

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

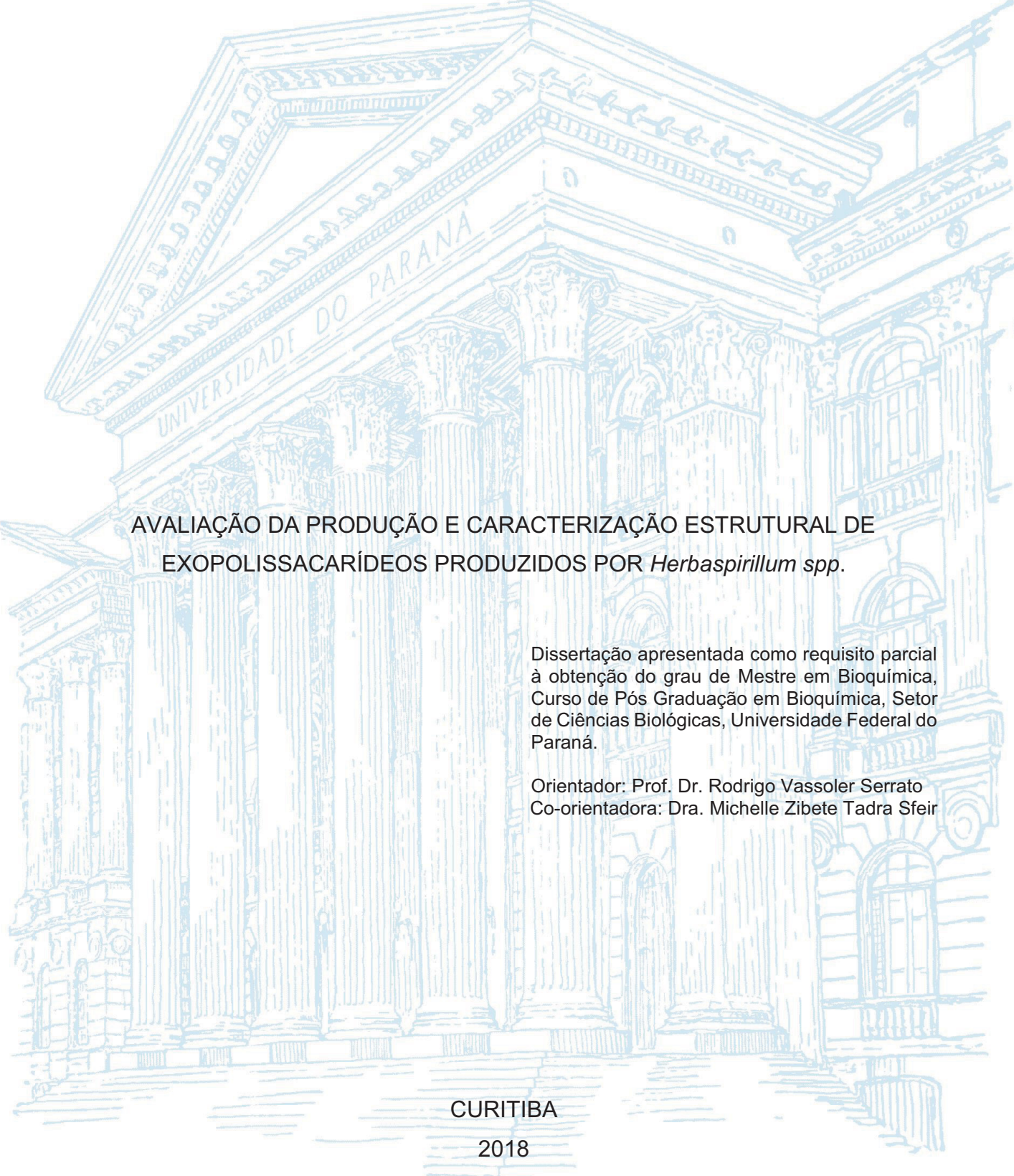
VALQUÍRIA DANIELE CASANOVA ANTUNES

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *Herbaspirillum* spp.

CURITIBA

2018

VALQUÍRIA DANIELE CASANOVA ANTUNES



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *Herbaspirillum spp.*

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica,
Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato
Co-orientadora: Dra. Michelle Zibete Tadra Sfeir

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Antunes, Valquíria Daniele Casanova

Avaliação da produção e caracterização estrutural de exopolissacarídeos produzidos por *Herbaspirillum spp.* / Valquíria Daniele Casanova Antunes. – Curitiba, 2018.

55 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Rodrigo Vassoler Serrato.

Coorientadora: Michelle Zibetti Tadra Sfeir.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Herbaspirillum. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Polissacarídeos. 4. Nitrogênio - Fixação i. Título. II. Serrato, Rodrigo Vassoler. III. Sfeir, Michelle Zibetti Tadra. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

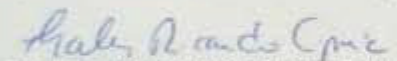
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **VALQUÍRIA DANIELE CASANOVA ANTUNES**, intitulada: **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE EXOPOLISSCARÍDEOS PRODUZIDOS POR HERBASPIRILLUM SPP.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Agosto de 2018.


RODRIGO VASSOLER SERRATO(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


FERNANDÁ FOGAGNOLI SIMAS(UFPR)


THALES RICARDO CIPRIANI(UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta com a construção deste trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato e Dra Michelle Zibetti Tadra Sfeir, pelos ensinamentos teórico-práticos e, principalmente, pela compreensão com o tempo limitado para execução do trabalho.

Aos avaliadores do projeto, Prof. Thales Ricardo Cipriane e Prof. Luciano Fernandes Huergo, pelas correções e considerações.

Aos coordenadores da Pós Graduação em Ciências Bioquímicas, Prof^a Gláucia Regina Martinez e Prof Guilherme Lanzi Sasaki, por viabilizar recurso não material mais importante: tempo!

Aos colegas de laboratório, pelo ganho intelectual e pessoal.

Aos técnicos do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio e do grupo de Carboidratos, pela imensa contribuição em todas as pesquisas realizadas no departamento.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“ Toda decisão acertada é proveniente de experiência. E toda experiência é proveniente de uma decisão não acertada. ”

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

O gênero *Herbaspirillum* é composto por bactérias encontradas em associação com plantas, livres no meio ambiente ou, ainda, em secreções biológicas de seres humanos. Algumas espécies possuem a capacidade de fixar nitrogênio e são amplamente estudadas, principalmente, com relação aos mecanismos de interação com plantas, dada a importância econômica e ambiental no processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Um dos fatores que contribuem para o processo de invasão de bactérias no hospedeiro é a produção de exopolissacarídeos (EPS), componentes fundamentais dos biofilmes e que, em alguns casos, podem agir como sinalizadores moleculares da comunicação bactéria-hospedeiro. Atualmente, pouco se sabe a respeito da capacidade de produção de EPS por bactérias do gênero *Herbaspirillum*, e ainda menos sobre a composição e estrutura destes biopolímeros. O presente estudo avaliou a produção de EPS em 27 estirpes de diferentes espécies de *Herbaspirillum*, sendo 21 isoladas de plantas ou solo, 3 isoladas de água e 3 isolados de pacientes com fibrose cística. Dentre elas, 6 apresentaram alta correlação carboidrato/proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) e, conseqüentemente, maior produção de EPS em meio NFb malato líquido: *H. hutense putei* IAM15032 (105,6 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. lusitanum* P612 (65,9 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. hiltineri* N3 (49,1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. frisingense* GSF30 (37,2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. seropedicae* AU14040 (35,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$) e *H. frisingense* AU14559 (31,7 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$). Considerando que as três estirpes com maior produção de EPS são bactérias não fixadoras de nitrogênio é possível hipotetizar que o processo de FBN por *Herbaspirillum spp.* não depende diretamente de sinalização mediada por EPS. Quanto à composição desses EPS, ramnose (43,2%), fucose (34,5%) e manose (17,0%) estavam presentes em maiores proporções em *H. hutense putei* IAM15032, *H. hiltineri* N3 e *H. frisingense* AU14559, respectivamente. Dessa forma, é possível sugerir que a composição monossacarídica de EPS de *Herbaspirillum* é variável entre as espécies, independentemente da capacidade do microorganismo promover a FBN. Na determinação das ligações glicosídicas os derivados 2,3,4,6-Me₄-Glc (4,8 a 69,6%) e 2,3,4,6-Me₄-Gal (25,1 a 64,6%) correspondentes às ligações *t*-Gluc e *t*-Gal foram observados na maioria das amostras. Unidades de 4-Rha (2,3-Me₂-Rha; 58%) e 2,4-Rha (3-Me-Rha; 6,6%) foram evidenciadas, apenas na amostra de *H. hutense putei* IAM15032, corroborando resultados anteriores.

Palavras-chave: *Herbaspirillum*; exopolissacarídeo; fixação biológica nitrogênio.

ABSTRACT

The genus *Herbaspirillum* includes several species both non-plant and plant associated or human clinical isolates. Some species enabled to fix nitrogen extensively studied in relation mechanisms of interaction with plants, given the economic and environmental importance in biological nitrogen fixation process (BNF). One of the methods that contribute to the invasion process of non-host bacteria is the production of exopolysaccharides (EPS), fundamental components of biofilms, which in some cases are capable of boosting host-bacterial communication. Actually, there is not evidences of EPS capacity from *Herbaspirillum* and even less about structure of these biopolymers. The present study evaluated the EPS production in 27 strains of *Herbaspirillum* species, 21 isolates of plants or soil, 3 water isolates and 3 clinical isolates from patients with cystic fibrosis. Among them, 6 presented a high carbohydrate / protein ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) correlation and, consequently, higher EPS production in liquid NFB malate medium: *H. huttiense putei* IAM15032 (105,6 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. lusitanum* P612 (65,9 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. hiltineri* N3 (49,1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. frisingense* GSF30 (37,2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), *H. seropedicae* AU14040 (35,5 $\mu\text{g} / \mu\text{g}$) and *H. frisingense* AU14559 (31,7 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$). Considering the three strains with higher EPS production are non-nitrogen fixing bacteria it is possible to hypothesize that the FBN process by *Herbaspirillum* spp. does not directly depend on EPS-mediated signaling. As for EPS, rhamnose (43,2%), fucose (34,5%) and mannose (17,0%) presented in higher proportions in *H. putei huttiense* IAM15032, *H. hiltineri* N3 and *H. frisingense* AU14559, respectively. So that it is possible to suggest a monosaccharide composition of *Herbaspirillum* EPS is a variable among species, regardless of the ability of the microorganism to promote a BNF. In the glycosidic linkages the 2,3,4,6-Me4-Glc derivatives (4,8 to 69,6%) and 2,3,4,6-Me4-Gal (25.1 to 64.6%) derivatives The t-Gluc and t-Gal chickens were observed in the largest of the samples. 4-Rha (2,3-Me2-Rha, 58%) and 2,4-Rha (3-Me-Rha, 6.6%) were found only in the *H. huttiense putei* IAM15032 sample, corroborating results above.

Keywords: *Herbaspirillum*; exopolysaccharide; biological nitrogen fixation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Colonização endofítica por <i>H. seropedicae</i>	24
FIGURA 2 Perfil eletroforético da região 16S de <i>Herbaspirillum spp.</i>	40
FIGURA 3 Perfil eletroforético da região 16S de <i>Herbaspirillum spp.</i>	41
FIGURA 4 CCD de EPS hidrolizado produzidos por <i>Herbaspirillum spp.</i> ..	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Meios para cultivo e isolamento de <i>Herbaspirillum spp.</i>	17
TABELA 2	Espécies atuais de <i>Herbaspirillum spp.</i>	18
TABELA 3	EPS produzido por microorganismos de espécies diferentes.....	26
TABELA 4	Espécies e estirpes de <i>Herbaspirillum spp.</i> utilizadas.....	29
TABELA 5	Estirpes de <i>Herbaspirillum spp.</i> inicialmente incluídas no estudo.....	39
TABELA 6	Análise das sequências do 16S rRNA pelo Nucleotide Blast.....	42
TABELA 7	Estirpes incluídas na fase de avaliação da produção de EPS.....	42
TABELA 8	Avaliação da produção de EPS por <i>Herbaspirillum spp.</i> de acordo com a relação carboidrato-proteínas após cultivo em meio líquido.....	43
TABELA 9	Composição monossacarídica de EPS produzidos por <i>Herbaspirillum spp.</i>	46
TABELA 10	Proporção entre os monossacarídeos de EPS produzidos por <i>Herbaspirillum spp.</i>	47
TABELA 11	Derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA) de EPS de <i>Herbaspirillum spp.</i>	48

LISTA DE SIGLAS

AA	- Alditol acetato
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CHO	- Carboidratos
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
D.O. ₆₀₀	- Densidade óptica em 600 nm
EPS	- Exopolissacarídeo
FBN	- Fixação biológica de nitrogênio
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas
GET	- Glucose, Tris, EDTA
HePS	- Heteropolissacarídeo
HoPS	- Homopolissacarídeo
LPS	- Lipopolissacarídeo
PMAA	- Alditol acetato parcialmente metilado
PCR	- Reação da polimerase em cadeia
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RNA _r	- Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TFA	- Ácido trifluoroacético

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ara - Arabinose
- Gal - Galactose
- Glc - Glucose
- Glc A - Ácido glucurônico
- Mal - Maltose
- Man - Manose
- q.s.p.* - Quantidade suficiente para
- Rha - Rhamnose
- r.p.m - Rotações por minuto
- Xyl - Xilose

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

% - Porcentagem

B - Beta

δ - Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	<i>HERBASPIRILLUM SPP</i>	17
1.2	INTERAÇÃO PLANTA BACTÉRIA.....	21
1.3	EXOPOLISSACARÍDEOS.....	24
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
3.2	MEIO DE CULTURA.....	29
3.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	30
3.4	ANALISE MOLECULAR.....	30
3.4.1	Extração direta de DNA das colônias (Método A).....	30
3.4.2	Purificação de DNA do cultivo em meio líquido (Método B).....	31
3.4.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
3.4.4	Eletroforese em Gel de Agarose.....	32
3.4.5	Purificação dos produtos de PCR.....	32
3.4.6	Sequenciamento de DNA.....	32
3.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS.....	33
3.5.1	Extração dos EPS.....	33
3.5.2	Determinação de açúcares totais.....	34
3.6	CULTIVO EM GRANDE ESCALA.....	34
3.6.1	Extração dos EPS do cultivo em grande escala.....	34
3.7	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EPS.....	35
3.7.1	Determinação da Composição Monossacarídica dos EPS.....	35
3.7.2	Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	35
3.7.3	Determinação das ligações glicosídicas.....	36
3.7.4	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa.....	36
3.7.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	ANALISE MOLECULAR.....	39

4.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS.....	42
4.3	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	44
5	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Herbaspirillum* é amplamente conhecido por possuir espécies capazes de associar-se a plantas e promover a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Tais microorganismos são denominados diazotróficos e além de contribuírem com desenvolvimento de plantas de interesse econômico (milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar), representam fonte alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados (LADHA & REDDY, 2003). Além dos diazotótrofos, o gênero é composto por espécies não fixadoras de nitrogênio, encontradas associadas a plantas ou livres no meio ambiente, e por espécies isoladas de material biológico (BALDANI *et al.*, 1996; LAGIER *et al.*, 2012).

Independentemente do habitat, para que o microorganismo se desenvolva é necessário superar interações inibitórias do ambiente (metabólitos antimicrobianos, fitotoxinas, escassez de nutrientes) e/ou mecanismos de defesa do hospedeiro (barreiras físicas, resposta imunológica) (BAIS *et al.*, 2006; TYLER & TRIPLETT, 2008). Uma das formas de contornar essas barreiras é através da formação de biofilmes (LEIGH & WALKER *et al.*, 1992; COSTERTON *et al.*, 1995). O biofilme é formado por agregados de células bacterianas envoltos em uma matriz altamente organizada e hidratada, que auxilia o processo de colonização, sendo sua composição e estrutura influenciada por fatores genéticos (resposta ativa) e ambientais (resposta passiva) (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004; BOGINO *et al.*, 2013). Dentre os principais componentes da matriz estão os exopolissacarídeos (EPS), compostos “chave” que determinam propriedades físico-químicas e biológicas do biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2001). Acredita-se que EPS produzidos por *Herbaspirillum* estejam envolvidos no processo de interação planta-bactéria, promovendo adesão e comunicação celular (BROUGHTON *et al.*, 2006; JAMES *et al.*, 1997; JAMES & OLIVARES, 1998; OLIVARES *et al.* 1997).

Dado a escassez de informações acerca da composição de EPS produzidos por *Herbaspirillum* e a importância desses componentes, o presente estudo visa realizar a caracterização estrutural desses biopolímeros bem como avaliar a correlação entre as estruturas das diferentes estirpes estudadas.

1.1 HERBASPIRILLUM SPP.

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe das β -proteobactérias, que compreende bactérias gram negativas, em forma de espiral, geralmente vibróides, apresentando de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos. São microorganismos aeróbios, não fermentam açúcares, crescem utilizando ácidos orgânicos (malato, piruvato, succinato e fumarato) como fonte de carbono e a maioria fixa nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia (e, portanto, são diazotróficos), (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996; SCHIMID *et al.*, 2006). São cultiváveis em meio NFb e JNFb (TABELA 1), sendo o JNFb utilizado para isolamento e diferenciação. As colônias inoculadas em placas contendo ágar JNFb e azul de bromotimol são lisas e brancas com centros azuis ou verdes após uma semana de incubação. A temperatura ideal para crescimento varia de 30 a 34 °C e o pH ótimo de 5,3 a 8,0 (SCHIMID *et al.*, 2006).

TABELA 1. Meios para cultivo e isolamento de *Herbaspirillum spp.*

Ingredientes (por litro)	NFb	NFb	JNFb	JNFb
	líquido ^a	sólido ^a	líquido ^a	sólido ^a
DL-ácido málico	5 g	5 g	5 g	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g	0,5 g	0,13 g	0,13 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	0,2 g	0,25 g	0,25 g
NaCl	0,1 g	0,1 g	1,2 g	1,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g	0,02 g	0,25 g	0,25 g
Na ₂ SO ₄	0	0	2,40 g	2,40 g
NaHCO ₃	0	0	0,22 g	0,22 g
Na ₂ CO ₃	0	0	0,09 g	0,09 g
K ₂ SO ₄	0	0	0,17 g	0,17 g
Microelementos ^b	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2N	0	0	2 mL	2 mL
Fe-EDTA 1,64%	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
pH (ajustar com KOH)	6,5	6,5	5,8	5,8
Solução de vitaminas ^c	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Ágar	0	25 g	0	25 g

^a Os ingredientes devem ser adicionados na ordem indicada. Para cultivo de microrganismos fixadores de nitrogênio deve-se adicionar 20 mM NH₄Cl

^b 0,4g CuSO₄.5H₂O; 0,12g ZnSO₄.7H₂O; 1,4g H₂BO₃; 1,0g Na₂MoO₄.2H₂O; 1,5g MnSO₄.H₂O e H₂O *qsp.* 1000 mL

^c 10 mg biotina; 20 mg cloridrato de piridoxina e H₂O *qsp* 100mL

Atualmente, 17 espécies e duas subespécies foram identificadas (TABELA 2) e, apesar do gênero ser conhecido pela capacidade de associar-se às plantas e promover a fixação biológica do nitrogênio, a maioria vive em solos e ambientes aquáticos e não são diazotróficas (www.bacterio.net). Além disso,

alguns representantes colonizadores de plantas também foram, ocasionalmente, encontrados em outros habitats, como em escarro de fibrose cística (COENYE, 2002; SPILKER *et al.*, 2008) e hemocultura de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (CHEN *et al.*, 2011; ZIGA *et al.*, 2010).

TABELA 2. Espécies atuais de *Herbaspirillum* spp.

Espécies	Estirpe	Fonte	Referência
<i>H. aquaticum</i>	IEH 4430	Água deionizada	DOBRITSA <i>et al.</i> , 2010
<i>H. aurantiacum</i>	SUEMI08	Solo montanha vulcânica	CARRO <i>et al.</i> , 2012
<i>H. autotrophicum</i>	IAM 14942	Lagos eutrofizados	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. canariense</i>	SUEMI03	Solo montanha vulcânica	CARRO <i>et al.</i> , 2012
<i>H. chlorophenolicum</i>	CPW301	Solo com 4-clorofenol	I.M. <i>et al.</i> , 2004
<i>H. frisingense</i>	GSF30	Raiz, haste e folhas de gramíneas forrageiras	KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001
<i>H. hiltneri</i>	N3	Raiz de trigo	ROTHBALLER <i>et al.</i> 2006
<i>H. huttiense</i>	IAM 14941	Água deionizada	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. huttiense huttiense</i>	IAM 14941	Água deionizada	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. huttiense putei</i>	IAM 15032	Água de poço	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	Nódulos da raiz de feijão	VALVERDE <i>et al.</i> , 2003
<i>H. massiliense</i>	JC206	Fezes humanas	LAGIER <i>et al.</i> , 2014
<i>H. psychrotolerans</i>	PB1	Solo glacial	BAJERSKI <i>et al.</i> , 2013
<i>H. putei</i>	IAM 15032	Água de poço	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. rhizosphaerae</i>	UMS-37 [†]	Rizosfera de alho	JUNG <i>et al.</i> 2007
<i>H. robiniae</i>	HZ10	Raiz (nódulo) de <i>Robinia</i>	FAN <i>et al.</i> , 2018
<i>H. rubrisubalbicans</i>	CFBP 1202	Folhas de cana de açúcar	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
<i>H. seropedicae</i>	Z67	Raiz de arroz	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
<i>H. soli</i>	SUEMI10	Solo montanha vulcânica	CARRO <i>et al.</i> , 2012

As espécies fixadoras de nitrogênio compreendem *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense*. A primeira espécie descoberta foi *H. seropedicae*, isolada das raízes de gramíneas como *Zea mays* (milho), *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Oryza sativa* (arroz) (BALDANI *et al.*, 1986). Posteriormente, essa espécie foi encontrada associada com *Triticum aestivum* (trigo), *Saccharum* sp. (cana de açúcar) (BALDANI *et al.*, 1996), *Ananas comosus* (abacaxizeiro) e *Musa* sp. (bananeira) (CRUZ *et al.* 2001; WEBER *et al.*, 2001). Em 1996, Baldani e colaboradores reclassificaram a bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum* passando a ser chamada de *H. rubrisubalbicans*. Essa espécie coloniza raízes, caule e folhas de gramíneas e, apesar de ser diazotrófica, pode atuar como fitopatógeno causando a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana de açúcar e a doença da estria vermelha em algumas variedades de sorgo (BALDANI *et al.*, 1996; OLIVARES, *et al.*, 1997).

Herbaspirillum frisingense foi isolada de raízes, hastes e folhas de forrageiras pertencentes à família Poaceae como *Miscanthus spp.* (Alemanha), *Spartina pectinata* (Alemanha) e *Pennisetum purpureum* (Brasil) (KIRCHHOF *et al.*, 2001). Essa bactéria promove o crescimento das plantas modulando as vias de sinalização de 17 fitohormônios (STRAUB *et al.*, 2013).

Espécies associadas a plantas, porém, não fixadoras de nitrogênio, também foram descritas. Dentre elas, *H. lusitanum* isolada dos nódulos da raiz de *Phaseolus vulgaris* (feijão) em Portugal (VALVERDE *et al.*, 2003). Inicialmente, essa bactéria foi enquadrada como fixadora de nitrogênio por apresentar características bioquímicas similares aos microorganismos diazotróficos como a formação de película quando cultivada em meio sem nitrogênio. Entretanto, a ausência de genes *nif* responsáveis pela FBN e a incapacidade de reduzir acetileno em meio semi-sólido comprovam que se trata de espécie não fixadora de nitrogênio (WEISS *et al.*, 2012). Outras espécies enquadradas nesse grupo são *H. hiltineri* isolada da superfície esterilizada de raízes de *Triticum aestivum* (trigo) (ROTHBALLER *et al.*, 2006) e *H. rizhosphaerae* isolada da rizosfera de *Allium victorialis* (alho-porró) (JUNG *et al.*, 2007).

Espécies não diazotróficas de “vida livre” foram encontradas em sedimentos de solo e ambientes aquáticos. *H. chlorophenolicum*, bactéria capaz de degradar o 4-clorofenol, foi isolada do solo coletado próximo a um córrego localizado em região industrial na Coreia (IM *et al.*, 2004). Já a espécie *H. autotrophicum* foi isolada de pequenos lagos eutrofizados na Suíça (DING & YOKOTA, 2004). Essa bactéria, reclassificada a partir de *Aquaspirillum autotrophicum* (ARAGNO & SCHELEGEL, 1978), apresenta características peculiares como capacidade de utilizar hidrogênio como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono. *H. huttiense huttiense*, inicialmente classificada como *Pseudomonas huttiense* (LEIFSON, 1962), foi isolada de amostras de água destilada na Nova Zelândia (DING & YOKOTA, 2004), enquanto, *H. huttiense putei* foi encontrada em água de poço no Japão (DING & YOKOTA, 2004).

Embora *Herbaspirillum* não seja conhecido como patógeno humano, em 1996, Baldani e colaboradores isolaram um grupo de bactérias de secreções de feridas, secreções oculares, trato respiratório, urina, suco gástrico e sangue, o

qual foi denominado como “*Herbaspirillum species 3*”. Em estudo de caso *H. seropedicae* foi identificado como agente causador de celulite (inflamação de pele e partes moles) e bacteremia, em adulto portador de hepatite C, sem tratamento prévio com medicamentos imunossupressores (TAN & OEHLER, 2005). Estudo retrospectivo, conduzido por Spilker *et al.* (2008), identificou *Herbaspirillum spp.* em 28 amostras (n=1100) de secreções respiratórias de pacientes portadores de fibrose cística. Esses isolados tiveram o gene 16S RNAr sequenciados e foram agrupados com *H. huttiense subsp. huttiense*, *H. huttiense subsp. putei*, *H. frisingense*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubabicans* (SPILKER *et al.*, 2008). Em 2012, a espécie *H. massiliense* foi isolada, no Senegal, das fezes de paciente saudável (LAGIER *et al.*, 2012). A influência desses microorganismos no desenvolvimento de doenças humanas não é conhecida, porém, foi proposto que essas bactérias podem ser patógenos oportunistas (BERG *et al.*, 2005).

Dentre as espécies supracitadas, as mais estudadas são aquelas capazes de associar-se às plantas de interesse econômico e promover a fixação biológica do nitrogênio (FBN). São elas *H. seropedicae* estirpe SmR1, um mutante espontâneo da estirpe Z78 isolado do sorgo (BALDANI *et al.*, 1996) e sequenciada por Pedrosa *et al.* (2011) e *H. seropedicae* estirpe Z67 isolada do arroz (BALDANI *et al.*, 1986). O uso desses microorganismos como inoculantes biológicos no cultivo de alimentos para o consumo humano (arroz, trigo, milho, cana-de-açúcar, banana, abacaxi) contribui tanto com a redução de custos na agricultura mundial quanto com a diminuição no consumo de recursos naturais (combustíveis fósseis) necessários para a produção de fertilizantes nitrogenados. De acordo com relatórios emitidos pela USDA (U.S. Department of Agriculture), o cultivo de não leguminosas requer cerca de 80 kg de uréia (fonte de nitrogênio) por hectare e por colheita, sendo o custo médio mensal da tonelada de uréia, registrado em maio de 2018, de aproximadamente 220 dólares. Estima-se que a área global para cultivo dessas plantas é de cerca de 700 milhões de hectares.

Em relação ao emprego de *Herbaspirillum spp.* como inoculante biológico, foi demonstrado que *H. seropedicae* fornece pelo menos 15% do nitrogênio utilizado por canavieiras (CANUTO *et al.*, 2003) e arrozais (GUIMARÃES *et al.*, 2003). Outro aspecto interessante, do ponto de vista

tecnológico, é a capacidade de *Herbaspirillum spp* colonizar a superfície e o interior dos tecidos vegetais, o que permite o emprego dessas bactérias como vetores geneticamente modificados para biocontrole de insetos, larvas e nemátodos (MONTEIRO *et al.*, 2012). Nesse contexto, estudos com *Herbaspirillum spp*, principalmente, para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-bactéria são importantes para os avanços no setor agroindustrial.

1.2 INTERAÇÃO PLANTA BACTÉRIA

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* são amplamente conhecidas pela capacidade de associar-se às plantas, especialmente membros da família Poaceae, e promover a FBN (BALDANI *et al.*, 1986; DOBEREINER *et al.*, 1992; LADHA & REDDY, 1995). Tal associação pode ocorrer na superfície (colonização epifítica) e nos espaços internos das plantas (colonização endofítica) (BRENCIC & WINANS, 2005; SHULZ & BOYLE, 2005). A colonização epifítica é o início da interação planta-bactéria, contudo os benefícios são maiores quando os microorganismos colonizam o interior das plantas, tornando-se menos susceptíveis às mudanças ambientais e, portanto, com maior potencial para fornecer nitrogênio para a planta (STOLTZFUS, 1997; REINHOLDHUREK & HUREK, 1998). Além disso, no interior das plantas, há maior disponibilidade de fontes de carbono para o metabolismo bacteriano e, no geral, essa associação não causa danos aos hospedeiros. Ao contrário, além do nitrogênio fixado, essa interação promove o crescimento do vegetal, aumento da produtividade e secreção de fitohormônios e repressão de doenças por indução de mecanismos de resistência (BALDANI *et al.*, 1997; JAMES & OLIVARES, 1998).

Para que o microorganismo seja capaz de colonizar o interior das plantas é necessário que seja capaz de superar interações inibitórias do ambiente (metabólitos antimicrobianos, fitotoxinas, escassez de nutrientes) e os mecanismos de defesa do próprio hospedeiro (barreiras físicas e químicas). O evento “chave” dessa interação está na colonização da rizosfera, processo que envolve percepção da planta pelo microorganismo, quimiotaxia em direção à raiz, aderência e colonização (BAIS *et al.*, 2006).

O modelo de interação mais bem estudado é o “rizóbio-leguminosa” que ocorre, principalmente, entre bactérias do gênero *Rhizobium* e suas plantas hospedeira. A colonização inicia-se pela quimiotaxia da bactéria em direção às raízes, decorrente da liberação de flavonóides na rizosfera, os quais também induzem a expressão de fatores de nodulação (fatores Nod) pela bactéria causando a secreção de lipo-quito-oligossacarídeos. Essas moléculas, por sua vez, interagem com receptores proteicos vegetais e promovem alterações celulares que culminam na formação do pêlo de infecção. Após internalização, os rizóbios são diferenciados em bacteróides, ou seja, organelas exclusivas para fixação de nitrogênio (BROUGHTON *et al.*, 2006).

Modelo semelhante de interação planta-bactéria foi descrito em estudo realizado com estirpes de *H. seropedicae* imuno-marcadas. Assim como descrito na interação “rizóbio-bactéria” o processo se inicia com a quimiotaxia da bactéria em direção às raízes, seguida de colonização epifítica e penetração através de pontos de descontinuidade da epiderme (RONCATO-MACARI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2012).

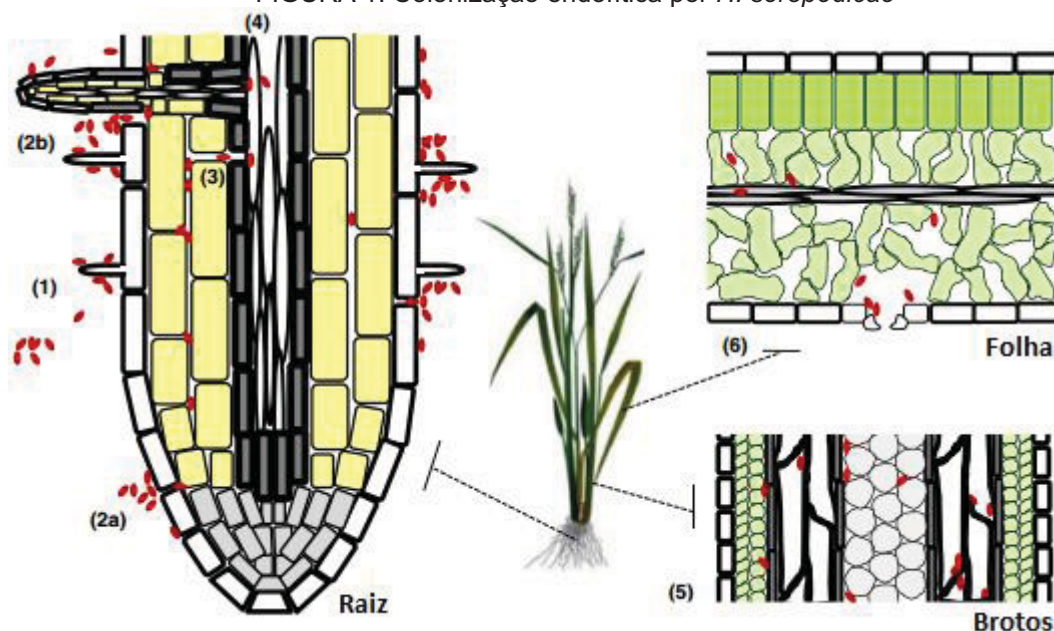
Tanto no modelo de interação “rizóbio-leguminosa” quanto no modelo de associação endofítica por *H. seropedicae*, a comunicação planta-hospedeiro é dependente da produção de enzimas do sistema de secreção do tipo III (T3SS) lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeos (EPS) (BROUGHTON *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2012).

O T3SS está presente em bactérias gram negativas patogênicas, simbióticas, saprófitas e associativas de animais e plantas (HUECK, 1998). A função do T3SS nesses microorganismos é translocar proteínas efetoras, através da membrana plasmática, para o citoplasma da célula eucariótica, alterando o metabolismo celular para benefício da bactéria (interação patogênica) ou de ambos os parceiros (interação simbiótica ou associativa) (MOTA *et al.*, 2005; GRANT *et al.*, 2006). Análises do genoma de *H. seropedicae* SmR1 indicaram a presença de genes homólogos ao T3SS, sugerindo que esse sistema está presente nesta bactéria (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Os LPS são importantes no processo de comunicação planta-bactéria, por formar a interface entre a célula bacteriana e o hospedeiro, sendo responsáveis para a fixação e colonização de tecidos vegetais de diversos microorganismos endofíticos (BALSANELLI *et al.*, 2010). A importância do LPS

de *H. seropedicae* na etapa de colonização da planta é reforçada pelo fato de sua biossíntese ser regulada por sinais emitidos pela planta hospedeira. Análises da expressão do gene *rfbB*, envolvido na biossíntese de LPS, revelou que esta é regulada positivamente pelas moléculas presentes na rizosfera e nos tecidos vegetais, incluindo flavonoides e íons cálcio (BALSANELLI *et al.*, 2010). Além disso, o flavonóide naringenina, naturalmente produzido por vegetais, é responsável por regular genes envolvidos na biossíntese do envelope celular de *H. seropedicae* (TADRA-SFEIR *et al.*, 2011).

Os EPS são responsáveis pelo processo de ancoragem de bactérias, como *Pseudomonas spp.* e *Azospirillum spp.*, às superfícies das plantas (MICHIELS *et al.*, 1991; VANDEVIVERE & KIRCHMAN, 1993). Essa função ainda não foi evidenciada para o EPS de *Herbaspirillum spp.* Estudo realizado por Balsanelli *et al.* (2014) avaliou a participação de EPS produzido por *H. seropedicae* SmR1 na formação de biofilme e na colonização de plantas por meio do mutante EPSEB. Esse mutante, deficiente no gene *espB* que codifica uma glicosiltransferase, apresentou menor produção de EPS e formação de biofilme em lâ de vidro. Em contraste, a capacidade de colonização das plantas pela estirpe EPSEB não foi alterada quando comparada com a estirpe de origem. Esses resultados sugeriram que a formação de EPS e formação de biofilme não estão envolvidos, de forma direta, na colonização de plantas. Entretanto, trabalhos anteriores indicam o envolvimento de EPS durante a colonização de vasos de protoxilema de cana-de-açúcar e sorgo por *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*. No caso de *H. rubrisubalbicans* (fitopatógeno) o EPS pode participar do processo de patogenicidade através da formação de uma película mucilaginosa que envolve o microorganismo e, ao mesmo tempo, serve para bloquear vasos infectados. Já EPS produzidos por *H. seropedicae* não causam danos para as plantas e podem contribuir com a manutenção da adesão bactéria-hospedeiro (JAMES *et al.*, 1997; OLIVARES *et al.* 1997; JAMES & OLIVARES, 1998).

FIGURA 1. Colonização endofítica por *H. seropedicae*

LEGENDA: a associação de *H. seropedicae* (representado pelas manchas vermelhas) com plantas, em condições laboratoriais, começa com a quimiotaxia das bactérias para a raiz da planta e fixação na superfície, preferencialmente, na zona de pelos radiculares (1). Algumas bactérias penetram no interior através de discontinuidades da epiderme presentes nas zonas de alongamento (2a) e rachaduras na raiz lateral (2b). Em seguida, ocorre a ocupação dos espaços intercelulares da raiz, juntamente com a colonização do aerênquima (em arroz) e xilema (3). Algumas bactérias deslocam-se das raízes, através do xilema, para as partes aéreas (4), eventualmente colonizando os ramos (5) e folhas (6), onde são distribuídos nos espaços intercelulares e cavidades subestomais. FONTE: MONTEIRO *et al.* (2012)

1.3 EXOPOLISSACARÍDEOS

Exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de origem biológica (biopolímeros) que participam da formação e estruturação dos biofilmes microbianos (FLEMMING & WINGENDER, 2001). Por definição, EPS estão localizados fora da célula, sendo em grande parte sintetizados e transportados para o exterior da célula (SUTHERLAND, 1994).

Quanto à composição, são formados por unidades de sacarídeos e classificados como homo (HoPSs) ou heteropolissacarídeos (HePSs). HoPSs são compostos por um tipo de monossacarídeo, enquanto HePSs apresentam dois ou mais tipos. Dentre os monossacarídeos mais encontrados em EPS microbianos estão as hexoses D-glucose, D-galactose, D-Manose, L-ramnose e L-fucose. Também estão presentes unidades de N-acetil-hexosaminas como N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galactosamina. Açúcares como o ácido D-glucurônico são relativamente comuns em EPS, entretanto o ácido

D-galacturônico, assim como pentoses, são menos encontrados em polissacarídeos excretados por procariotos (SUTHERLAND, 1994). Geralmente apresentam cadeia linear, porém, podem conter ramificações com substituintes de baixo peso molecular de origem orgânica (acetil, succinil e piruvil) ou inorgânica (sulfato) (SUTHERLAND, 1994).

Existem evidências que a composição de EPS varia, não só entre os gêneros, mas também com mudanças no meio de cultivo (KARR *et al.*, 2000; FRAYSSE *et al.*, 2003). Variações na composição do meio de cultura podem alterar a estrutura do EPS (BECKER *et al.*, 1998). Estudo realizado por KARR *et al.* (2000) avaliou a composição monossacarídica do EPS produzido por *Bradyrhizobium japonicum*, em relação às fontes de carbono utilizadas para crescimento. Quando crescidos em arabinose, gluconato ou manitol produziu o EPS chamado EPS I, com composição de Man:Glc:Gal:GalA na proporção 1:2:1:1. Quando cultivado em malato, produziu um EPS diferente, rico em galactose, designado de EPS II. Vários fatores contribuem para regular a quantidade e características estruturais do EPS, tais como: osmolaridade do meio de cultivo, que regula a abundância de EPS (BREEDVELD *et al.*, 1990); alto teor de nitrogênio, que favorece a produção de formas de EPS com baixo peso molecular (DUSHA *et al.*, 1999) e alteração de fonte de carbono, que como supracitado, pode interferir na produção de EPS (BECKER *et al.*, 1998; KARR *et al.*, 2000). A TABELA 3 ilustra as quantidades, peso molecular e composição monossacarídica de EPS produzidos por diferentes microorganismos e, portanto, cultivados em condições distintas (meio de cultura, temperatura e tempo de incubação).

A função do EPS está intimamente relacionada com sua estrutura e composição, entretanto, seu principal envolvimento está na formação e estruturação de biofilmes, conferindo estabilidade mecânica por interações não covalentes (MAYER *et al.*, 1995) ou interações catiônicas multivalentes entre polissacarídeos (HIGGINS & NOVAK, 1997). O biofilme é formado por agregados de células bacterianas envoltos em uma matriz polissacarídica altamente organizada e hidratada, que auxilia o processo de colonização, sendo sua composição e estrutura influenciada por fatores genéticos (resposta ativa) e ambientais (resposta passiva) (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). A celulose, um polímero de glucose unidos por ligações β 1-4, é um exemplo de EPS

amplamente encontrado na composição de biofilmes de α -proteobactérias como *E. coli* (KARATAN & WATNICK, 2009). Já o polímero de 1-6-N-acetil-D-glucosamina conhecido por PGA ou PNAG é um tipo de EPS presente em diversas espécies, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis*, *Actinobacillus spp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Bordetella spp.* (KARATAN & WATNICK, 2009).

TABELA 3. EPS produzido por microorganismos de espécies diferentes

Microorganismo	EPS (mg/L)	Peso mol. (Da)	Composição Monomérica	Referência
<i>Lactobacillus casei</i>	NA	$>3 \times 10^4$	Rha, Glc, Gal, GlcN, GalN	NOMOTO <i>et al.</i> , 1989
<i>Streptococcus mutans</i>	NA	2.1 a 21.6×10^6	Glc	CERNING, 1990
<i>S. thermophiles</i>	50-350	1×10^6	Gal, Glc, GlcN	DOCO <i>et al.</i> , 1990
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	25-600	1.7×10^6	Gal, Glc, Rha	NAKAJIMA <i>et al.</i> , 1990
<i>Lactobacillus paracasei</i>	60-80	Na	Glc, Gal, Rha	CERNING, 1992
<i>Lactobacillus helveticus</i>	NA	1.6×10^6	Glc, Gal, Rha, GlcN	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1994
<i>Lactobacillus delbreuckii bulgaricus</i>	50-150	NA	Gal, Glc, Rha	BOUZAR <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	360-400	NA	NA	MANCA <i>et al.</i> , 1996
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1000	NA	Glc	V.G.S. <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus licheniformis</i>	235-320	NA	Glc, Gal	LARPIN <i>et al.</i> , 2002

NA: não aplicável; FONTE: MADHURI & VIDAYA, 2013

Dentre outras funções do EPS estão: adesão celular, essencial para a colonização de tecidos vivos, superfícies inertes e ricas em nutrientes, principalmente em ambientes oligotróficos (baixa quantidade de nutrientes) como, por exemplo, sedimentos oceânicos; reconhecimento célula-célula, importante para estabelecer relações simbióticas com plantas ou animais ou, ainda, iniciação de processos patogênicos; barreira protetora, conferindo resistência específica e não específica para o hospedeiro (ativação do sistema complemento, fagocitose, produção de anticorpos, geração de radicais livres), resistência contra biocidas (desinfetantes e antibióticos) e proteção da nitrogenase de cianobactérias contra efeitos nocivos do oxigênio; retenção de água, impede ressecamento das células em ambientes com pouca disponibilidade de água; adsorção de compostos orgânicos, acúmulo de

nutrientes e, em alguns casos, xenobióticos (desintoxicação); adsorção de compostos inorgânicos para formação de gel, acúmulo de íons metálicos tóxicos (desintoxicação); atividade enzimática, digestão de macromoléculas exógenas para obtenção de nutrientes, liberação de bioflocos por degradação de partes do biofilme; interação entre polissacarídeos e enzimas, retenção e estabilização (SUTHERLAND, 1994).

Em relação ao EPS produzido por *Herbaspirillum spp.*, conforme mencionado anteriormente, acredita-se que pode ter papel no processo de interação planta-bactéria, possivelmente, participando de etapas de adesão e comunicação celular. Até o presente momento, não há estudos acerca da composição de EPS produzidos por *Herbaspirillum spp.* Desse modo, a caracterização estrutural desses biopolímeros é fundamental para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de EPS por estirpes de *Herbaspirillum spp.* isoladas do ambiente (diazotróficas e não diazotróficas) e de humanos (isolados clínicos) e caracterizar química e estruturalmente estas moléculas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as estirpes de *Herbaspirillum* com maior produção de EPS em meio de líquido;
- Avaliar se há diferença significativa na produção de EPS entre espécies diazotróficas, não diazotróficas e isolados clínicos;
- Comparar as características estruturais encontradas nos EPS das diferentes espécies/estirpes em relação ao grupo ecológico das quais pertencem (diazotróficas, não diazotróficas e isolados clínicos).

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. utilizadas neste trabalho são provenientes da coleção de culturas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (TABELA 4):

TABELA 4. Espécies e estirpes de *Herbaspirillum* spp. utilizadas.

Espécie	Estirpe	Referência
DIAZOTRÓFICAS		
<i>H. frisingense</i>	GSF30	KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001
	AB7	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BA10, BA11, BA12, BA14, BA149, BA15, BA16	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
	HCC103	EMBRAPA
	M1, M4	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
	M2	RAMOS <i>et al.</i> , 2003
<i>H. seropedicae</i>	X8	CRUZ <i>et al.</i> , 2001
	Z67	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
	BA13	WEBER <i>et al.</i> , 2001
<i>H. sp.</i>	BA143, ZA45	EMBRAPA
NÃO DIAZOTRÓFICAS		
<i>H. autotrophicum</i>	DSM732	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. chlorophenolicum</i>	17795	IM <i>et al.</i> , 2004
<i>H. hiltineri</i>	N3	ROTHBALLER <i>et al.</i> , 2006
<i>H. huttienseputei</i>	IAM15032	DING & YOKOTA, 2004
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	VALVERDE <i>et al.</i> , 2003
<i>H. rizosphaerae</i>	21885	JUNG <i>et al.</i> , 2007
ISOLADOS CLÍNICOS		
<i>H. species 3</i>	AU3926	BALDANI <i>et al.</i> , 1986
<i>H. frisingense</i>	AU14559	SPIPKER <i>et al.</i> , 2008
<i>H. seropedicae</i>	AU14040	SPIPKER <i>et al.</i> , 2008

3.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado foi o NFb (PEDROSA & YATES, 1984) composto por: MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), NaCl (0,1 g/L), CaCl₂ (20 mg/L), FeSO₄.7H₂O (20 mg/L), biotina (100 µg/L), Na₂MoO₄.2H₂O (2,0 mg/L), MnSO₄.H₂O (2,4 mg/L), H₃BO₃ (2,8 mg/L), CuSO₄.5H₂O (8,0 mg/L), ZnSO₄.7H₂O

(240 µg/L), K₂HPO₄ (17,8 g/L), KH₂PO₄ (159,5 g/L). Como fonte de carbono foi utilizado o ácido málico (5,0 g/L) e como fonte de nitrogênio o cloreto de amônio NH₄Cl (20 mM). O pH foi ajustado para 6,5 e, na sequência, o meio foi esterilizado em autoclave, sendo os sais de fosfatos e de cloreto de amônio esterilizados separadamente e adicionados ao restante do meio antes da inoculação do microrganismo. Para cultivos em meio sólido, quando necessário para fins de repique ou estoque, foi adicionado 25 g/L de ágar ao meio.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O cultivo em meio NFb malato líquido foi realizado em shaker rotatório (120 rpm) à 30 °C (± 1 °C) por um período de 24 horas, em frascos de 40 mL e em triplicada, para a análise de produção de EPS, ou por 48 horas, em erlemmeyers de 2 L nos cultivos de grande escala para obtenção de EPS. As condições próprias de cada cultivo são descritas mais adiante. Para fins de padronização da taxa de aeração, em todos os casos o volume de meio de cultura foi de aproximadamente 25% o volume total do frasco.

3.4 ANÁLISE MOLECULAR

A confirmação do gênero *Herbaspirillum* foi realizada por meio da amplificação e sequenciamento do gene 16S RNAr, seguindo o método de terminação de cadeia estabelecido por Sanger *et al.* (1977). O material genético foi obtido por extração direta das colônias em meio sólido (método A) ou purificação do DNA das células crescidas em meio líquido (método B). Após extração, o material genético foi amplificado por reação da polimerase em cadeia (PCR) e submetido a eletroforese. Na sequência os produtos de PCR foram purificados e analisados em sequenciador automático ABI Prism 377.

3.4.1 Extração direta de DNA das colônias (Método A)

O material genético para análise molecular foi obtido por extração direta das colônias crescidas em meio NFb malato sólido a 30 °C por 24 horas. Após incubação, três colônias isoladas foram transferidas para um tubo de

microcentrífuga e suspendidas com 50 µL de água purificada. Essa suspensão foi aquecida a 95 °C por 5 minutos e centrifugada à 13.400 rpm por 2 minutos, sendo o sobrenadante que continha o DNA utilizado para reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.4.2 Purificação de DNA do cultivo em meio líquido (Método B)

O material genético para análise molecular foi obtido (em caso de falha do método A) após cultivo dos microorganismos em meio NFb malato líquido a 30 °C por 24 horas. Após incubação, 1,5 mL de inóculo foi centrifugado à 13.400 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (células) ressuspendido em 500 µL de solução de GET (Glucose, Tris, EDTA). Essa suspensão foi incubada com 2 µL de lisozima (100 µL/mL) a 30 °C durante uma hora, seguida da adição de 50 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao lisado foi adicionado 6 µL de pronase (200 µg/mL), o qual foi mantido a 37 °C por 24 horas. A desproteíntização foi realizada com 250 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e 250 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA presente na fase aquosa foi precipitado com adição de 3 volumes de etanol 96% e mantido a -20 °C por 30 minutos. Após centrifugação (13.400 rpm por 2 minutos), o etanol foi descartado e o precipitado lavado com 1,0 mL de etanol 70% e, na sequência, seco em bomba de vácuo e dissolvido com 100 µL de água purificada para ser utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Y1(5'–TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC–3') e Y3(5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT–3'). As reações foram realizadas em um sistema contendo: 2,5 µL de solução tampão da Taq DNA polimerase 1x (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40), 2,5 µL MgCl₂ 1,5 mM, 2 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 µL dNTP 0,2 mM, 0,1 µL Taq DNA polimerase, 1 µL do DNA molde e água MiliQ *q.s.p.* 25 µL. As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), utilizando

as seguintes condições: 1 ciclo de 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos, seguidos de 991 ciclo de 72 °C por 7 minutos.

3.4.4 Eletroforese em Gel de Agarose

O perfil eletroforético do DNA amplificado foi obtido com as amostras diluídas em Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025) e aplicadas em gel de agarose (1%). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) a 80 V por aproximadamente 45 minutos. O marcador molecular utilizado foi o Ladder de 1500 pb. O controle negativo foi composto pelos reativos utilizados na PCR, porém, sem o DNA molde. Após eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídeo (EtBr) a 0,5 µg/mL e o complexo DNA-EtBr observado em luz ultravioleta e fotodocumentado utilizando o sistema UVP Imaging System.

3.4.5 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram tratados com as enzimas Exonuclease I e SAP (ShrimpAlkalinePhosphatase) a fim de eliminar os oligonucleotídeos iniciadores e dNTPs presentes na mistura de reação. Os tubos contendo as misturas foram incubados, em termociclador, a 37 °C por 40 minutos, seguidos de 15 minutos a 85°C. Os produtos purificados foram utilizados para a reação de sequenciamento.

3.4.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos fluorescentes (SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977) em sequenciador automático ABI Prism 377 (AppliedBiosystems, EUA). Para a incorporação dos dideoxinucleotídeos foi feito um sistema de reação contendo: 3,0 µL Tampão Save Money®, 1,0 µL Big DyeTerminator®, 0,5 µL oligonucleotídeo iniciador Y3, 200 a 400 ng DNA (obtido após purificação

produtos de PCR) e de água milli-Q *qsp* 10 µL. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador, utilizando as seguintes condições: 1 ciclo de 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de 96 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos. O produto da reação foi precipitado adicionando-se 10 µL de água milli-Q, 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 66 µL de etanol 96%, seguido de repouso por 15 minutos a -20 °C. A mistura foi centrifugada a 13.400 rpm por 30 minutos, desprezando o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70% e centrifugado a 13.400 rpm por 15 minutos. Após secagem a vácuo, o precipitado resultante foi ressuscitado em 10 µL de formamida. A leitura das sequências foi realizada em sequenciador automático ABI AppliedBiosystems 3500 XL e analisada com auxílio do NucleotideBlast®.

3.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS

A produção de EPS foi avaliada com base na proporção entre carboidratos (açúcares totais) e proteínas produzidos pelas diferentes estirpes de *Herbaspirillum*. Os microorganismos foram cultivados em meio NFb malato líquido e incubados em shaker rotatório (120 rpm, 30 °C) por 24 h, sendo todos submetidos a duas etapas de cultivo: pré-inóculo e inóculo. O pré-inóculo foi obtido por meio da transferência de uma colônia isolada (proveniente da cultura estoque) para frasco de 10 mL contendo 3 mL de NFb malato. Após incubação, volume de pré-inóculo equivalente a D.O.₆₀₀ 0,05 foi transferido para frascos de 40 mL de capacidade contendo 10 mL de NFb malato e, novamente, incubados (120 rpm, 30 °C, 24 h) para posterior extração e determinação de açúcares totais e proteínas. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

3.5.1 Extração dos EPS

Para a extração do EPS após o cultivo, o meio foi centrifugado (4000 rpm, 15 min, 4 °C) e 9 mL do sobrenadante livre de células foi submetido a tratamento com 27 mL de etanol (3 v/v) “*overnigth*” a -20 °C. O precipitado etanólico contendo o EPS foi removido por centrifugação (5000 rpm, 20 min, 4 °C), solubilizado em 1,0 mL de água destilada, congelado e liofilizado. Em

seguida, foi ressuspenso em 1,0 mL de água destilada, aquecido e submetido à sonicação até completa dissolução para determinação de açúcares totais.

3.5.2 Determinação de açúcares totais

A quantificação de açúcares totais foi realizada com base no método descrito por Dubois *et al.* (1956). Uma alíquota de 0,5 mL da solução contendo os EPS foi transferida para um tubo de ensaio onde foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado (94-96%). Soluções padrão de glucose (0,5 mL), em concentrações de 5 a 200 µg/mL foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após a reação, a absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm.

3.5.3 Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi realizada conforme Bradford (1976). Para tanto, as células contidas em uma alíquota de 100 µL de inóculo (obtido conforme descrito em “avaliação da produção de EPS”) foram tratadas com 100 µL de NaOH 0,2 M e incubadas a 37 °C por 2 horas. Na sequência, 30 µL dessa solução foram transferidos para uma placa de 96 poços onde foram adicionados 170 µL do reativo Coomassie Blue G-250. As soluções de calibração foram preparadas com albumina bovina sérica em água destilada (3 a 30 µg/mL). As medidas das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm.

3.6 CULTIVO EM GRANDE ESCALA

As estirpes com maior relação CHO-Proteínas foram selecionadas para cultivo em grande escala. Os microorganismos foram cultivados em meio NFb malato líquido e incubados em shaker rotatório (120 rpm, 30 °C) por 48 h. Para obter inóculos frescos, as estirpes foram previamente cultivadas em duas etapas: pré-inóculo e inóculo. O pré-inóculo foi obtido por meio da transferência de uma colônia isolada (proveniente da cultura estoque) para frasco de 10 mL contendo 3,0 mL de NFb malato. Após incubação, 500 µL dessa suspensão

foram transferidos para frascos erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 60 mL de NFb malato e, novamente, incubados para obtenção do inóculo fresco. Por fim, volume de inóculo fresco equivalente a D.O.₆₀₀ 0,05 foi transferido para erlenmeyers de 2 L de capacidade contendo 500 mL de meio NFb malato e incubados em shaker rotatório para posterior extração de EPS.

3.6.1 Extração dos EPS do cultivo em grande escala

Para a extração de EPS o meio de cultura, após cultivo, foi centrifugado (4000 rpm, 15 min, 4 °C) e o excesso de água do sobrenadante, desprovido de células, foi removido por rotaevaporação. O material “concentrado” foi submetido ao tratamento com excesso de etanol (3 v/v) “overnigth” a -20 °C e o precipitado (EPS) removido por centrifugação (5000 rpm, 20 min, 4 °C). Na sequência o EPS foi submetido à diálise em membrana de 6 a 8 kDa com água corrente por aproximadamente 48 horas. O material resultante foi congelado, liofilizado e pesado para posterior análise e caracterização química.

3.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EPS

3.7.1 Determinação da Composição Monossacarídica dos EPS

Para obter as unidades monossacarídicas foi realizado a hidrólise ácida total de 2,0 mg de cada amostra de EPS liofilizado, utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 1 M, durante 8 horas a 100 °C. Após a hidrólise o TFA foi removido por evaporação em temperatura máxima de 45 °C (WHITON *et al.*, 1985). O material foi solubilizado em 200 µL de água destilada e reduzido com boridreto de sódio (NaBH₄) por 12 horas (WOLFROM & THOMPSON, 1963a). O excesso de NaBH₄ foi removido após neutralização com ácido acético e por meio de sucessivas lavagens com metanol (CH₃OH) seguidas de evaporação (40 a 45 °C) sob fluxo de ar antes de ser liofilizado. Ao material liofilizado foi adicionado 500 µL de anidrido acético:piridina (1:1 v/v) e a amostra foi mantida à 100 °C por 1 h (WOLFROM & THOMPSON, 1963b). Os derivados alditol acetato produzidos foram extraídos com clorofórmio (CHCl₃) e o excesso de piridina removido com repetidas lavagens com sulfato

de cobre 5% (CuSO_4). O extrato clorofórmico contendo os derivados alditois acetatos (AA) foi evaporado até *secura* para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas (GC-MS)

3.7.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para verificar a eficiência da hidrólise e determinar qualitativamente a composição monossacarídica, antes das etapas de redução e acetilação, foi realizada uma cromatografia em camada delgada com placas de alumínio revestidas de sílica (SiO_2). Como fase móvel foi utilizado acetato de etila: n-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v) (HOUGH & JONES, 1962). Soluções padrão de diferentes monossacarídeos (0,5 mg/mL) foram utilizadas para comparação. Após a secagem, a placa foi submergida em solução etanólica de orcinol (2,5 g/L) contendo 5% de H_2SO_4 e aquecida a 100 °C por 5 minutos para revelação das bandas.

3.7.3 Determinação das ligações glicosídicas

A determinação das ligações glicosídicas presentes nos EPS foi realizada a partir da formação dos derivados alditois acetatos parcialmente metilados (PMAA). Aproximadamente 9,0 mg de cada amostra contendo os EPS liofilizados foi solubilizado em DMSO, e NaOH pulverizado anidro foi adicionado em excesso. Posteriormente, 0,5 mL de iodeto de metila (CH_3I) foram adicionados e a mistura foi deixada sob agitação em vortex por aproximadamente 1 h (CIUCANU & KEREK, 1984). O material permaneceu em repouso “*overnight*” à temperatura ambiente antes de ser diluído em 3 volumes de água e neutralizado com gotas de ácido acético glacial (em banho de gelo). Para remoção de impurezas, o material foi dialisado em água corrente com membrana de 6 a 8 kDa por 24 horas, congelado, liofilizado e, novamente, metilado. Os EPS metilados foram extraídos da mistura com clorofórmio (CHCl_3). Após a *secura* (35 °C) do material, os EPS foram pré-hidrolisados com 0,5 mL de H_2SO_4 72% sob agitação (a cada 15 minutos) por uma hora em banho de gelo, quando foram adicionados 4,0 mL de água (concentração final de H_2SO_4 igual a 8%), e o material mantido à 100 °C por 16h (SEAMAN *et al.*, 1963). A

neutralização do ácido sulfúrico foi realizada pela adição de carbonato de bário (BaCO_3) e centrifugação, antes do material ser levado à secura. Após liofilização, o material foi submetido ao processo de redução e acetilação conforme descrito anteriormente, exceto pelo passo de redução que foi realizado com NaBD_4 (boridreto de sódio deuterado). Os derivados metilados foram analisados por GC-MS segundo o tempo de retenção e perfil de fragmentação por impacto de elétrons (SASSAKI *et al.*, 2005).

3.7.4 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

Após derivatização, tanto para formação dos alditois acetatos (AA) quanto para a formação dos metilados (PMAA), as amostras foram dissolvidas em acetona e 1,0 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. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso Varian (CP3800) com coluna capilar VF-5, acoplado em série a um espectrômetro de massa *iontrap* Saturno (4000) com varredura de massa entre 45 e 450 m/z , energia de geração de elétrons de 70 meV, e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a rampa de temperatura de corrida de 100 °C até 280 °C ($10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) 280 °C, permanecendo constante até o final da análise.

3.7.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. Cada amostra (40 mg) foi liofilizada e solubilizada em 500 μL de D_2O 99,8% e colocada em tubos de RMN (5 mm de diâmetro interno). As análises foram realizadas à 50 °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 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) 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* Topspin, versão 3.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de biologia molecular e avaliação da produção de EPS foram executadas de forma concomitante. A análise molecular foi realizada com 16 estirpes inicialmente disponibilizadas para o estudo (TABELA 5). Posteriormente, 11 estirpes foram incluídas (TABELA 7). Apenas as estirpes com maior relação carboidrato:proteína tiveram sua identidade confirmada por sequenciamento do gene 16S RNAr e, dessa forma, seguiram para as análises de caracterização estrutural de EPS.

4.1 ANÁLISE MOLECULAR

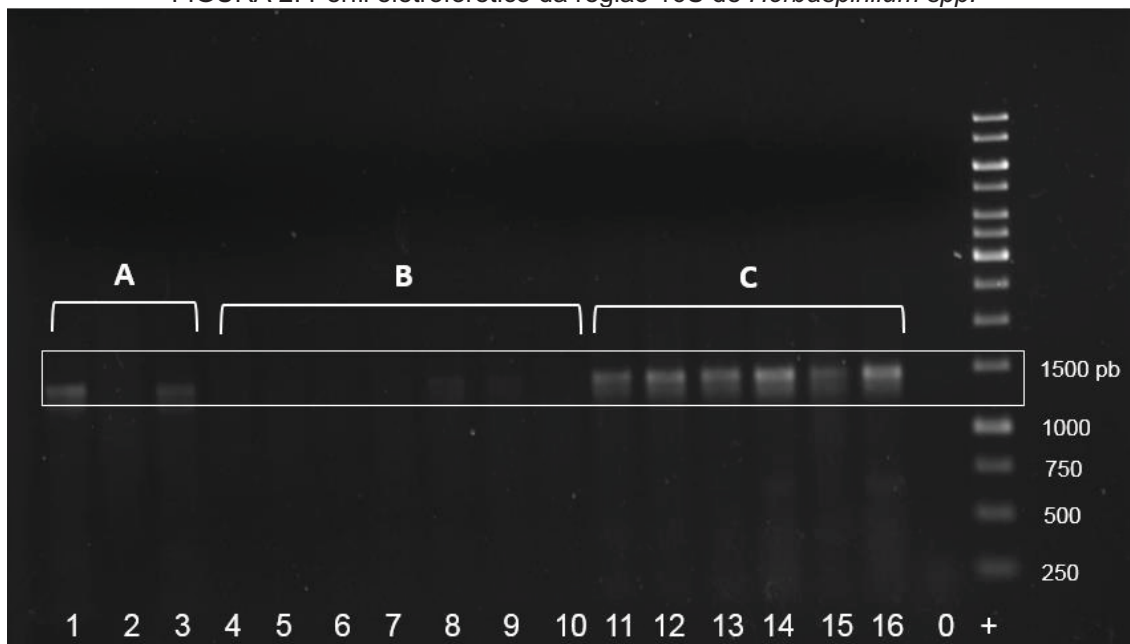
O 16S RNAr é um componente da subunidade 30S dos ribossomos de procariotos. O gene que codifica o RNAr tem regiões de consenso que estão presentes em todas as bactérias e regiões de variabilidade que são específicas de grupos e espécies (FURRIE, 2006). Dessa forma, a amplificação e sequenciamento do 16S RNAr foi utilizada para confirmar a identidade, ou seja, gênero e espécie do microorganismo.

Inicialmente, 16 estirpes foram incluídas, sendo 3 isolados clínicos, 7 diazotróficas e 6 não fixadoras de nitrogênio (TABELA 5):

TABELA 5. Estirpes de *Herbaspirillum spp.* inicialmente incluídas no estudo

Isolados clínicos	Diazotróficas	Não diazotróficas
<i>H. species 3</i> AU3926	<i>H. frisingense</i> GSF30	<i>H. autotrophicum</i> DSM732
<i>H. frisingense</i> AU14559	<i>H. rubrisubalbicans</i> M1	<i>H. chlorophenolicum</i> 17795
<i>H. seropedicae</i> AU14040	<i>H. rubrisubalbicans</i> M4	<i>H. hiltineri</i> N3
	<i>H. seropedicae</i> M2	<i>H. hutiense putei</i> IAM15032
	<i>H. seropedicae</i> Z67	<i>H. lusitanum</i> P6-12
	<i>Herbaspirillum sp.</i> BA13	<i>H. rizosphaerae</i> 21885
	<i>Herbaspirillum sp.</i> ZA45	

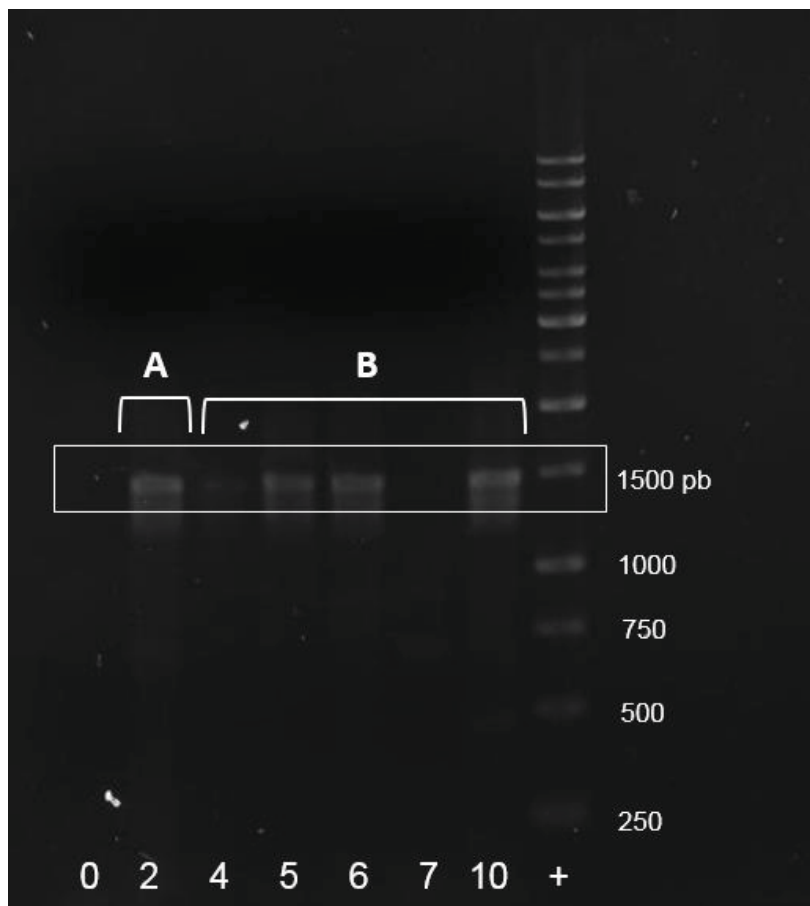
O material genético para PCR foi extraído das colônias (método A) crescidas em meio NFb malato sólido (cultura estoque). A eficiência da reação foi confirmada por eletroforese, e as bandas observadas após incubação com solução de brometo de etídeo, estão ilustradas na FIGURA 2.

FIGURA 2. Perfil eletroforético da região 16S de *Herbaspirillum spp.*

LEGENDA: [A] Isolados clínicos (1 a 3), [B] Diazotróficos (4 a 10), [C] Não diazotróficos (11 a 16). [1] *H. species 3* AU3926, [2] *H. frisingense* AU14559, [3] *H. seropedicae* AU14040, [4] *H. frisingense* GSF30, [5] *H. rubrisubalbicans* M1, [6] *H. rubrisubalbicans* M4, [7] *H. seropedicae* M2, [8] *H. seropedicae* Z67, [9] *Herbaspirillum sp.* BA13, [10] *Herbaspirillum sp.* ZA45, [11] *H. autotrophicum* DSM732, [12] *H. chlorophenolicum* 17795, [13] *H. hiltineri* N3, [14] *H. hutense putei* IAM15032, [15] *H. lusitanum* P6-12, [16] *H. rizosphaerae* 21885. [0] Controle negativo: tubo contendo água e reagentes. [+] Controle positivo: ladder de 1500 pb

Conforme esperado, o alinhamento das bandas ocorreu na região de 1500 pb de base indicando que a região do DNA correspondente ao 16S RNAr foi amplificado. As amostras 1 e 3 (isolados clínicos), 8 e 9 (diazotróficas) e 11, 12, 13, 14, 15 e 16 (não diazotróficas) foram selecionadas para a etapa de sequenciamento. Não foram visualizadas bandas para as amostras 2, 4, 5, 6, 7 e 10, indicando possível falha no processo de amplificação por quantidade insuficiente de DNA.

Para garantir maior disponibilidade de material genético, uma colônia isolada de cada amostra não amplificada foi inoculada em meio NFb malato líquido e após incubação (120 rpm, 30 °C, 24 horas) 1,5 mL do inóculo foi utilizado para extração do DNA genômico (método B). Após PCR e eletroforese, foi observado o perfil ilustrado na FIGURA 3.

FIGURA 3. Perfil eletroforético da região 16S de *Herbaspirillum spp.*

[A] Isolado clínico (2), [B] Diazotróficos (4, 5, 6, 7 e 10) [2] *H. frisingense* AU14559, [4] *H. frisingense* GSF30, [5] *H. rubrisubalbicans* M1, [6] *H. rubrisubalbicans* M4, [7] *H. seropedicae* M2 e [10] *Herbaspirillum sp.* ZA45. [0] Controle negativo: tubo contendo água e reagentes. [+] Controle positivo: ladder de 1500 pb

Apenas a amostra 7 (*H. seropedicae* M2) não foi amplificada. As demais, inclusive amostra 4 (*H. frisingense* GSF30) com amplificação discreta, foram selecionadas para sequenciamento.

Após a purificação dos produtos de PCR foi realizada a leitura das sequências amplificadas em sequenciador automático (ABI Applied Biosystems 3500 XL). As sequências geradas foram analisadas com auxílio do programa Nucleotide Blast® e as informações geradas seguem na TABELA 6.

TABELA 6. Análise das sequências do 16S rRNA pelo Nucleotide Blast

Microorganismo	N	Query cover	E _{value}	Max Ident (%)
<i>H. species</i> 3 AU3926	948	91	0	96
<i>H. frisingense</i> AU14559	977	96	0	97
<i>H. seropedicae</i> AU14040	953	90	0	81
<i>H. frisingense</i> GSF30	951	97	0	98
<i>H. rubrisubalbicans</i> M1	986	90	0	82
<i>H. rubrisubalbicans</i> M4	0	0	0	0
<i>H. seropedicae</i> Z67	975	80	0	87
<i>H. sp.</i> BA13	0	0	0	0
<i>H. sp.</i> ZA45	0	0	0	0
<i>H. autotrophicum</i> DSM732	987	87	0	82
<i>H. chlorophenolicum</i> 17795	914	88	0	92
<i>H. hiltineri</i> N3	964	91	0	94
<i>H. huttiense putei</i> IAM15032	932	95	0	96
<i>H. lusitanum</i> P6-12	953	86	0	97
<i>H. rizosphaerae</i> 21885	950	86	0	96

Legenda: [N] número de nucleotídeos submetidos à análise; Query cover = porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento; E-value = parâmetro de confiança; Max identity = identidade máxima obtida

Dentre as 15 estirpes analisadas pelo programa, três não foram detectadas pelo sequenciador automático e, portanto, não foram identificadas. São elas *H. rubrisubalbicans* M4, *H. sp.* BA13 e *H. sp.* ZA45.

Outras 11 estirpes diazotróficas (TABELA 6) foram incluídas no estudo já na fase de avaliação da produção de EPS e não tiveram sua identidade confirmada por apresentar baixa relação carboidrato: proteína (TABELA 7)

TABELA 7. Estirpes incluídas na fase de avaliação da produção de EPS

Espécie	Estirpe	Referência
<i>H. rubrisubalbicans</i>	AB7	CRUZ et al., 2001
	BA10, BA11, BA12, BA14, BA149, BA15, BA16	CRUZ et al., 2001
	HCC103	EMBRAPA
	X8	CRUZ et al., 2001
	BA143	EMBRAPA

4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EPS

Os resultados da triagem realizada, em triplicata, para identificar as estirpes de *Herbaspirillum* com maior produção de EPS estão descritos na TABELA 8. As estirpes foram separadas, de acordo com os resultados obtidos a partir da dosagem de açúcares totais presentes no precipitado etanólico do meio de cultura e da dosagem de proteínas totais após 24h de cultivo. Para minimizar erros de interpretação, e verificar a capacidade de produção de EPS em relação

ao crescimento bacteriano, foi determinada a relação carboidrato:proteína (CHO:Proteína), a qual também foi considerada nesta classificação.

TABELA 8. Avaliação da produção de EPS por *Herbaspirillum* spp. de acordo com a relação carboidrato-proteínas após cultivo em meio líquido.

Espécie	Estirpe	D.O. ⁶⁰⁰ final	Açúcares totais ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$) ^b	CHO/ Proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) ^c
<i>H. hutiense putei</i>	IAM15032	0,91 \pm 0,01	53,23 \pm 0,05	0,50 \pm 0,02	105,61
<i>H. rubrisubalbicans</i>	M4	1,00 \pm 0,05	32,13 \pm 0,09	0,33 \pm 0,04	98,13
<i>H. lusitanum</i>	P612	0,98 \pm 0,01	29,76 \pm 0,07	0,45 \pm 0,00	65,95
<i>H. hiltineri</i>	N3	0,86 \pm 0,02	18,06 \pm 0,02	0,37 \pm 0,03	49,16
<i>H. frisingense</i>	GSF30	1,17 \pm 0,03	17,83 \pm 0,02	0,48 \pm 0,04	37,28
<i>H. seropedicae</i>	AU14040	1,11 \pm 0,06	18,02 \pm 0,02	0,51 \pm 0,01	35,55
<i>H. frisingense</i>	AU14559	0,86 \pm 0,20	18,77 \pm 0,01	0,60 \pm 0,02	31,71
<i>H. seropedicae</i>	Z67	1,06 \pm 0,04	13,83 \pm 0,08	0,47 \pm 0,03	29,70
<i>H. sp.</i>	BA143	1,10 \pm 0,01	12,03 \pm 0,26	0,45 \pm 0,05	26,95
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BA16	1,10 \pm 0,02	11,69 \pm 0,03	0,45 \pm 0,04	26,23
<i>H. seropedicae</i>	M2	1,00 \pm 0,02	11,40 \pm 0,11	0,44 \pm 0,03	25,64
<i>H. species 3</i>	AU3926	1,00 \pm 0,01	11,98 \pm 0,02	0,58 \pm 0,03	20,75
<i>H. rizosphaerae</i>	21885	0,55 \pm 0,01	9,41 \pm 0,02	0,47 \pm 0,00	20,14
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BA15	0,96 \pm 0,04	9,49 \pm 0,07	0,48 \pm 0,04	19,83
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BA149	1,01 \pm 0,04	9,91 \pm 0,05	0,51 \pm 0,03	19,35
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BA10	0,96 \pm 0,01	8,97 \pm 0,06	0,48 \pm 0,02	18,49
<i>H. rubrisubalbicans</i>	M1	0,96 \pm 0,00	7,89 \pm 0,02	0,53 \pm 0,02	14,80
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BA11	0,90 \pm 0,02	7,54 \pm 0,05	0,51 \pm 0,01	14,75
<i>H. sp.</i>	ZA45	0,86 \pm 0,05	5,00 \pm 0,01	0,38 \pm 0,04	12,97
<i>H. autotrophicum</i>	DSM732	0,86 \pm 0,06	5,39 \pm 0,02	0,45 \pm 0,04	12,10
<i>H. rubrisubalbicans</i>	HCC103	0,93 \pm 0,07	6,05 \pm 0,06	0,50 \pm 0,02	12,09
<i>H. like (Musa spp.)</i>	BA13	0,96 \pm 0,02	5,62 \pm 0,05	0,48 \pm 0,03	11,72
<i>H. seropedicae</i>	X8	0,59 \pm 0,09	3,41 \pm 0,03	0,32 \pm 0,04	10,57
<i>H. rubrisubalbicans</i>	AB7	0,68 \pm 0,08	3,32 \pm 0,02	0,36 \pm 0,00	9,31

^a Açúcares totais determinados após precipitação etanólica do meio de cultura desprovido de células. A curva de calibração realizada com soluções de glucose nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 \geq 0,9997$)

^b Proteínas totais determinadas a partir do meio de cultura após crescimento por 24 h. A curva de calibração realizada com soluções de BSA (Albumina Sérica Bovina) nas concentrações de 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 \geq 0,9900$)

^c Relação entre carboidratos totais determinados após precipitação etanólica (3 v/v) do meio de cultura e proteínas totais do meio de cultura após 24 h de crescimento

As estirpes que apresentaram melhor resultado de produção de EPS, ou seja, valores de açúcares totais maiores do que 15 $\mu\text{g/mL}$ e relação CHO:Proteína maior ou igual a 30 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$, foram: *H. hutiense putei* IAM15032, *H. lusitanum* P612 e *H. hiltineri* N3, não fixadoras de nitrogênio;

H. rubrisubalbicans M4 e *H. frisingense* GSF30, ambas diazótrofos encontradas em associação endofítica com gramíneas; *H. seropedicae* AU14040 e *H. rubrisubalbicans* AU14559, ambas isolados clínicos de pacientes com fibrose cística. Destacam-se entre elas as estirpes *H. hutiense putei* IAM15032 e *H. rubrisubalbicans* M4, que apresentaram a maior quantidade de açúcares totais observados no precipitado etanólico do meio de cultura, bem como uma alta relação CHO:Proteína, respectivamente 105,6 e 98,1 µg/µg.

A maioria das estirpes analisadas, (17 estirpes), apresentaram baixa produção de EPS (açúcares totais <15 µg/mL) e também baixa relação CHO:Proteína (<30 µg/µg). Observa-se que o crescimento celular destas estirpes não se diferencia do observado dentre as mais produtoras, uma vez que os valores de D.O.₆₀₀ e proteínas totais são similares, ou até maiores em alguns casos. Na quantificação de açúcares totais no meio de cultura, entretanto, este grupo apresentou valores mais baixos, afetando, portanto o valor da relação CHO/Proteína. Destaca-se ainda a estirpe AB7 de *H. rubrisubalbicans*, sendo a que apresentou menor relação CHO:Proteína (9,3 µg/µg).

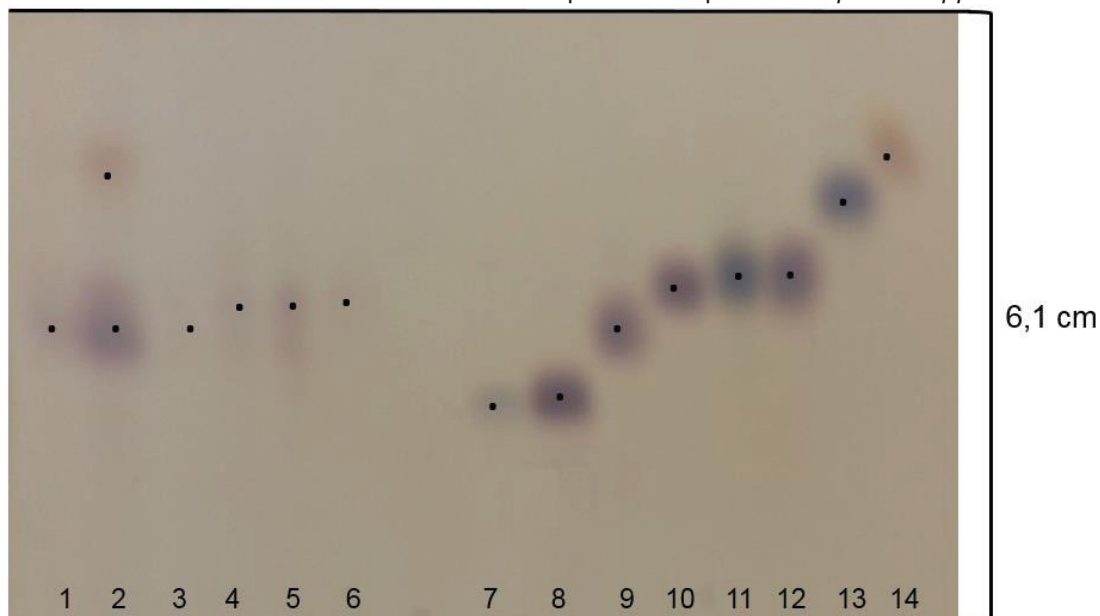
Com base nesses resultados e na análise molecular, 6 estirpes foram elegíveis para prosseguir com o cultivo em grande escala e subsequente análise estrutural de EPS: *H. hutiense putei* IAM15032, *H. lusitanum* P612, *H. hiltineri* N3, *H. frisingense* GSF30, *H. seropedicae* AU14040 e *H. frisingense* AU14559. Embora *H. rubrisubalbicans* M4 tenha apresentado a segunda maior relação CHO:Proteína (98,1 µg/µg), esta estirpe não foi selecionada visto que sua identidade não foi confirmada na etapa de análise molecular.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Os EPS obtidos após cultivo em grande escala foram submetidos a hidrólise total (TFA, 1 M, 8 h, 100°C) para determinação qualitativa da composição monossacarídica por cromatografia em camada delgada (CCD). O cromatograma observado após eluição com acetato de etila : n-propanol : ácido acético : água (4:2:2:1 v/v/v/v) e revelação em solução etanólica de orcinol (2,5 g/L) está ilustrado na FIGURA 4. Os carboidratos utilizados como padrões foram ácido glucurônico (GlcA), maltose (Mal), galactose (Gal), glucose (Glc),

arabinose (Ara), manose (Man), xilose (Xyl) e ramnose (Rha). A comparação das amostras com os padrões foi realizada através dos fatores de retenção (Rfs).

FIGURA 4. CCD de EPS hidrolizado produzidos por *Herbaspirillum* spp.



LEGENDA: Amostras (1 a 6): [1] *H. frisingense* GSF30, [2] *H. hutiense putei* IAM15032, [3] *H. lusitanum* P612, [4] *H. hiltineri* N3, [5] *H. seropedicae* AU14040, [6] *H. frisingense* AU14559. Padrões (7 a 14): [7] Ácido Glucurônico (Glc A), [8] Maltose (Mal), [9] Galactose (Gal), [10] Glucose (Glc), [11] Arabinose (Ara), [12] Manose (Man), [13] Xilose (Xyl), [14] Ramnose (Rha)

Segundo Surtherland *et al.* (1994), a presença de ácido D-glucurônico é comum em EPS microbianos. Entretanto, nenhuma amostra analisada apresentou banda compatível com esse monossacarídeo. Glucose e galactose, aparentemente, são predominantes nas amostras de EPS analisadas. Apenas *H. hutiense putei* IAM15032 apresentou banda com perfil de eluição similar à da ramnose, sugerindo que o EPS produzido por esse microorganismo se trata de heteropolissacarídeo.

A confirmação da composição monossacarídica foi realizada por GC-MS. Para tanto, seguiu-se com a derivatização do material hidrolisado utilizado na análise por CCD. Os resultados estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9. Composição monossacarídica de EPS produzidos por *Herbaspirillum* spp.

Microorganismo	Proporções relativas (%)						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
<i>H. huttiense putei</i> IAM15032	43,2	*	*	1,7	1,3	41,1	11,6
<i>H. lusitanum</i> P612	4,3	*	1,7	2,0	4,6	40,0	47,8
<i>H. hiltineri</i> N3	3,4	34,5	3,0	1,8	2,2	20,2	35,0
<i>H. frisingense</i> GSF30	28,8	*	1,5	6,4	4,9	47,3	11,0
<i>H. seropedicae</i> AU14040	*	*	*	*	3,7	21,6	72,0
<i>H. frisingense</i> AU14559	*	*	*	*	17,0	26,1	54,0

* < 1%

Assim como observado na CCD, os monossacarídeos predominantes são glucose (11,0 a 72%) e galactose (20,2 a 47,3%). Manose, embora em menores concentrações (1,34 a 17,0%), assim como galactose e glucose, foi detectada em todas as amostras de EPS analisadas. Rhamnose, aparentemente, é o principal monossacarídeo (43,2%) do EPS produzido por *H. huttiense putei* IAM15032, microorganismo não diazotrófico isolado de água de poços artesianos no Japão (DING & YOKOTA, 2004). Curiosamente, essa desoxihexose aparece como o segundo componente majoritário (28,8%) do EPS extraído de *H. frisingense* GSF30, bactéria fixadora de nitrogênio presente em raízes, hastes e folhas de gramíneas forrageiras (KIRCHHOF *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que esse resultado não foi evidenciado por CCD, possivelmente, em virtude da concentração de 1.5 vezes menor (28,8%) quando comparada à concentração de rhamnose (43,2%) cuja banda foi revelada. Fucose (34,5%) e manose (17%) aparecem em maior quantidade apenas em EPS, produzidos, respectivamente, por *H. hiltineri* N3 e *H. frisingense* AU14559. Conforme esperado, xylose (1,7 a 3,0 %) e arabinose (1,8 a 6,4%) são os monossacarídeos com menor predominância. Ambas aldopentoses são pouco frequentes na composição de EPS microbianos (SURTHERLAND *et al.*, 1994).

Com base nos resultados supracitados, foi possível estabelecer a proporção entre os monossacarídeos predominantes em cada amostra de EPS analisada (TABELA 10).

TABELA 10. Proporção entre os monossacarídeos de EPS produzidos por *Herbaspirillum spp.*

Espécies	Monossacarídeos	Proporção
<i>H. hutienne putei</i> IAM15032	Rha:Gal:Glc	10:9:3
<i>H. lusitanum</i> P6-12	Glc:Gal	5:4
<i>H. hiltineri</i> N3	Gluc:Fuc:Gal	5:5:3
<i>H. frisingense</i> GSF30	Gal:Rha:Glc	5:3:1
<i>H. seropedicae</i> AU14040	Gluc:Gal	10:3
<i>H. frisingense</i> AU14559	Gluc:Gal:Man	10:5:3

NOTA: Proporção estimada com base na divisão entre as quantidades obtidas para cada monossacarídeo, sendo o de maior valor fixado no denominador. Para expressar o resultado em números inteiros, os valores foram multiplicados pelo menor divisor comum

A determinação das ligações glicosídicas dos EPS foi obtida, conforme descrito, a partir da formação dos derivados alditois acetatos parcialmente metilados. Os padrões utilizados foram ramnose, manose, galactose e glucose. Os resultados, descritos na TABELA 11, foram avaliados com base no perfil de fragmentação (dexosihexose e hexoses) e tempo de retenção dos padrões.

Conforme previamente observado, o EPS de *H. hutienne putei* IAM15032 é composto por Rha:Gal:Glc (10:9:3). Na análise dos derivados PMAA foram evidenciadas as ligações glicosídicas 4-Rha (58%), 2,4-Rha (6,6%), *t*-Glc (34,2%) e 4-Glc (1,2%), cujos derivados correspondem, respectivamente, à 2,3-Me₂-Rha, 3-Me-Rha e 2,3,4,6-Me₄-Glc, 2,3,6-Me₃-Glc. Entretanto, a presença de galactose não foi observada. Fato semelhante ocorreu com outras duas amostras. Não foram notados traços de derivados PMAA tanto de rhamnose na amostra de EPS de *H. frisingense* GSF30 (Gal:Rha:Glc;5:3:1), quanto de manose para EPS de *H. frisingense* AU14559 (Gluc:Gal:Man; 10:5:3). Esse fato pode ser associado à baixa eficiência na etapa de metilação, visto que o acesso aos grupos hidroxilas situados no interior da estrutura pode ser restringido conforme arranjo espacial da molécula. Esse fato pode ser minimizado por meio de sucessivas reações de metilação combinando um ou mais métodos.

Ligações glicosídicas equivalentes aos terminais redutores de galactose (*t*-Gal) e glucose (*t*-Glc) foram evidenciadas para EPS de *H. lusitanum* P6-12 (Glc:Gal, 5:4) e *H. seropedicae* AU14040 (Glc:Gal, 10:3). Além disso, ligações 4-Glc (52%) e 3,4-Me-Glc (< 1%), relativas aos derivados 2,3,6-Me₃-Glc e 3,4-Me₂-Glc estão presentes no EPS de *H. lusitanum* P6-12.

TABELA 11. Derivados alditois acetatos parcialmente metilados (PMAA's) de EPS de *Herbaspirillum* spp.

Espécies	OMe-Aditol acetatos	R _t (min)	Ligação glicosídica	M%
<i>H. huttiense putei</i> IAM15032	2,3-Me ₂ -Rha	12,6	4-Rha	58,0
	3-Me-Rha	14,0	2,4-Rha	6,6
	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	13,2	<i>t</i> -Glc	34,2
<i>H. lusitanum</i> P6-12	2,3,6-Me ₃ -Glc	14,7	4-Glc	1,2
	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	13,5	<i>t</i> -Gal	25,1
	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	13,2	<i>t</i> -Glc	21,8
	2,3,6-Me ₃ -Glc	14,7	4-Glc	52,4
	2,6-Me ₂ -Glc	15,6	3,4-Glc	*
	3,4,6-Me ₃ -Gal	14,8	2-Gal	1,2
<i>H. hiltineri</i> N3	2,4,6-Me ₃ -Gal	15,4	3-Gal	2,0
	2,4-Me ₂ -Gal	16,5	3,6-Gal	*
	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	13,2	<i>t</i> -Glc	11,8
	2,3,4-Me ₃ -Glc	15,0	6-Glc	3,1
	3,6-Me ₂ -Glc	15,9	2,4-Glc	8,1
	2,3-Me ₂ -Glc	16,2	4,6-Glc	53,6
	2,4-Me ₂ -Glc	16,4	3,6-Glc	1,2
	2-Me-Glc	17,0	3,4,6-Glc	4,3
	3-Me-Glc	17,3	2,4,6-Glc	14,3
	<i>H. frisingense</i> GSF30	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	13,5	<i>t</i> -Gal
3,4,6-Me ₃ -Gal		14,8	2-Gal	16,5
2,3,6-Me ₃ -Gal		15,6	4-Gal	*
2,4-Me ₂ -Gal		16,7	3,6-Gal	17,7
2,3,4,6-Me ₄ -Glc		13,2	<i>t</i> -Glc	4,8
2,3,6-Me ₃ -Glc		14,7	4-Glc	24,1
<i>H. seropedicae</i> AU14040	2,3-Me ₂ -Glc	16,2	4,6-Glc	4,2
	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	13,5	<i>t</i> -Gal	30,4
<i>H. frisingense</i> AU14559	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	13,2	<i>t</i> -Glc	69,6
	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	13,5	<i>t</i> -Gal	64,6
	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	13,2	<i>t</i> -Glc	35,4

* proporções relativas < 1%

Para completar a análise estrutural os EPS foram submetidos, conforme descrito, à análise por RMN. Entretanto, nenhum espectro de ¹H consistente com o material investigado nas amostras foi observado. As amostras foram reprocessadas e reanalisadas, entretanto, novamente, nenhum resultado foi evidenciado.

5. CONCLUSÕES

A análise de todos os resultados obtidos na avaliação da produção e caracterização de EPS produzidos por *Herbaspirillum spp.*, permite considerar as seguintes conclusões:

- As estirpes de *Herbaspirillum* com maior produção de EPS (maior relação carboidrato / proteína) em meio NFb malato líquido foram: *H. hutense putei* IAM15032 (105,61 µg/ µg), *H. lusitanum* P612 (65,96 µg/ µg), *H. hiltineri* N3 (49,16 µg/ µg), *H. frisingense* GSF30 (37,28 µg/ µg), *H. seropedicae* AU14040 (35,55 µg/ µg) e *H. frisingense* AU14559 (31,71 µg/ µg). Essas estirpes tiveram a identidade confirmada por meio do sequenciamento do 16S RNAr.
- As três estirpes com maior produção de EPS são bactérias não fixadoras de nitrogênio: *H. hutense putei* IAM15032, *H. lusitanum* P612, *H. hiltineri* N3. A variação da quantidade de EPS produzidos por essas estirpes variou de 105,61 a 49,16 µg/ µg, sugerindo diferença significativa. Já a produção de EPS pelo diazotrófico *H. frisingense* GSF30 e isolados clínicos *H. seropedicae* AU14040 e *H. frisingense* AU14559 foi de 37,28 a 31,71 µg/ µg, indicando baixa variação.
- Glucose e galactose são os monossacarídeos predominantes na estrutura de EPS das estirpes estudadas. Entretanto, a composição monossacarídica é variável entre espécies.

REFERÊNCIAS

- ARAGNO, M.; SCHLEGEL, H. G. *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogenoxidizing, facultatively autotrophic bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 28, p. 112–116, 1978.
- BAIS, H. *et al.* The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**. v. 57, p. 233-266, 2006.
- BALDANI, J. I. *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. Nov., a root-associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I. *et al.* 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. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 802 - 810, 1996.
- BALDANI, J. I. *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, p. 91-92, 1997
- BALSANELLI, E. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**. v.12, p. 2233 – 2244, 2010.
- BALSANELLI, E. *et al.* Exopolysaccharide Biosynthesis Enables Mature Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **PLoS ONE**. v.9, p. 1-10, 2014.
- BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. **Kluwer Academic Publishers**. p. 97-118, 1998.
- BERG G. *et al.* The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**. v. 7, p. 1673–1685, 2005.
- BOGINO *et al.* The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 15838-15859, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976.
- BREEDVELD, M. W. ; ZEVENHUIZEN, L. P. ; ZEHNDER, A. J. Excessive excretion of cyclic beta-(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. **Environmental Microbiology**. v.56, p. 2080-6, 1990.

BRENCIC, A; WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, p.155- 194, 2005.

BROUGHTON, W.J. *et al.* Flavonoid-Inducible Modifications to Rhamnan O Antigens Are Necessary for Rhizobium sp Strain NGR234 – Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology**. v.188, p. 3654-3663, 2006.

CANUTO, E. L. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 62–64, 2003.

CHEN, J. *et al.* Herbaspirillum species: a potential pathogenic bacteria isolated from acute lymphoblastic leukemia patient. **Current Microbiology**. v. 62, p. 331-333, 2011.

CIUCANU, J.; KEREK, F. Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**. v.131, p. 209–217, 1984.

COENYE, T. Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 2062–2069, 2002.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**. v. 49, p. 711- 745, 1995.

CRUZ, L. M. *et al.* 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* sp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 2223–2230, 2004.

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

DOBRIŤSA, A., P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 1418-1426, 2010.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUSHA, I. *et al.* SyrM is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.9, p.755-65, 1999.

FLEMMINH, H.C; WINGNDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs): structural and ecological aspects. **Water Science and Technology**. v.6, p.1-8, 2001.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. **European Journal of Biochemistry**. v. 270, p.1365- 1380, 2003.

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

GRANT, S. R. *et al.* Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**. v.60, p. 425–449, 2006.

GUIMARÃES, S. L *et al.* Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**. v.2, p.25–30, 2003.

HALL-STOODL, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, **Nature**. v.2, p. 95-108, 2004.

HIGGINS, M.J.; NOVAK, J. T. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. **Journal of Environmental Engineering**. v.123, p. 479-485, 1997.

HOUGH, L. & JONES, K. N. Chromatography on paper. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. v.1, p. 21-31, 1962.

HUECK C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology Molecular Biology Review**. v. 62, p. 379–433, 1998.

I.M., W.T. *et al.* *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. Nov., a 4-cholorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 851-855, 2004.

JAMES, E.K. *et al.* *Herbaspirillum* an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. *Moench*. **Journal of Experimental Botany**. v.48, p. 785-797, 1997.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17, p.77-119, 1998.

JUNG, S.-Y.; LEE, M.-H.; OH, T.-K.; YOON, J.-H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victoriakis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p.2284-2288, 2007.

KARR, D. B. *et al.* Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. **Planta**. v.211, p. 218-226, 2000.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 73, n.2, p.310-347, 2009.

KIRCHHOF, G. *et al.* *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 157-168, 2001.

LADHA, J.K.; P.M. REDDY, Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**. v.252, p.151-167, 2003.

LAGIER, J. C. *et al.* Noncontiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**. v.7, p. 200-209, 2012.

LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water. III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. **International Bull Bacteriology Nomenclatura Taxonomy**. v.12, p. 161–170, 1962.

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

MADHURI, K. VIDAYA P. V. Recent trends in the characterization of microbial exopolysaccharides. **Oriental Journal of Chemistry**. v.30, p.895 a 904, 2014.

MAYER, L.M, *et al.* Bioavailable amino acids in sediments: a biomimetic, kinetics-based approach. **Limnol Ocean**. v.40, p.511- 520, 1995.

MICHIELS, K.W; CROES, C.L; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **J Gen Microbiol**, v.137, p.2241–2246, 1991

MONTEIRO, R. A. *et al.*, *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**. v. 356, p. 175-196, 2012.

MOTA LJ *et al.* Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. **FEMS Microbiology Letters**. v. 252, p.1–10, 2005

OLIVARES, F. L. *et al.* Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**. v.135, p. 575-597, 1997

PEDROSA, F. O.; YATES, G. M. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasiliense* by *nifA* and *nifC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiology Letters**. v.23. p.95-101, mar. 1984.

PEDROSA, F.O. *et al.* Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil. Biol. Biochem.** 29:843-846, 1997

PEDROSA, F.O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS** v. 7, p. 1-10, 2011.

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

RONCATO-MACARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* gene in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.** 45: 39-47, 2003.

ROTHBALLER, M. *et al.* *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 1341–1348, 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.74, p.5463-5467, 1977.

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. **Carbohydrate Research**. v.340, p.731-739, 2005.

SCHMID, M.; BALDANI, I.J; HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. **Prokaryotes**. v.5, p. 141-150, 2003.

SPIPKER, T. *et al.* Recovery of *Herbaspirillum* Species from Persons with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 2774-2777, 2008.

STOLTZFUS, J.R. *et al.* Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**. v.194, p. 25-36, 1997

STRAUB, D. *et al.* The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30 identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Frontiers in Microbiology**. p.1-10, 2013.

SUTHERLAND, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotech Advances**. v.12, p. 393-448, 1994.

TAN, M. J.; OEHLER, R. L. Lower extremity cellulitis and bacteremia with *Herbaspirillum seropedicae* associated with aquatic exposure in a patient with cirrhosis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**. v. 13, p. 277-279, 2005.

TADRA-SFEIR, M. Z. *et al.* Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 77, p. 2180–2183, 2011.

TYLER, H. L.; TRIPLETT, E. W. Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. v. 46, p. 53-73, 2008.

VANDEVIVERE, P.; KIRCHMAN, D.L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. **Applied Environmental Microbiology**. v. 59, p.3280–3286, 1993.

VALVERDE, A. *et al.* *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1979-1983, may. 2003.

WEBER, O.B. *et al.* *Herbaspirillum*-like Bacteria in Banana Plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.32, p.201-205, 2001.

WEISS, V. *et al.*, Genome Sequence of *Herbaspirillum lusitanum* P6-12, an Endophyte Isolated Draft from Root Nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Bacteriology**. v. 194, p. 4136-4137, 2012.

WHITON, R. S., LAU, P., MORGAN, S.L. *et al.*, Modifications in the aditol acetate method for analysis of muramic acid and other neutral and amino sugars by capillary gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **J. Chromatography**. v. 347, p. 109-120, 1985

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

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

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. v. 2, p. 211-215, 1963-b.

ZIGA, E.D.; DRULEY, T.; BURNHAM, C.D. *Herbaspirillum* Species Bacteremia in a Pediatric Oncology Patient. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 4320-4321, 2010.