-Glcp, respectively. PMAA derivatives of neutral EPS-CR revealed the presence of a non-reducing end unit of GlcpA, not shown for EPS, as a derivative of 2,3,4,6-Me₄-Glcp, as well as 2,4-Me₂- and 3-Me-Rhap, and 2,3,6-Me₃-Glcp derivatives in a molar ratio of 1.2:1.1:1.0:2.2, respectively.

The ¹³C NMR spectrum of EPS (Fig. 1) contained four signals in the anomeric region at δ 103.0 (E1), 99.0 (D1), 97.9 (C1 + B1) and 94.6 (A1). The CH₃-6 of rhamnosyl units was at δ 16.7 and those at δ 175.4 and 173.4 were from GlcA –CO₂ (A6) and acetyl substituents –CO₂CH₃, respectively, the latter also giving rise to a CO₂CH₃ signal at δ 20.3. Two –CH₂OH-6 signals of Glcp units were present at δ 60.9 (C6) and 60.7 (E6), suggesting the absence of O-6 substituted Glcp units, also shown by methylation analysis. The ¹³C/¹H-coupled spectrum of EPS had C-1 doublets centered at δ 94.6, 97.9, 99.0 and 103.0. Coupling constants of each pair-signals were attributed to α-D-GlcpA (*J*_{C-1,H-1} = 170 Hz), α-D-Glcp (*J*_{C-1,H-1} = 170 Hz), α-L-Rhap (*J*_{C-1,H-1} = 160 Hz), β-L-Rhap (*J*_{C-1,H-1} = 168 Hz) and β-D-Glcp (*J*_{C-1,H-1} = 160 Hz) units.

The ¹³C NMR spectrum of EPS-CR had five anomeric signals at δ 103.2 (E'1), 100.7 (B'1), 98.3 (D'1), 98.2 (C'1) and δ 95.7 (A'1), corresponding to β-D-Glcp, α-L-Rhap, β-L-Rhap and two α-D-Glcp units, respectively, the last being the corresponding to non-reducing from the terminal GlcpA units, found in the acidic EPS. Three CH₂OH-6 signals arose at δ 61.4 (E'6), 61.1 (C'6) and 60.7 (A'6), the extra one arising from the carboxy-reduced GlcpA units. CH₃-6 of rhamnosyl units appeared at δ 17.1 (B'6 + D'6). High frequency signals of uronic acids were absent, as were those of *O*-acetyl substituents, due to de-*O*-acetylation during carboxy-reduction. The signal that arose at δ 81.1 was assigned to the *O*-substituted C-3 of a rhamnopyranosyl units.

Fig. 2 shows the ¹H NMR anomeric region for both EPS and EPS-CR. The acidic EPS gave rise to four anomeric signals, and the integrated relative area suggested that the one at δ 5.02 might be from two overlapping signals (A1 + D1) attributed to the terminal α-D-GlcpA and 3-*O*-[2-*O*Ac]-β-L-Rhap units, which was confirmed by 2D experiments. The other signals were assigned as 4-*O*-β-D-Glcp (δ 4.68), 2,4-*O*-α-L-Rhap (δ 4.88) and 4-*O*-α-D-Glcp (δ 4.96). Five anomeric signals appeared in the ¹H NMR spectrum of EPS-CR. Integration areas were determined and the signals found at δ 4.61 (E'1), 4.73 (B'1), 4.94 (D'1), 4.97 (C'1) and 5.03 (A'1) were attributed to 4-*O*-β-

Table 1
Monosaccharide composition and linkage analysis for the acidic EPS and its carboxy-reduced product (EPS-CR)

	Derivatives						Linkage
	per- <i>O</i> -TMS ^a		Alditol acetate ^b		PMAA ^c		
	EPS	EPS-CR	EPS	EPS-CR	EPS	EPS-CR	
Rha	1.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	→3)-Rhap-(1→ ^A
Glc	2.0	1.5	1.0	1.5	1.1	1.1	→2,4)-Rhap-(1→ ^B
GlcA	1.0	–	–	–	2.0	2.2	→4)-Glcp-(1→ ^C
					–	1.2	<i>t</i> -Glcp ^D

Linkages shown are abbreviations of: ^A1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-rhamnitol, ^B1,2,4,5-tetra-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-rhamnitol, ^C1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-glucitol, ^D1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-glucitol.

Values are shown as relative molar contents.

^a Monosaccharides were analyzed as per-*O*-trimethylsilyl-methyl glycoside derivatives obtained after methanolysis and TRI-SIL treatment.

^b Alditol acetate derivatives were formed after hydrolysis, overnight reduction with NaBH₄ and acetylation.

^c Partially *O*-methylated alditol acetates obtained after methylation, followed by methanolysis, hydrolysis, reduction with NaBD₄ and acetylation.

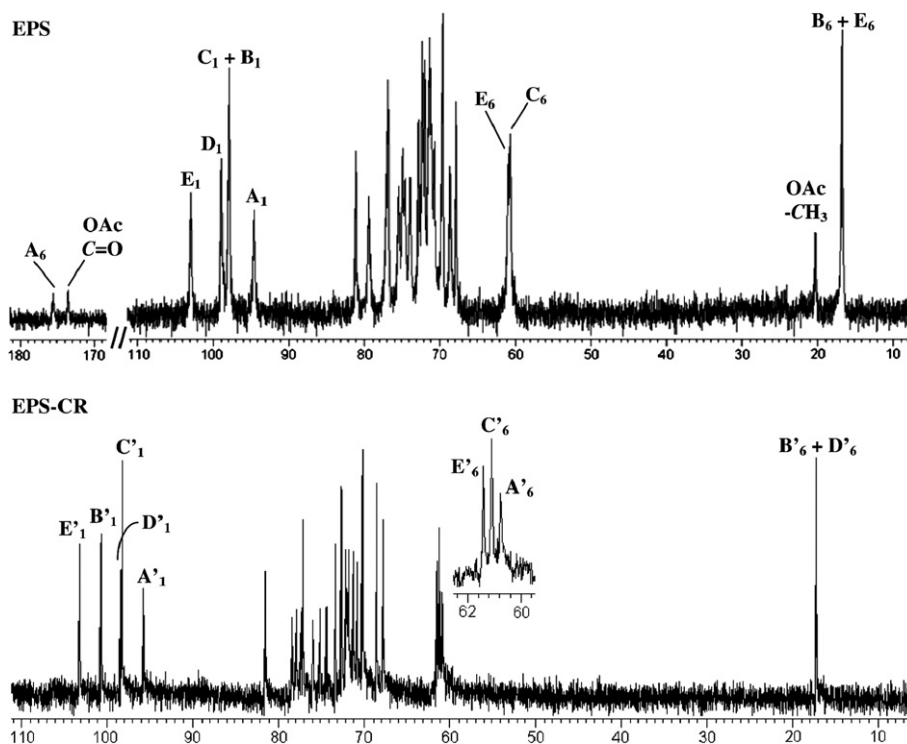


Fig. 1. ^{13}C NMR spectrum of acidic EPS and neutral EPS-CR. Monosaccharide units for the acidic EPS are represented as: A (*t*- α -D-GlcAp), B (\rightarrow 2,4- α -L-Rhap), C (\rightarrow 4- α -D-Glcp), D (\rightarrow 3-[2-OAc]- β -L-Rhap), E (\rightarrow 4- β -D-Glcp). EPS-CR monosaccharide units are represented as: A' (*t*- α -D-Glcp), B' (\rightarrow 2,4- α -L-Rhap), C' (\rightarrow 4- α -D-Glcp), D' (\rightarrow 3- β -L-Rhap), E' (\rightarrow 4- β -D-Glcp). Scale is shown in δ (ppm).

D-Glcp, 2,4-*O*- α -L-Rhap, 3-*O*- β -L-Rhap, 4-*O*- α -D-Glcp and *t*- α -D-Glcp units, respectively. The signal at δ 4.61 in both spectra (E1 and E'1) showed a $J_{\text{H1,H2}} = 7.05$ Hz confirming it to be from β -D-Glcp units. A down-field signal at δ 5.59 arose from EPS, and was attributed to H-2 of 3-*O*- β -L-Rhap units with an acetyl substituent ($-\text{CH}_3$ at δ 2.15) at C-2. This signal was not present in the EPS-CR spectrum, since the acetyl groups are removed after carboxy-reduction. The area of this signal in comparison to that obtained for H-1 of β -L-Rhap units was 0.8:1.0, showing that acetyl substituents were present at approximately 80% of C-2 nuclei of the β -L-Rhap units.

When EPS was submitted to HMQC analysis, the spectrum indicated that it had five distinct anomeric carbons, with overlapping signals in both the ^{13}C (δ 97.9) and ^1H (δ 5.02) spectra. A $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation was found at δ 5.59/68.1 corresponding to H2/C2 of the β -L-Rhap units with its *O*-acetyl substituent. The methyl group of *O*-acetyl was detected by correlation of δ 2.15/20.3. The *O*-substituted C-3 signal of the β -L-Rhap units was assigned to that with δ 4.16/81.1, corresponding to the H3/C3.

The TOCSY spectrum of EPS (Fig. 3) had several correlations for anomeric protons from each unit. The H-1 signals of β -L-Rhap and α -D-GlcpA were each at δ 5.02. The 3-*O*- β -L-[2-OAc]-Rhap showed correlations of H1/H2 (δ 5.02/5.59), H2/H2 (δ 5.59/5.59), H2/H3 (δ 5.59/4.16), H2/H4 (δ 5.59/3.87) and H2/H5 (δ 5.59/3.49). These correlations confirmed the position of the *O*-acetyl groups linked to C-2 of the β -L-Rhap units. Correlations for

\rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow) were observed at δ 4.62/4.62 (H1/H1), δ 4.62/3.28 (H1/H2), δ 4.62/3.41 (H1/H3) and δ 4.62/3.62 (H1/H4). Correlation of the \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow) residue corresponded to H1/H2 at δ 4.96/3.74, H1/H3 at δ 4.96/3.45 and H1/H4 at δ 4.96/3.54. The di-*O*-substituted α -L-Rhap units (2,4-di-*O*- α -L-Rhap) showed couplings of H1/H2 and H1/H4 at δ 4.88/4.18 and δ 4.88/3.99, respectively. Vicinal $^1\text{H}/^1\text{H}$ correlations were also confirmed by COSY.

HMQC and TOCSY correlations for EPS-CR were also determined. In respect to the chemical shifts observed due to the carboxy-reduction process and removal of acetyl ester substituents, the main difference in correlations observed were for the β -L-Rhap units, which showed a H1/H2 coupling at δ 4.94/3.50, as well as others from H1/H3 and H1/H4, found at δ 4.94/3.38 and δ 4.94/3.62, respectively. Table 2 summarizes all assignments found for the acidic EPS and EPS-CR after HMQC, COSY and TOCSY analyses.

3.4. Structural analysis of oligosaccharides obtained from the acidic EPS

After partial hydrolysis of EPS, the resulting oligosaccharides were isolated by size exclusion chromatography on a BioGel-P2 column. Four fractions were obtained (I–IV), fraction I being the later eluting fraction and fraction IV being the early eluting fraction. Monosaccharide compositions of each fraction was determined by GC–MS as

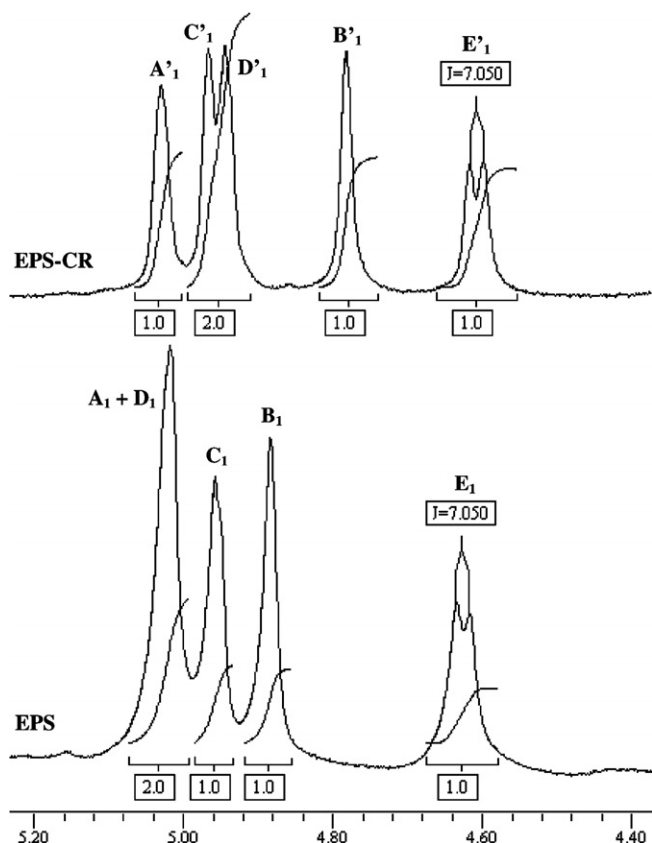
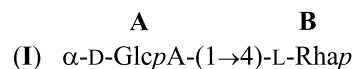


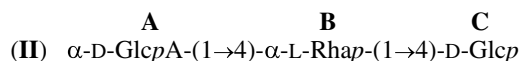
Fig. 2. Partial ^1H NMR spectra of EPS and EPS-CR. Anomeric proton signals for the acidic EPS are as: A_1 (t - α -D-GlcAp), B_1 ($\rightarrow 2,4$ - α -L-Rhap), C_1 ($\rightarrow 4$ - α -D-Glcp), D_1 ($\rightarrow 3$ -[2-OAc]- β -L-Rhap), E_1 ($\rightarrow 4$ - β -D-Glcp). EPS-CR anomeric proton signals are represented as: A'_1 (t - α -D-Glcp), B'_1 ($\rightarrow 2,4$ - α -L-Rhap), C'_1 ($\rightarrow 4$ - α -D-Glcp), D'_1 ($\rightarrow 3$ - β -L-Rhap), E'_1 ($\rightarrow 4$ - β -D-Glcp). Integration areas are shown below each signal. Coupling constant (J) for E_1 and E'_1 are shown in Hz above their corresponding signals. Scale is shown in δ (ppm).

per- O -TMS methyl glycoside derivatives. Methylation analyses were also performed to determine the structure of their glycosidic linkage (Table 3). All fractions were analyzed by ^1H NMR and HMQC, although, assignments of all proton and carbon resonances was possible only for fraction I (Table 4).

^1H NMR analysis of fraction I showed a characteristic rhamnosyl $-\text{CH}_3$ -6 signal at δ 1.35. Reducing signals of L-Rhap units were found at δ 5.18 and δ 4.90, from α and β anomers, respectively. The assignment of all protons and carbons was determined by HMQC analysis. The glucuronosyl residue was shown to be α -D-GlcAp linked to O-4 of the reducing rhamnosyl unit (H4/C4 at δ 3.94/76.6), which was confirmed by methylation analysis that showed a single 1,4,5-tri- O -acetyl-2,3-di- O -methyl-rhamnitol derivative (unit B). The structure of the acidic disaccharide found in fraction I is shown below:



The proton spectrum of fraction II suggested the presence of a trisaccharide as H-1 signals were found at δ 5.19, 4.96 and 5.06/4.92, the last arising from the α and β configuration of $\rightarrow 4$ -D-Glcp units (C), as also shown by methylation analysis. A characteristic signal at δ 1.29 was attributed to H-6 of rhamnosyl units (B). Based on the PMAA derivatives found and on HMQC analysis, the structure of the oligosaccharide obtained on fraction II was:



Both fractions III and IV had rhamnosyl units as reducing ends, as shown by their H-1 signals at δ 5.09/4.92, arising from α and β forms, respectively. However, as determined by PMAA derivatives and by the anomeric signals found for each sample, fraction III was a tetrasaccharide and fraction IV a pentasaccharide. HMQC of both fractions had H6/C6 coupling of two rhamnosyl units at δ 1.31/17.1 (B) and δ 1.29/16.8 (D), respectively. Fraction IV also had β -D-Glcp units (E) linked to O-2 of di- O -substituted rhamnosyl residues (B). The corresponding $^1\text{H}/^{13}\text{C}$

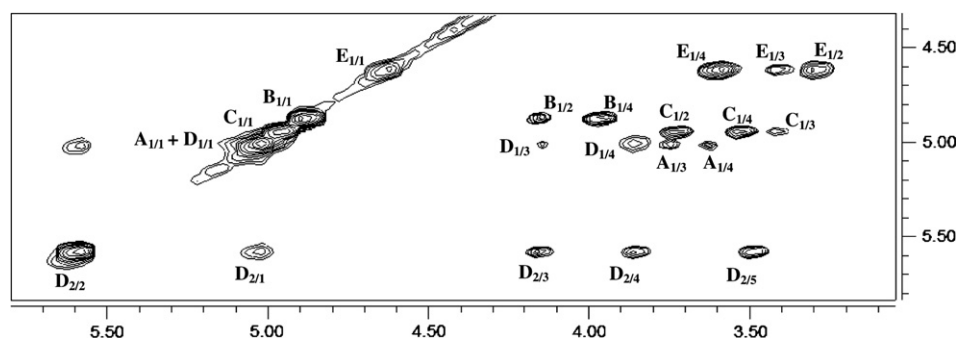


Fig. 3. Partial TOCSY spectrum of EPS showing anomeric region and $^1\text{H}/^1\text{H}$ correlation signals of residues: A (t - α -D-GlcAp), B ($\rightarrow 2,4$ - α -L-Rhap), C ($\rightarrow 4$ - α -D-Glcp), D ($\rightarrow 3$ -[2-OAc]- β -L-Rhap), E ($\rightarrow 4$ - β -D-Glcp). EPS-CR monosaccharide units are represented as: A' (t - α -D-Glcp), B' ($\rightarrow 2,4$ - α -L-Rhap), C' ($\rightarrow 4$ - α -D-Glcp), D' ($\rightarrow 3$ - β -L-Rhap), E' ($\rightarrow 4$ - β -D-Glcp). Scale is shown in δ (ppm).

Table 2
¹H and ¹³C assignments for the acidic EPS and EPS-CR, acquired after mono- and bidimensional NMR analyses

Unit	EPS	EPS												
		H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C=O ^a
A	α-D-GlcAp-(1→	5.02	3.55	3.77	3.63	3.69	–	94.6	75.6	74.2	76.6	73.1	175.5	–
B	→2,4)-α-L-Rhap-(1→	4.88	4.18	3.58	3.99	3.88	4.07	97.9	74.0	74.5	78.1	72.3	16.7	–
C	→4)-α-D-Glcp-(1→	4.96	3.74	3.5	3.54	3.55	3.76	97.9	72.1	71.8	79.5	72.9	60.7	–
D	→3)-[2-OAc]-β-L-Rhap-(1→	5.02	5.59	4.16	3.87	3.49	1.32	99.0	68.1	81.1	nd	70.8	16.7	173.4
E	→4)-β-D-Glcp-(1→	4.62	3.28	3.41	3.62	3.45	3.71	103.0	73.8	75.5	78.3	nd	60.9	–
		EPS-CR												
A'	α-D-Glcp-(1→	5.03	3.54	3.70	3.75	3.62	3.74	95.7	77.4	74.6	nd	74.1	60.7	–
B'	→2,4)-α-L-Rhap-(1→	4.73	4.21	3.59	3.92	3.35	1.26	100.7	73.8	75.5	78.3	70.2	17.1	–
C'	→4)-α-D-Glcp-(1→	4.97	3.77	3.49	3.48	3.58	3.67	98.2	67.9	67.1	79.1	nd	61.1	–
D'	→3)-β-L-Rhap-(1→	4.94	3.50	4.22	3.72	3.42	1.30	98.3	79.9	81.4	nd	69.6	17.1	–
E'	→4)-β-D-Glcp-(1→	4.61	3.28	3.38	3.62	3.46	3.72	103.2	73.9	nd	78.5	nd	61.4	–

Values are shown in δ (ppm).

nd, not determined.

^a Carbonyl group of the acetyl substituent. ¹H and ¹³C for methyl group of acetyl were found at δ 2.15 and δ 20.3, respectively.

Table 3
 Monosaccharide composition and linkage analysis of oligosaccharides obtained from partial hydrolysis of the acidic EPS

	Derivatives								Linkage
	per- <i>O</i> -TMS ^a				PMAA ^b				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Rha	1.0	1.0	1.9	1.9	–	–	1.0	1.0	→3)-Rhap-(1→ ^A
Glc	–	1.1	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	–	→4)-Rhap-(1→ ^B
GlcA	1.1	1.0	1.0	1.0	–	1.1	1.1	2.1	→4)-Glcp-(1→ ^C
					–	–	–	1.1	→2,4)-Rhap-(1→ ^D

Linkages shown are abbreviations of: ^A1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4-di-*O*-methyl-rhamnitol, ^B1,4,5-tri-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-rhamnitol, ^C1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-glucitol, ^D1,2,4,5-tetra-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-rhamnitol. Values are those of as relative molar contents.

^a Monosaccharides were analyzed as per-*O*-trimethylsilyl-methyl glycoside derivatives obtained after methanolysis and TRI-SIL treatment.

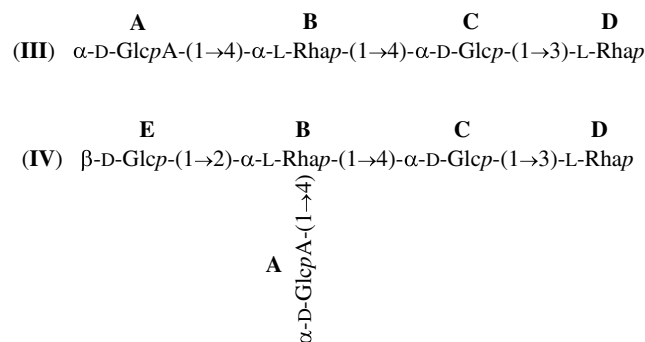
^b Partially *O*-methylated alditol acetates obtained after methylation, followed by methanolysis, hydrolysis, reduction with NaBD₄ and acetylation.

Table 4
¹H and ¹³C NMR assignments for the acidic disaccharide (fraction I) obtained on partial hydrolysis of EPS

Unit	C or H	¹ H	¹³ C
α-D-GlcAp	1	5.13	96.6
	2	3.68	72.1
	3	4.25	72.9
	4	3.96	69.5
	5	3.58	73.0
	6	–	–
L-Rhap	1	5.18/4.90 ^a	94.7/94.2 ^a
	2	4.19	68.8
	3	3.88	73.8
	4	3.94	76.6
	5	3.48	73.0
	6	1.35	17.2

^a α/β configurations of L-Rhap reducing units.

coupling found in fraction IV at δ 4.29/72.1 confirms the linkage, together with the formation of 1,2,4,5-tetra-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-rhamnitol derivative, formed on methylation analysis. Structures found for the oligosaccharides of fractions III and IV are as shown:



The results for these oligosaccharides were consistent with negative mode ESI-MS examination for the mixture obtained on partial hydrolysis of EPS (Fig. 4). Six main molecular ions were formed, namely M1 to M6. Based on the mass difference between two adjacent ions, as well as on the methylation and NMR analysis of the purified oligosaccharides, each *m/z* signal was assigned as follows. M5 was at *m/z* 809.2 and was determined as being the pentasaccharide present in fraction IV, arising from [GlcA,Glc₂,Rha₂-H][–]. The ion that appeared at *m/z* 851.3

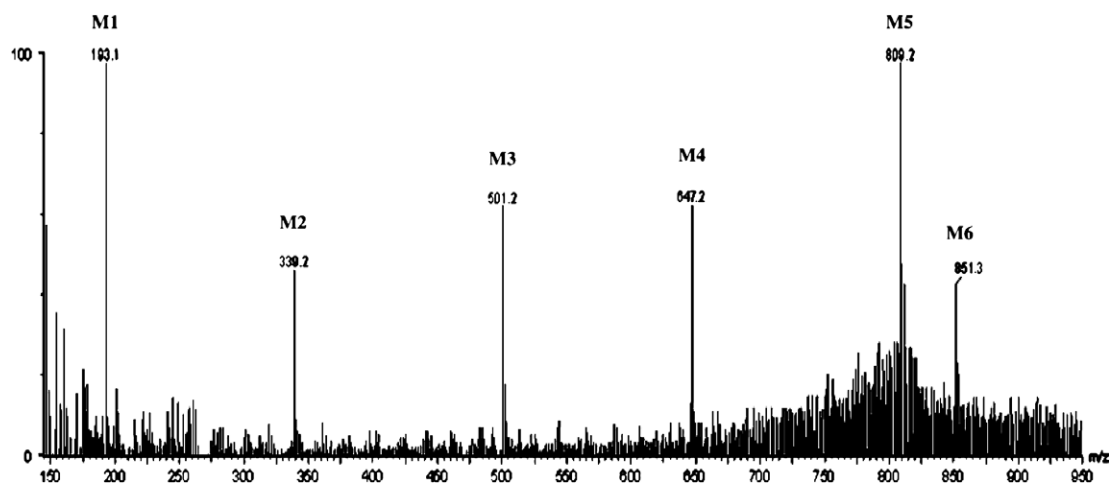
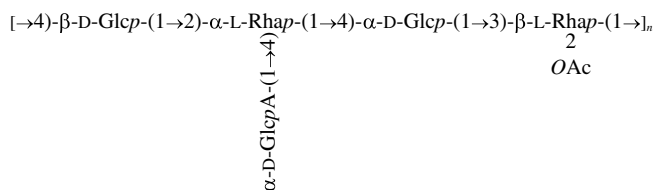


Fig. 4. Negative mode ESI-MS of oligosaccharide mixture obtained on partial hydrolysis of EPS. Signals are named: M1 [GlcA-H]⁻, M2 [GlcA,Rha-H]⁻, M3 [GlcA,Glc,Rha-H]⁻, M4 [GlcA,Glc,Rha₂-H]⁻, M5 [GlcA,Glc₂,Rha₂-H]⁻, M6 [GlcA,Glc₂,Rha₂,OAc-H]⁻.

(M6) had a 42 mass unit greater than that at M5, characteristic of an acetyl substituent, and was thus assigned as [GlcA,Glc₂,Rha₂,OAc-H]⁻. Ions found at *m/z* 647.2 (M4), 501.2 (M3) and 339.2 (M2) corresponded to the oligosaccharides present in fractions III, II and I, respectively, and are thus as [GlcA,Glc,Rha₂-H]⁻, [GlcA,Glc,Rha-H]⁻ and [GlcA,Rha-H]⁻. An ion at *m/z* 193.1, corresponding to [GlcA-H]⁻ was present, which might have been either hydrolyzed during the process, or formed as a daughter ion from one of the oligosaccharides during ionization.

The pentasaccharide isolated in fraction IV, assigned on ESI-MS analysis as the ion arising at *m/z* 809.2 (M5), together with its corresponding acetylated form (M6), served to show the repeating unit of the acidic EPS. The reducing units of oligosaccharides III and IV, assigned as 3-*O*-β-L-Rhap (D), is also that which bears the *O*-acetyl substituent, as determined by the NMR assignments, and thus is present as a →3)-[2-*O*Ac]-β-L-Rhap unit.

The results shown herein can indicate that the extracellular polysaccharide produced by *B. tropica*, strain Ppe8, is formed by a branched pentasaccharide repeating unit with the following structure:



4. Discussion

Exopolysaccharides are important signaling molecules during plant–bacteria association. Nitrogen-fixing bacteria of the family *Rhizobiaceae* are widely known to have EPS as key factors during nodulation and nitrogen fixa-

tion in leguminous plants. Endophytic bacteria, which do not produce specialized structures in plant tissues, have also been observed to produce EPS that is involved in plant invasion. We have now shown the structure of an acidic heteropolysaccharide produced by a strain of *B. tropica*, an endophytic diazotroph. This structure is different from those found for other species of the genus *Burkholderia*. However, one may note some similarities between the EPS biosynthesized by all species of *Burkholderia*, suggesting that the structure is somewhat fairly conserved and probably important for the association with grasses. The process by which *B. tropica* invades and colonizes plant tissues is still unknown. The branched structure bearing α-D-glucuronopyranosyl units may be directly involved in the symbiosis of this bacterium with its plant hosts. These non-reducing acidic units that substitute α-L-rhamnosyl units in the main chain of its EPS, seem to be ideal points of recognition by lectins present in plant root cells. Also, the *O*-acetyl substituents present in the β-L-rhamnosyl units may be involved in the symbiotic process. We believe that the fine structural characterization of bacterial EPSs is a first step towards understanding the importance and function of these molecules for plant–bacteria relationships.

Acknowledgements

We thank the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and the Núcleo de Fixação de Nitrogênio from Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brazil, for the isolation and characterization of the bacterial strain. Our investigation was supported by the Brazilian granting agencies, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária, and PRONEX-Carboidratos.

References

- Baldani, J. I., Por, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V. L. D., Olivares, F. L., et al. (1996). Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, *46*, 802–810.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., & Okon, Y. (1999). Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, *145*, 1145–1152.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M. E., Serrano, A. M. G., & Okon, Y. (2000). Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters*, *189*, 259–264.
- Burkholder, W. (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, *40*, 115–117.
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., & Estrada-De Los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*, 1165–1172.
- Carlson, R. W., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S., Kannenberg, E. L., & Goldberg, J. B. (1999). Rhizobial cell surface carbohydrates: Their structures, biosynthesis, and functions. In J. B. Goldberg (Ed.), *Genetics of bacterial polysaccharides* (pp. 53). Ann Arbor: Ann Arbor Press.
- Cérantola, S., Marty, N., & Montrozier, H. (1996). Structural studies of the acidic exopolysaccharide produced by a mucoid strain of *Burkholderia cepacia*, isolated from cystic fibrosis. *Carbohydrate Research*, *285*, 59–67.
- Ciucanu, J., & Kerek, F. (1984). Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, *131*, 209–217.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, *5*, 719–729.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, *41*, 435–464.
- Cruz, L. M., Maltempi-de Souza, E., Weber, O. B., Baldani, J. I., Döbereiner, J., & Pedrosa, F. O. (2001). 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* sp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 2375–2379.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350–356.
- Estrada, P., Mavingui, P., Cournoyer, B., Fontaine, F., Balandreau, J., & Caballero-Mallado, J. (2002). A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. Associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, *48*, 285–294.
- Gillis, M., Trần Van, V., Bardin, R., Goor, M., Hebban, P., Willems, A., et al. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *45*, 274–289.
- González, J. E., Reuhs, B. L., & Walker, G. C. (1996). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, *93*, 8636–8641.
- Govan, J. R. W., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiology Reviews*, *60*, 539–574.
- Leigh, J. A., Signer, E. R., & Walker, G. C. (1985). Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proceedings of the National Academy of Science*, *82*, 6231–6235.
- Leontein, K., Lindberg, B., & Lönnngren, J. (1978). Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. *Carbohydrate Research*, *62*, 359–362.
- Linker, A., Evans, L. R., & Impallomeni, G. (2001). The structure of a polysaccharide from infectious strains of *Burkholderia cepacia*. *Carbohydrate Research*, *335*, 45–54.
- Mattos, K. A., Jones, C., Heise, N., Previato, J. O., & Mendonça-Previato, L. (2001). Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis*. *European Journal of Biochemistry*, *268*, 3174–3179.
- Reis, V. M., Estrada-De Los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffles, M., Guyon, S., et al. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*, 2155–2162.
- Romantschuk, M. (1992). Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, *30*, 225–243.
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC–MS: Some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, *340*, 731–739.
- Serrato, R. V., Sasaki, G. L., Cruz, L. M., Pedrosa, F. O., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2006). Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*, 489–493.
- Sist, P., Cescutti, P., Skerlavaj, S., Urbani, R., Leitão, J. H., Sá-Correia, I., et al. (2003). Macromolecular and solution properties of Cepacian: the exopolysaccharide produced by a strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient. *Carbohydrate Research*, *338*, 1861–1867.
- Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*, 487–506.
- Steinmetz, I., Rhode, M., & Brennek, B. (1995). Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia* (*Pseudomonas pseudomallei*). *Infectology and Immunology*, *63*, 3959–3965.
- Steinmetz, I., Nimitz, M., Wray, V., Häußler, V., Reganzerowski, A., & Brennek, B. (2000). Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Tropica*, *74*, 211–214.
- Taylor, R. L., & Conrad, H. E. (1972). Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, *11*, 1383–1388.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Achouak, W., & Heulin, T. (2001). Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. *Carbohydrate Research*, *334*, 127–133.
- Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology*, *34*, 415–420.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, *2*, 65–67.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, *2*, 211–215.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., et al. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, *36*, 1251–1275.
- York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Stevenson, T. T., & Albersheim, P. (1985). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods in Enzymology*, *118*, 3–40.