UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

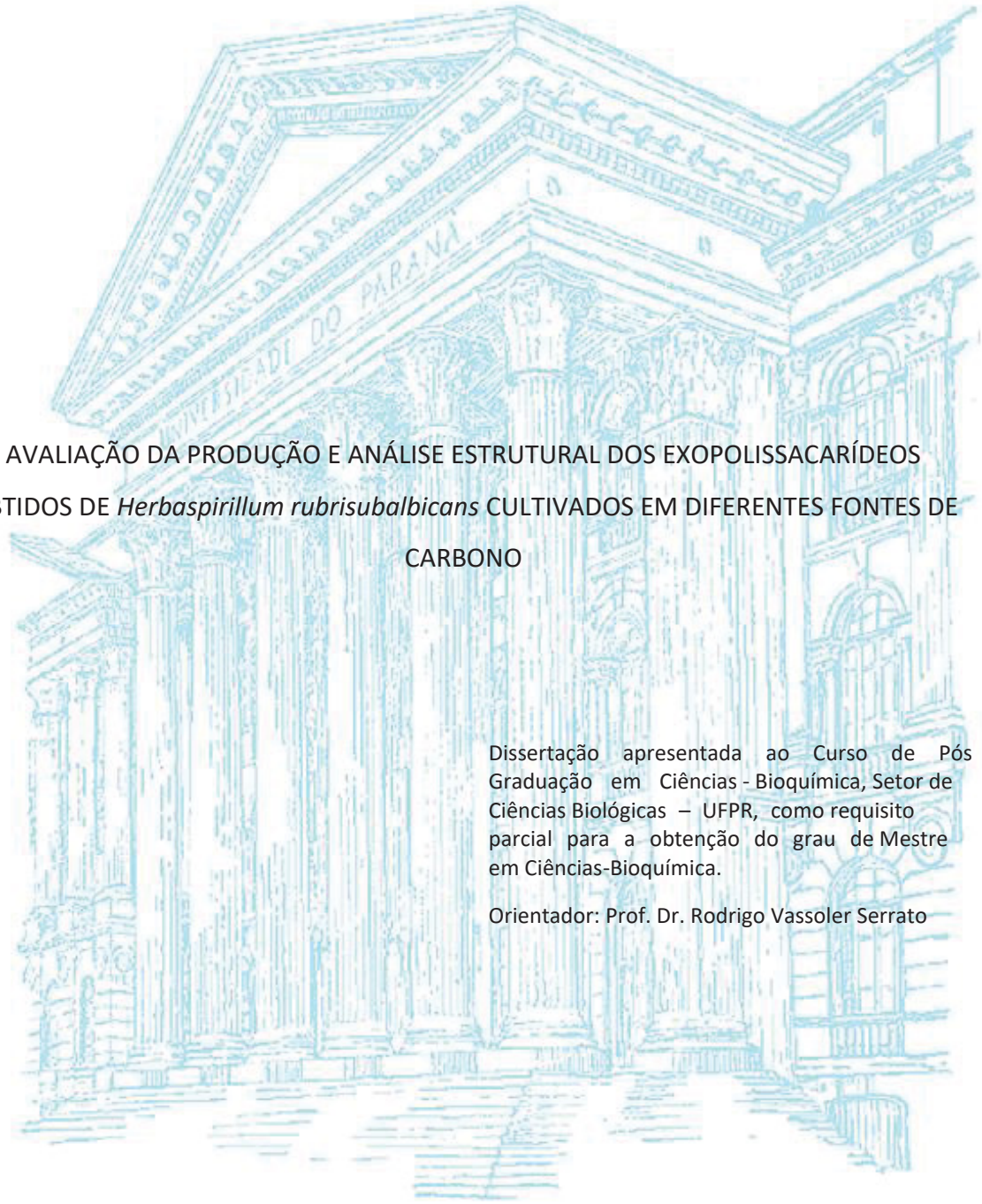
DANIELA FREITAG

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

CURITIBA

2019

DANIELA FREITAG



AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas – UFPR, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Freitag, Daniela
Avaliação da produção e análise estrutural dos exopolissacarídeos obtidos de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* cultivados em diferentes fontes de carbono. / Daniela Freitag. – Curitiba, 2019.
57 p.: il.

Orientador: Rodrigo Vassoler Serrato

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

1. Herbaspirillum 2. Bactérias nitrificantes I. Título II. Serrato, Rodrigo Vassoler III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.95

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIENCIAS BIOLOGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

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 **DANIELA FREITAG** intitulada: **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**, 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, 29 de Março de 2019.

RODRIGO VASSOLER SERRATO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ADRIANO GONÇALVES VIANA
Avaliador Externo (UEPG)

THALES RICARDO CIPRIANI
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, o qual é fonte de força e esperança em todos os momentos!

As mulheres mais importantes da minha vida, meus pilares: Minha avó Wanda, minha mãe Verena e a minha irmã Daiane, por sempre estarem comigo, me ajudando, incentivando e me acompanhando. Tudo o que sou devo a vocês!

Ao meu avô João Adão Sawulski, não tenho palavras para descrever o quanto sinto a sua falta, mas sei que estás comigo sempre!

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato por ser paciente, pela dedicação e ensinamentos, que me fizeram crescer no quesito profissional e também pessoal.

As amigas que me acompanharam nessa trajetória: Vanessa, Giuliana, Shayane, Iglesias e Micheli. Pelas conversas científicas e descontraídas, passeios, comidas e também pelos momentos difíceis.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 252, 250, 247 e anexo.

Ao Prof. Dr. Fábio, o qual foi meu orientador na graduação e mesmo sem talvez perceber, me incentivou a continuar estudando e me aprimorando.

A Universidade Federal do Paraná e a todos os professores por me proporcionarem um ensino de excelência.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

E por fim, mas não menos importante, a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado!

Ninguém vence sozinho, OBRIGADA a todos!

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

RESUMO

A espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é uma bactéria diazotrófica e endofítica, possuindo a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico contribuindo para a promoção do crescimento vegetal, associando-se principalmente a gramíneas tais como arroz, milho, trigo, sorgo e cana-de-açúcar, bananeira e abacaxizeiro. Com o intuito de se obter um melhor entendimento sobre a interação entre planta e micro-organismo, vários estudos envolvendo expressão gênica de procariotos e eucariotos são realizados constantemente, como também, relacionando constituintes da superfície bacteriana, como os exopolissacarídeos (EPS). Conhecendo a importância do EPS para a interação planta-bactéria, e sabendo que a caracterização dos EPS microbianos é importante na determinação da aplicabilidade desses biopolímeros, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de EPS por nove estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em meio NFb-malato como também em fontes de carbono alternativas e determinar a estrutura dos EPS purificados, utilizando métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos. Para isto, as estirpes foram crescidas em meio NFb-malato sendo posteriormente realizadas as determinações de açúcares através do método de Dubois, e quantificação de proteínas através do método de Bradford. As estirpes M4, BA15 e BA16 se destacaram por obter a maior eficiência de transformação do malato em carboidrato. A cromatografia em camada delgada demonstrou glucose e galactose como componentes principais de todos os EPS analisados e também a presença de rhamnose na estirpe M1. Na composição monossacarídica, as amostras também apresentaram quantidades significativas de glucose e galactose exceto pela estirpe M1 que apresentou 4,7% de Gal e mostrou a presença de Xyl (24,2%) e Rha (28,9%) em quantidades muito superiores às demais estirpes analisadas. As nove estirpes também foram crescidas em diferentes fontes de carbono e obtiveram um perfil de rendimento heterogêneo, onde as estirpes que obtiveram a maior relação carboidrato:proteína foram BA11 e BA15 em citrato de sódio; M1 em frutose, glicerol e manitol; BA15 em galactose; BA149 e M4 em glucose e M4 e BA10 em malato. A estirpe M1 obteve a maior produção de EPS e por isso foi selecionada para o cultivo em grande escala. Foram realizados os cultivos em grande escala no meio glicerol, manitol e malato e, por cromatografia em camada delgada pôde ser visualizada banda dos monossacarídeos de glucose e galactose no meio contendo glicerol como fonte de carbono e a presença de manose no meio contendo manitol como fonte de carbono. A análise da composição monossacarídica corrobora os resultados e ainda ressalta a presença de fucose (14%) e galactose (7%) em glicerol e arabinose (2%), manose (67%) e Rha (17%) em manitol. Os dados PMAA da estirpe M1, apresentaram-se muito semelhantes, sendo os principais derivados observados 2,3,6-Me_3-Glc, 2,3,4-Me_3-Glc e 2,3-Me_2-Glc em ambas as amostras. As amostras também se apresentaram semelhantes nas análises de RMN, com a exceção dos sinais atribuídos às unidades de Rha no EPS produzido no cultivo com manitol.

Palavras-chave: Exopolissacarídeos. *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Interação Planta-Bactéria.

ABSTRACT

Herbaspirillum rubrisubalbicans is a diazotrophic and endophytic bacterium, which has the hability to fix atmospheric nitrogen by contributing to plant growth promotion, and are associated mainly with grasses such as rice, corn, wheat, sorghum and sugarcane, along with banana and pineapple. In order to obtain a better understanding of the interaction between plant and microorganism, several studies involving prokaryotes and eukaryotes gene expression are performed constantly, as well as relating bacterial surface constituents such as exopolysaccharides (EPS). Knowing the importance of EPS for plant-bacterial interaction, and having knowledge that the characterization of microbial EPS is important in determining the applicability of these biopolymers, the objective of this work was to evaluate EPS production of nine strains of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* in NFb-malate medium, as well as on alternative carbon sources and determine the structure of the purified EPS using chemical, spectrometric and spectroscopic methods. For this, the strains were grown in NFb-malate medium and the sugar determinations were performed by Dubois method, and protein quantification by Bradford method. The strains M4, BA15 and BA16 stood out for obtaining the greatest efficiency of turning malate into carbohydrate. Thin-layer chromatography demonstrated glucose and galactose as major components of all EPS analyzed and also the presence of rhamnose in strain M1. In monosaccharide composition analysis, the samples also presented significant amounts of glucose and galactose except for M1 strain which presented 4.7% of Gal and showed the presence of Xyl (24.2%) and Rha (28.9%) in quantities much higher to other analyzed strains. The nine strains were also grown at different carbon sources and obtained a heterogeneous yield profile, where the strains that obtained the highest carbohydrate:protein ratio were BA11 and BA15 in sodium citrate; M1 in fructose, glycerol and mannitol; BA15 in galactose; BA149 and M4 on glucose and M4 and BA10 on malate. The M1 strain obtained the highest EPS production and therefore was selected for large-scale cultivation. Large-scale cultures were carried out in glycerol, mannitol and malate medium and, by thin-layer chromatography glucose and galactose monosaccharide bands could be visualized in the medium containing glycerol as the carbon source and also the presence of mannose in the medium containing mannitol as carbon source. Monosaccharide composition analysis corroborates the results and also emphasizes the presence of fucose (14%) and galactose (7%) in glycerol and arabinose (2%), mannose (67%) and rhamnose (17%) in mannitol. The PMAA data from strain M1 were very similar, with the main derivatives being 2,3,6-Me_3-Glc, 2,3,4-Me_3-Glc and 2,3-Me_2-Glc in both samples. The samples were also similar in the NMR analyzes, with the exception of the signals assigned to the rhamnose units in EPS produced in the culture with mannitol.

Keywords: Exopolysaccharides. *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Plant-bacterial interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fórmula estrutural da unidade repetitiva do PHB. 28

FIGURA 2. Via metabólica para produção extracelular de PHB. 29

FIGURA 3. Avaliação da produção de EPS por estirpes de *H. rubrisubalbicans* de acordo com a relação carboidrato:proteína após cultivo em meio NFb-malato. 38

FIGURA 4. Cromatografia em camada delgada dos EPS obtidos das estirpes de *H. rubrisubalbicans* crescidas em meio NFb-malato. 39

FIGURA 5. Comparativo entre as produções de EPS pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* crescida na presença de glicerol e malato. 44

FIGURA 6. Cromatografia em camada delgada dos EPS obtidos da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* cultivados na presença de glicerol e manitol, após hidrólise total. 45

FIGURA 7. Espectro de correlação heteronuclear $^{1}H/^{13}C$ (HSQC) do EPS produzido pela estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* cultivada em manitol como fonte de carbono. 48

FIGURA 8. Sobreposição dos espectros de correlação heteronuclear $^{1}H/^{13}C$ (HSQC) da estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* realizando um comparativo entre os espectros contendo glicerol (azul) e manitol (vermelho) como fonte de carbono. 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Algumas funções dos exopolissacarídeos relacionando a relevância para o biofilme. 22

TABELA 2. Propriedades e aplicações de alguns exopolissacarídeos bacterianos. 24

TABELA 3. Estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* utilizadas neste trabalho..... 30

TABELA 4. Quantificação de carboidratos e proteínas totais de estirpes de *H. rubrisubalbicans* após cultivo em meio NFb-malato por 24h. 37

TABELA 5. Composição monossacarídica dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans.* . 40

TABELA 6. Avaliação da produção de EPS pelas estirpes de *H. rubrisubalbicans* após cultivos em meio NFb líquido contendo diferentes fontes de carbono. 41

TABELA 7. Avaliação da produção em grande escala de EPS pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* cultivados em manitol, malato e glicerol..... 43

TABELA 8. Composição monossacarídica dos EPS da estipe M1 de *H. rubrisubalbicans* cultivados em manitol e glicerol..... 46

TABELA 9. Derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA) de EPS da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* em glicerol e manitol..... 47

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB – D-3-Hidroxibutirato

AA – Alditol Acetato

BPCV – Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

C/N – Carbono/nitrogênio

$D.O._{600}$ – Densidade óptica em 600 nm

D_2O – Óxido de Deutério (Água Deuterada)

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS – Exopolissacarídeo

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

FC – Fibrose Cística

Fuc – Fucose

Gal – Galactose

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

GLC – Cromatografia Gasosa Líquida

Glc – Glucose

GlcA – Ácido Glucurônico

HSQC – "*Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*"

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LPS – Lipopolissacarídeo

Man – Manose

MWCO – *Molecular Weight Cut Off*

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

PHA – Polihidroxialcanoato

PHB – Polihidroxibutirato

PMAA – Alditol Acetato Parcialmente Metilado

r.p.m. – Rotações por Minuto

Rf – Fator de Retenção

Rha – Rhamnose

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico

SST3 – Sistema de Secreção do tipo III

TFA – Ácido Trifluoracético

TLC – Cromatografia de Camada Delgada

UV – Ultra Violeta

Xyl – Xilose

α – Alfa

β – Beta

δ – Delta (p.p.m.)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....15
1.2 OBJETIVOS.....17
1.2.1 Objetivo Geral.....17
1.2.2 Objetivos Específicos.....17
1.3 JUSTIFICATIVA.....17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....19
2.1 Gênero *Herbaspirillum*.....19
2.2 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.....20
2.3 Exopolissacarídeos.....20
2.4 Interação planta-bactéria.....25
2.5 Polihidroxibutirato.....27
3 METODOLOGIA.....30
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....30
3.2 MEIOS DE CULTURA.....30
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO 32
3.4 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS E PRODUÇÃO DE EPS.....32
3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....33
3.6 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CARBOIDRATO:PROTEÍNA.....33
3.7 ISOLAMENTO DOS EPS PARA ANÁLISES ESTRUTURAIS.....33
3.8 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EPS.....34
3.8.1 Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....34
3.8.2 Derivatização dos EPS em acetatos de alditol (AA).....34
3.8.3 Derivatização dos EPS em acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA).....35
3.8.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....35
3.8.5 Ressonância Magnética Nuclear.....36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....36
4.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....38
4.2 PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB).....44
4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....45

5 CONCLUSÕES.....49
REFERÊNCIAS.....51

1 INTRODUÇÃO

A associação entre plantas e microrganismos é motivo de estudo não apenas em relação aos fundamentos da coexistência e interação de diferentes organismos, mas também por causa do seu uso na prática da produção de produtos agrícolas orientada para a agricultura sustentável.

A crescente dependência da agricultura em relação aos fertilizantes químicos vendo sendo cada vez mais motivo de preocupação e cautela, visto que o setor agrícola, ano após ano, é pressionado a adotar novas tecnologias para manter e/ou produzir altos rendimentos. Essa busca por alta produção leva a decorrência do possível uso indiscriminado desses fertilizantes, podendo resultar na eutrofização das águas subterrâneas e do solo, como também a emissão de gases causadores do efeito estufa (Marks *et al*., 2013).

Dentre as alternativas existentes, visando diminuir o uso de fertilizantes químicos em culturas agrícolas, adotando uma prática sustentável, foram desenvolvidos inoculantes que contém bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).

A utilização dessas bactérias vem sendo uma alternativa promissora que possui baixo impacto ambiental, garantindo elevada produtividade com melhor relação custo-benefício (Spolaor *et al*., 2016). BPCV são conhecidas por melhorar o crescimento das plantas quando comparado a fertilizantes sintéticos. Elas aprimoram o crescimento vegetal e podem ajudar na sustentabilidade e produtividade das culturas (Singh *et al*., 2013). Algumas possuem a capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfatos, produzir hormônios vegetais, além de outros efeitos benéficos para a planta, constituindo assim, uma alternativa biotecnológica para controlar o uso demasiado de fertilizantes químicos, aumentar a produção e diminuir os danos ambientais e custos (Glick, 2012).

Descoberto por Martinus Beijerinck, em 1901, o processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN), compreende a conversão de N_2 (dinitrogênio molecular) gasoso, encontrado em abundância na atmosfera da Terra, em amônia (NH_3), que pode então ser utilizada pelas plantas como uma fonte assimilável para o seu crescimento e produtividade.

A interação entre plantas e microrganismos, em geral, é caracterizada por ser uma relação simbiôntica, benéfica, onde ambos são beneficiados. Atualmente, o exemplo melhor elucidado na literatura sobre interação simbiótica faz menção a bactérias do solo pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phylorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, comumente conhecidos como rizóbios e suas plantas hospedeiras, no qual resulta na formação de nódulos radiculares. Nódulos são novos órgãos, altamente especializados, que consistem principalmente de células infectadas das plantas com bacteroides. Dentro dos nódulos, as bactérias assumem uma forma endo-simbiótica, os bacterioides, que são capazes de reduzir o dinitrogênio atmosférico à amônia. Como a amônia é tóxica para a planta, ela é rapidamente convertida em amidas e/ou ureídos que nutrem a planta hospedeira (Broughton *et al*., 2006).

Portanto, essa associação interespecífica traz vantagens para ambos os indivíduos, pois enquanto a bactéria se beneficia dos nutrientes liberados pelas raízes da planta e da sua proteção, a planta por sua vez, pode se beneficiar da secreção de fitohormônios e da fixação biológica de nitrogênio (FBN) produzidos pela bactéria, que causam aumento da absorção de nutrientes, afetando positivamente o crescimento do vegetal e o ganho de biomassa, além de reduzir sua exposição a infecções patogênicas e agindo como controlador de doenças (Balsanelli *et al*., 2016; Xia *et al*., 2015; Santos *et al*., 2014).

No processo de comunicação e interação planta-bactéria várias biomoléculas estão envolvidas, entre elas os exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelos microrganismos, que conferem auxílio na sobrevivência do vegetal em várias situações de estresses ambientais, como estresse salino, hídrico, variações de temperatura, entre outros. Estes polímeros de carboidratos possibilitam à bactéria aderir e colonizar superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam, além de formar uma camada hidratada que envolve as células, protegendo-as do dessecamento. Também podem ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos a bactéria (Barreto *et al*., 2011; Liu *et al*., 2013).

Determinar a estrutura primária dessas moléculas é fundamental para que se tenha o entendimento do íntimo processo de comunicação intercelular que ocorre entre esses microrganismos e suas plantas hospedeiras.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de exopolissacarídeos (EPS) por nove estirpes da bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, isoladas de diferentes plantas hospedeiras e realizar a caracterização estrutural dessas moléculas.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de EPS pelas estirpes de *H. rubrisubalbicans* crescidas em meio líquido na presença de diferentes fontes de carbono;
- Selecionar as estirpes e condições de crescimento que apresentam maior produção de EPS para crescimento em grande escala;
- Isolar e purificar os EPS das estirpes selecionadas de *H. rubrisubalbicans* e submeter a análises químicas e estruturais;
- Determinar a estrutura dos EPS purificados, utilizando métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

1.3 JUSTIFICATIVA

Comumente os microrganismos, em especial, as bactérias ainda são associadas como seres microscópicos causadores de patologias, pois apesar dos avanços medicinais e tecnológicos, ainda há ocorrência de muitos casos de infecções oportunistas, principalmente com pacientes acamados e/ou com o sistema imunológico debilitado. Essa correlação entre microrganismo-patologia acontece não apenas no ramo medicinal, mas também no agronegócio, onde os fatores de virulência dos microrganismos podem causar enfermidades em animais, plantas e alimentos. Contudo, essa visão negativa sobre os microrganismos vem sendo desconstruída a medida que substâncias químicas e/ou aplicações biotecnológicas estão sendo conhecidas e desenvolvidas, constituindo fontes promissoras com potencial aplicação

na medicina (fármacos), agricultura (agroquímicos) e nos estudos de processos biológicos (biologia química).

Segundo Lopes, Guimarães e Pupo (2011), as substâncias químicas produzidas pelos microrganismos são utilizadas como fármacos ou como estruturas-modelo para o planejamento e desenvolvimento de fármacos, como também diversos antibióticos, anti-cancerígenos, imunossupressores e agentes redutores do colesterol sanguíneo, têm suas origens em produtos naturais microbianos, visualizando assim, uma importante capacidade de produzir substâncias químicas com elevada potência biológica.

De fato, a pesquisa envolvendo microrganismos que vivem em simbiose interespecífica vem sendo cada vez mais explorada na química de produtos naturais como uma alternativa na busca de moléculas com atividade biológica.

Percebe-se portanto, a importância dos estudos de bioprospecção de microrganismos endofíticos, principalmente bactérias, que estão envolvidas no crescimento vegetal e que são produtoras de polímeros naturais, como os EPS, com a finalidade de obter biomoléculas de interesse industrial, desenvolvendo tecnologias mais limpas e sustentáveis, encontrando novas aplicações, e também representando fontes promissoras para exploração desses microrganismos na interação planta-bactéria.

Conjuntamente, a escassez de informações estruturais na literatura sobre os EPS de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* demonstra a importância do conhecimento da caracterização estrutural, capacidade de produção e composição química dos EPS dessa espécie, a fim de poder obter aplicações biotecnológicas. Segundo Serrato (2008) o conhecimento detalhado da estrutura de um polissacarídeo é fundamental para que se tenha um completo entendimento de suas propriedades, funções e aplicações, sendo que, o conhecimento da estrutura primária dessas moléculas pode ser de suma importância para o entendimento do processo de interação entre planta-bactéria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Herbaspirillum*

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* são pertencentes à classe das β-proteobactérias, sendo gram-negativas, com motilidade flagelar e com formato geralmente vibrioide ou, dependendo das condições de crescimento, espiraladas. Possuem de um a três flagelos em um ou ambos os polos, diâmetro de aproximadamente 0,6 a 0,7 µm e podem utilizar diversas fontes de carbono com preferência para ácidos orgânicos como malato e lactato (Baldani *et al*., 1986; Baldani *et al*., 1996).

Atualmente o gênero é composto por diversas espécies, entre elas: *H. seropedicae* (Baldani *et al*., 1986); *H. rubrisubalbicans* (Baldani *et al*., 1996); *H. frisingense* (Kirchhof *et al*., 2001); *H. lusitanum* (Valverde *et al*., 2003); *H. chlorophenolicum* (Im *et al*., 2004); *H. huttiense* subespécie *Huttiense* (Ding e Yokota, 2004); *H. hiltneri* (Rothballer *et al*., 2006); *H. rhizosphaerae* (Jung *et al*., 2007), *H. huttiense* subespécie *putei*, *H. autotrophicum* e *H. aquaticum* (Dobritsa *et al*., 2010), *H. massiliense* (LAGIER *et al*., 2012), *H. canariense*, *H. aurantiacum* e *H. soli* (CARRO *et al*., 2012); *H. psychrotolerans* (Bajerski *et al*., 2013); *H. seropedicae* AU14040 (MARQUES *et al*., 2015) e *H. piri* (Xu *et al*., 2018).

O gênero *Herbaspirillum* é raramente relacionado como um agente patogênico humano, visto que associa-se principalmente a gramíneas, tais como arroz, milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar (Baldani *et al*., 1986b), bananeira e abacaxizeiro (Cruz *et al*., 2001) todos vegetais de relevância econômica. Entretanto, a bactéria já foi relacionada com celulite (infecção de pele e partes moles) e bacteremia (Tan e Oehler 2005), encontrada em cultura de isolados clínicos de pessoas com fibrose cística (FC) (Spilker *et al*., 2008), cultura de sangue de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Chen *et al*., 2011) e septicemia (Liu *et al*., 2018). Esse gênero, portanto, pode ser considerado um patógeno oportunista, principalmente em pacientes imunocomprometidos, colonizando vias aéreas, como também causando bacteremia e sepse. Contudo, ainda é muito pouco conhecido a patogênese das infecções por

Herbaspirillum spp ou o modo de exposição que levam a infecção humana (Chemaly *et al*., 2015).

2.2 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito primeiramente através da descrição da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani *et al*., 1986) com várias estirpes isoladas de diferentes gramíneas, caracterizando-se por fixar nitrogênio (diazotrófica) e colonizar plantas, sendo consideradas bactérias endofíticas obrigatórias e apresentando baixa sobrevivência no solo. Mais tarde, em 1996, uma segunda espécie diazotrófica, *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi reclassificada pelos mesmos autores, com o nome de *H. rubrisubalbicans* após análise e sequenciamento da porção 16S de seu rRNA.

Essa espécie possui a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbias, promovendo o crescimento vegetal, mas também pode atuar como um fitopatógeno onde coloniza as raízes, caules, e principalmente folhas em algumas variedades de sorgo e cana-de-açúcar (Baldani *et al*., 1996; James *et al*., 1998; Olivares *et al*., 1997), causando a doença da estria mosqueada na variedade norte-americana B4362 de cana-de-açúcar e na variedade chinesa Taiwang de cana de açúcar, e estrias vermelhas em variedades de sorgo (Tan *et al*., 2010, Pimentel *et al*., 1991).

2.3 Exopolissacarídeos

Durante o processo de colonização com a planta, diversas biomoléculas estão envolvidas, onde ocorrerá o contato bactéria-hospedeiro e a ligação das bactérias a raiz da planta. Esse processo de colonização é mediado por constituintes da superfície bacteriana e hospedeira, entre eles estão os exopolissacarídeos (EPS) (Balsanelli *et al*., 2010, 2013).

O gênero *Herbaspirillum* faz parte dos microrganismos que possuem representantes que têm a capacidade de produzir EPS. A fitopatologia conhecida como estria mosqueada é um exemplo resultante da produção excessiva de EPS pelo

endófito *H. rubrisubalbicans*, que acaba por obstruir o lúmen do xilema de cana-de-açúcar (Baldani *et al*., 1992) ou sorgo (James *et al*., 1997).

Dentre as funções dos EPS produzidos por bactérias fixadoras de nitrogênio está o seu papel na interação planta-bactéria (Leigh & Coplin, 1992), onde a produção de EPS por linhagens bacterianas, juntamente com a formação de biofilme, contribuem para a fertilidade do solo e o crescimento das plantas (Qurashi & Sabri, 2012). O termo "biofilme" citado por Costerton (1987) refere-se a células microbianas que se ligaram a uma superfície ou se agregaram umas com as outras.

A composição do EPS depende do ecossistema do biofilme (microrganismos presentes, forças de cisalhamento, temperatura e disponibilidade de nutrientes) podendo apresentar muitas variações, porém, no geral, o EPS é constituído majoritariamente por polissacarídeos, e em menor proporção, proteínas, ácidos nucléicos e lipídios, e vários compostos orgânicos de distintos grupos funcionais, além de constituintes inorgânicos (Singh *et al*., 2011). Essa mistura de biomoléculas confere resistência à matriz e um certo grau de viscoelasticidade e flexibilidade ao biofilme, por meio de interações físico-químicas fracas (por exemplo: Van der Waals, ácido-base de Lewis e interações eletrostáticas). Curiosamente, parece ser principalmente os exopolissacarídeos na matriz que fornecem esse recurso ao biofilme (Flemming & Wingender, 2010; Peterson *et al*., 2015). Também, as diferenças estruturais químicas dos EPS são responsáveis pelo desempenho funcional da molécula, como proteção da célula microbiana contra dessecação, estresse osmótico e ação de anticorpos, entre outros.

As moléculas da matriz do biofilme, formam uma estrutura tridimensional que facilita a auto-organização das células em comunidades e fornece capacidade para coordenar a comunicação química célula-célula, conduzir interações cooperativas, facilitando a troca de genes e fornecendo um grau de estabilidade física que não podem ser realizadas eficientemente por células de vida livre. Algumas funções do EPS foram abordadas (Tabela 1) demonstrando extensa vantagem para o biofilme. A secreção de uma matriz de EPS representa, no sentido mais amplo, uma extensão da célula (Castiblanco & Sundin, 2016; Decho & Gutierrez, 2017).

É importante salientar que o EPS não é um componente essencial para a vida microbiana (ou seja, as células podem sobreviver e crescer sem eles), mas sua

secreção, e, consequentemente a formação do biofilme, aumenta grandemente a taxa de sobrevivência, a eficiência metabólica e a adaptação das células ao microambiente (Decho & Gutierrez, 2017).

TABELA 1. Algumas funções dos exopolissacarídeos relacionando a relevância para o biofilme.

Função	Relevância para o biofilme	Componentes do biofilme envolvidos
Adesão	Permite as etapas iniciais na colonização de superfícies abióticas e bióticas por células e a fixação a longo prazo de biofilmes em superfícies	Polissacarídeos, proteínas, DNA e moléculas anfipáticas
Agregação de células bacterianas	Permite a ligação entre células, a imobilização temporária de populações bacterianas, o desenvolvimento de altas densidades celulares e o reconhecimento entre células	Polissacarídeos, proteínas e DNA
Coesão de biofilmes	Mantém um microambiente altamente hidratado; tolerância à dessecação em ambientes com deficiência de água	Polissacarídeos neutros e carregados, proteínas e DNA
Barreira protetora	Confere resistência a defesas do hospedeiro durante a infecção e confere tolerância a vários agentes antimicrobianos	Polissacarídeos e proteínas
Sorção de compostos orgânicos	Permite o acúmulo de nutrientes do meio ambiente	Polissacarídeos carregados e proteínas
Sorção de íons inorgânicos	Formação de gel, troca iônica, formação de minerais...	Polissacarídeos carregados e proteínas
Fonte de nutrientes	Fornece uma fonte de compostos contendo carbono, nitrogênio e fósforo para utilização pela comunidade de biofilme	Todos os componentes do EPS

FONTE: Adaptado de Flemming & Wingender (2010).

Além das propriedades abordadas anteriormente, estudos envolvendo as principais funções desse polímero, relatam propriedades de aplicação na indústria alimentícia, como aditivos, no aumento da viscosidade, elasticidade e textura dos alimentos (Duboc & Mollet, 2001). Estes polissacarídeos tornam-se vantajosos na

aplicação a nível industrial, pois apresentam características semelhantes ao ágar e características reológicas que os tornam desejáveis na indústria. Também, ainda no setor alimentício, os EPS estão sendo utilizados com o intuito de reduzir a sinérese e permitir que o produto seja conservado por mais tempo, sem comprometimento de suas propriedades funcionais e sensoriais (Santos, Cavalcanti & Celligoi 2011).

Concomitantemente, os EPS estão sendo utilizados nas mais diversas funções, como na utilização da exploração de óleo, favorecendo esse processo de extração (Shah & Ashtaputre, 1999), na enzimologia, em técnicas de imobilização enzimática (Cavalcante, Carvalho & Cunha, 2006); como biofloculante sendo uma alternativa para a solução de problemas ambientais como por exemplo no tratamento de resíduos, processamento de minerais, bem como o tratamento da água (Santos, Cavalcante & Celligoi, 2011).

Apesar das várias funções já relatadas e estudadas dos EPS, o interesse sobre esse biopolímero aumentou consideravelmente nos últimos anos, porque esses compostos são candidatos a muitas aplicações comerciais nos setores de saúde, bionanotecnologia, alimentos, cosméticos e meio ambiente (Castellane *et al*., 2014). As propriedades funcionais foram demonstradas em muitas aplicações (Tabela 2), como incluindo produtos alimentícios, produtos farmacêuticos, bioemulsificantes (Xie *et al*., 2013), biossorção de metais pesados (Mohamad *et al*., 2012), entre outros.

O avanço tecnológico levou à descoberta da utilidade de biopolímeros bacterianos e consequentemente, uma abundância de aplicações industriais e médicas estão sendo realizadas e aprimoradas. Aplicando as propriedades dos EPS principalmente nos setores farmacêuticos e médicos, pode-se utilizar por exemplo, os polissacarídeos para revestir partículas magnéticas e conferir estabilidade as mesmas, e utilizar em meios de contraste, para imagem de ressonância magnética (Maciel, 2008), na liberação modificada de fármacos (Santos, Cavalcante & Celligoi, 2011) e mais recentemente, os EPS estão sendo utilizados na busca de novos tratamentos para o câncer, como na regulação da proliferação e da apoptose das células cancerígenas em camundongos (Zhou *et al*., 2017).

TABELA 2. Propriedades e aplicações de alguns exopolissacarídeos bacterianos.

Exopolissacarídeo	Composição	Aplicações	Bactéria
Dextran	Glucose	Alimentos, indústria farmacêutica, meios cromatográficos	*L. mesenteriodes*
Alginato	Ácido gulurônico e Ácido manurônico	Curativos cirúrgicos e liberação controlada de fármacos	*P. aeroginosa* e *A. vinelandii*
Xantana	Glucose, manose e ácido glucurônico	Alimentos, indústria farmacêutica, cosméticos e produtos de cuidado pessoal	*Xanthomonas* spp.
Curdlan	Glucose	Alimentos, indústria farmacêutica, remoção de metais pesados e aditivo para concreto	*Rhizobium meliloti* e *Agrobacterium radiobacter*
Celulose	Glucose	Alimentos (fibra indigerível), cicatrização de feridas; produtos biomédicos	*Acetobacter* spp.
Succinoglicano	Glucose e galactose	Alimentos e recuperação de petróleo	*Alcaligenes faecalis* var. myxogenes
Glucuronano	Ácido glucurônico	Alimentos e produtos cosméticos	*Sinorhizobium meliloti* M5NICS e *Gluconacetobacter hansenii*
Ácido colânico	Fucose, glucose, galactose e glucuronato	Produtos cosméticos e de cuidados pessoais	*E. coli*, *Shigella* spp. *Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp.

FONTE: Adaptado de Nwodo, Green & Okoh, 2012.

2.4 Interação planta-bactéria

Praticamente todas as plantas vivem em íntima associação com microrganismos, que podem colonizar as suas superfícies, sendo conhecida como colonização epífita ou ocupar espaços internos dos tecidos vegetais, conhecida como colonização endofítica (Brencic & Winans, 2005).

Especificamente, a maioria dos microrganismos associados à rizosfera tem o potencial de estimular o crescimento das plantas e gerenciar a saúde do solo, estabelecendo uma relação simbiótica compatível com a planta (Tariq *et al*., 2017).

Entre os tipos conhecidos de interações benéficas entre planta e bactéria então as interações simbiótica e associativa. A interação simbiótica, particularmente descrita para o gênero Rhizobium, é caracterizada pela formação de nódulos na raíz que são colonizados por bactérias. Como um resultado, as bactérias fixam nitrogênio atmosférico e fornecem nitrogênio para a planta (Pühler *et al*., 2004).

Um dos modelos de bactérias diazotróficas mais bem estudadas na interação entre plantas e microrganismo envolve bactérias endossimbióticas chamadas de rizóbios, pertencentes à família Rhizobiaceae (Oldroyd, 2013).

Embora mais conhecido por formar nódulos, os rizóbios também podem colonizar plantas sem causar nenhum tipo de patogenicidade e podem utilizar exsudatos de plantas no auxílio ao crescimento e a divisão. Essas associações não são dependentes dos determinantes patogênicos ou simbióticos das respectivas bactérias, e fenômenos semelhantes podem ocorrer nos vários membros dessa família (Brencik & Winans, 2005).

Estudos de expressão gênica de procariotos e eucariotos são realizados com o intuito de se obter uma melhor compreensão a respeito da interação entre planta e microrganismo, visto que, os mecanismos moleculares envolvidos na associação planta-bactéria de *Herbaspirillum spp*. ainda são pouco conhecidos. Um estudo de Pedrosa *et al*. (2011) identificou no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 genes homólogos ao Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), pili tipo IV, adesinas/hemaglutininas e genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeos (EPS). Alguns destes mecanismos foram elucidados em *Herbaspirillum spp*., como nos estudos realizados por Schmidt *et al*. (2012), onde foi

mostrado que o SST3 é requerido durante a colonização de *H. rubrisubalbicans* M1 em plantas hospedeiras.

H. rubrisubalbicans pode colonizar tecidos internos de plantas de cana-de-açúcar, incluindo o talo, no qual podem ser encontrados diferentes genes responsáveis pelo transporte do C como substrato no metabolismo do carbono. Sabendo disso, Polese *et al*. (2017) realizaram um estudo no qual observaram como os flavonoides presentes na composição do suco de cana-de-açúcar afetam o nível de expressão gênica de acordo com a fonte de carbono testada para a estirpe HCC103.

Também, um estudo realizado por Meneses *et al*. (2011) correlacionou a importância do EPS produzido pela bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* na interação com plântulas de arroz, onde foi utilizado uma estirpe mutante (MGD) de *G. diazotrophicus* deficiente na produção de EPS. Os autores abordaram fases de associação bactéria-planta, onde destacam-se a fase de adsorção, que consiste de uma ligação rápida e reversível e a fase de ancoragem, onde as bactérias se tornam irreversivelmente ligadas a superfície da raíz. Nesta etapa que exige a produção de EPS, as bactérias tornam-se firmemente aderidas e outras bactérias em suspensão, aderem-se a esta formando agregados de bactérias no sítio de adesão. A coinoculação de EPS com o mutante MGD foi suficiente para permitir a adesão do mutante às raízes de arroz. Isto é interessante, dado que a cocultura de MGD com EPS permite a colonização endofítica.

Posteriormente, um estudo publicado pelo mesmo autor em 2017 descreve que o EPS de *G. diazotrophicus* aumenta a tolerância ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e faz com que a estirpe seja capaz de se proteger contra H_2O_2. Portanto, pode-se sugerir que o EPS de *G. diazotrophicus* também pode ser de grande importância para proteger as bactérias colonizadoras contra a resposta de defesa das plantas durante o processo de colonização, possuindo um papel importante na tolerância a estresses ambientais.

Contudo, apesar do avanço tecnológico permitir cada vez mais o estudo das interações planta-bactéria no nível molecular e celular, é importante dedicar um esforço substancialmente maior para investigar como as plantas interagem com as bactérias patogênicas, comensais e simbióticas sob condições que simulam o seu ambiente nativo de crescimento (Aung *et al*., 2018).

2.5 Polihidroxibutirato

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) destacam-se por serem plásticos biodegradáveis ou bioplásticos, surgindo como uma alternativa que tenta resolver a problemática ambiental do acúmulo de materiais de origem petroquímica e também a redução do consumo de plásticos convencionais (Figueiredo *et al*., 2014). Os PHAs são obtidos através de técnicas de fermentações com a utilização de microrganismos (Chanprateep 2010), e são um dos compostos de armazenagem mais bem estudados em bactérias.

São acumulados intracelularmente por bactérias e são sintetizados quando mais fontes de carbono estão disponíveis do que pode ser consumido pelas bactérias, ou seja, é o resultado do excesso de fonte de carbono com concomitante limitação de outro nutriente essencial ao seu crescimento, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio. Portanto, PHAs servem como reserva de carbono e energia em condições limitantes de nutrientes, quando são mobilizados durante os períodos de inanição e aumentam a sobrevivência de bactérias (Potter & Steinbuchel, 2005; Uchino *et al*., 2007).

O papel metabólico dos PHAs é mais complexo do que apenas fornecer um estoque de carbono intracelular. Até hoje, a síntese de PHA foi correlacionada com mecanismos de proteção contra uma diversificada gama de condições de estresse, como o crescimento na presença de oxidantes, choque osmótico, resistência à dessecação, calor e irradiação UV (Kadouri *et al*., 2003; Lopez *et al*., 2015; Koskimäki *et al*., 2016; Sacomboio *et al*., 2017). O PHA mais comum, produzido por procariotos é o polihidroxibutirato (PHB) (Lopez *et al*., 2015).

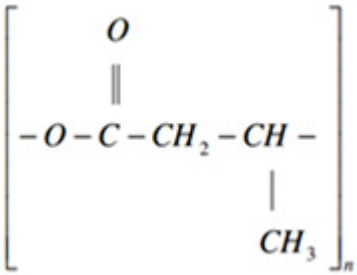
O PHB é um PHA de cadeia curta com um metil ($-CH_3$) no seu grupo R, como mostrado na figura 1. É um homopolímero de D-3-hidroxibutirato (3HB), altamente esteroespecífico com carbono assimétrico apresentando configuração D (Steinbuchel, 1991). Pelo menos três enzimas estão envolvidas na sua síntese: β-cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHB sintase codificada pelos genes *phb*A, *phb*B e *phb*C respectivamente (Babel *et al*., 2001).

A biossíntese de PHB está ilustrada na figura 2 e esta depende do metabólito central de carbono acetil-CoA. Na síntese, duas moléculas de acetil-CoA são

condensadas por uma β-cetotiolase (codificada pelo gene *phb*A), para formar acetoacetil-CoA, que é então reduzido para (R)-3-hidróxi-butiril-CoA por uma acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (*phb*B). Finalmente, o (R)-3-hidróxi-butiril-CoA é polimerizado pelo PHB sintase (*phb*C) (Rehm, 2003; Steinbuchel, 2001). Portanto, a biossíntese de PHB é um processo regulado tanto pela disponibilidade de acetil-CoA quanto pela disponibilidade de equivalentes reduzidos na forma de NADPH (Sacomboio, 2014).

A síntese de PHB microbiano pode ser manipulada através das vias metabólicas do carbono e da melhoria da disponibilidade de NADPH, como descrito no trabalho de Kocharin *et al*. (2013), onde os autores adotaram como estratégia experimental, aumentar a oferta de acetil-CoA citosólico, e consequentemente aumentar a produção de NADPH, resultando então no aumento de PHB em *Saccharomyces cerevisiae*.

FIGURA 1. Fórmula estrutural da unidade repetitiva do PHB.

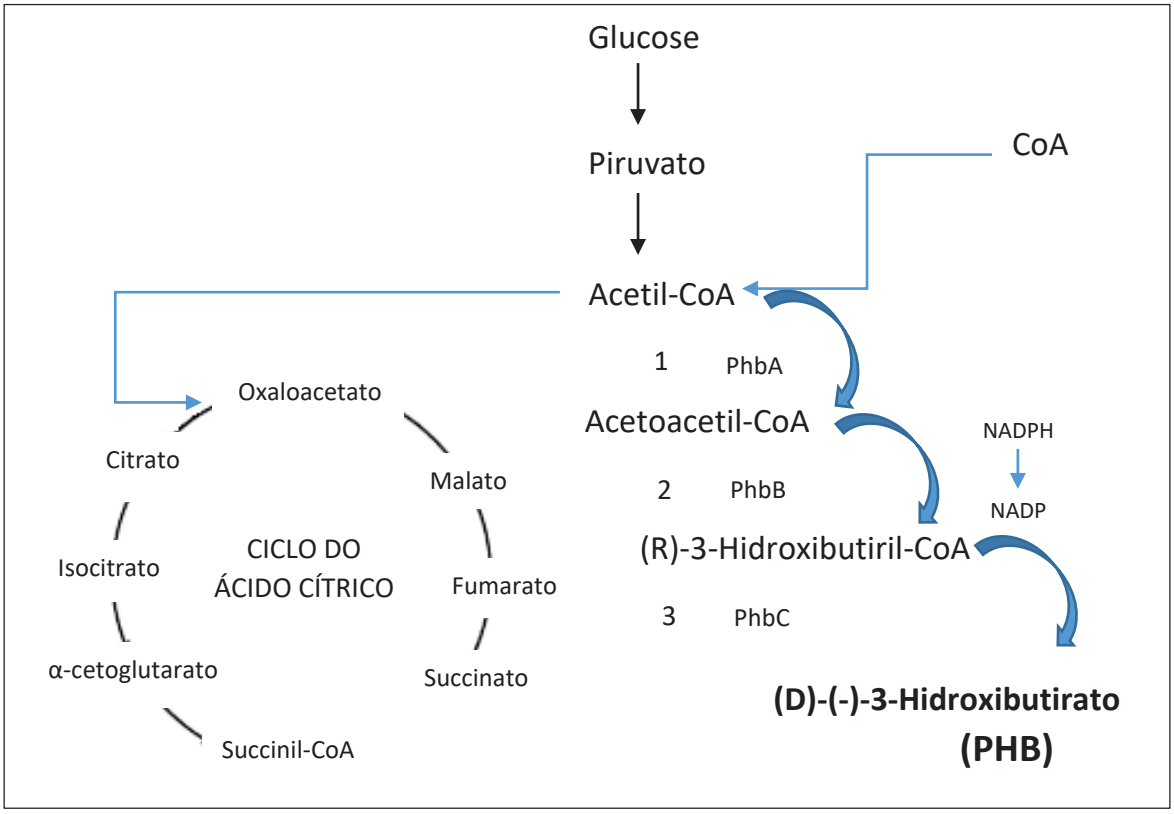


Um recente estudo, realizado por Batista *et al*. (2018), investigou as consequências fisiológicas da síntese de PHB em *H. seropedicae*, em uma linhagem mutante de células deficientes de PhaC, sendo estas incapazes de produzir PHB. Os autores constataram que a ausência de PHB na linhagem mutante perturba o equilíbrio redox e aumenta o estresse oxidativo, também, o perfil transcricional do mutante phaC afeta também, a expressão de muitos genes.

Um estudo parecido foi realizado por Alves *et al*. (2019) onde os autores relacionaram a importância do metabolismo de PHB em bactérias da espécie *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 na promoção do crescimento vegetal, no qual a conclusão do estudo teve como base a confirmação de que a promoção do

crescimento de plantas é impactado quando houve a deleção de genes envolvidos no metabolismo de PHB.

FIGURA 2. Via metabólica para produção extracelular de PHB.



1. β-cetotiolase, 2. acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente e 3. PHB sintase.
FONTE: Adaptado de Cardoso (2017).

O PHB possui um papel importante principalmente na resistência da célula ao estresse e o seu papel no armazenamento de carbono (Kadouri *et al*., 2003), contudo, ainda não há relato na literatura sobre o metabolismo de PHB em *H. rubrisubalbicans,* sendo que o entendimento do metabolismo do PHB é um ponto significativo para obtenção deste polímero em escala industrial, a partir de células bacterianas.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As estirpes da bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Tabela 3), 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 3. Estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* utilizadas neste trabalho.

***H. rubrisubalbicans* (estirpe)**	**Planta Hospedeira**	**Referência**
AB7	*Ananas* sp. (abacaxizeiro)	CRUZ *et al*., 2001
BA10	*Musa* sp. (bananeira)	CRUZ *et al*., 2001
BA11	*Musa* sp. (bananeira)	CRUZ *et al*., 2001
BA15	*Musa* sp. (bananeira)	CRUZ *et al*., 2001
BA16	*Musa* sp. (bananeira)	CRUZ *et al*., 2001
BA149	*Musa* sp. (bananeira)	CRUZ *et al*., 2001
HCC103	*Saccharum* sp. (cana-de-açúcar)	EMBRAPA
M1	*Saccharum* sp. (cana-de-açúcar)	BALDANI *et al*., 1996
M4	*Saccharum* sp. (cana-de-açúcar)	BALDANI *et al*., 1996

As células de cada estirpe foram mantidas em suspensão de glicerol 50% e armazenadas a -20 ^{o}C, e também em placas de petri com meio NFb-malato sólido armazenadas à temperatura ambiente.

3.2 MEIOS DE CULTURA

As estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foram crescidas em meio NFB-líquido (PEDROSA & YATES, 1984), contendo: $MgSO_4.7H_2O$ (0,2 g.L^{-1}), NaCl (0,1 g.L^{-1}), $CaCl_2$ (20 mg.L^{-1}), $FeSO_4.7H_2O$ (20 mg.L^{-1}), biotina (100 µg.L^{-1}), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (2,0 mg.L^{-1}), $MnSO_4.H_2O$ (2,4 mg.L^{-1}), H_3BO_3 (2,8 mg.L^{-1}), $CuSO_4.5H_2O$ (8,0 mg.L^{-1}),

$ZnSO_4.7H_2O$ (240 µg.L^{-1}), K_2HPO_4 (17,8 g.L^{-1}), KH_2PO_4 (159,5 g.L^{-1}) e NH_4Cl (20 mM) como fonte de nitrogênio. Os sais de fosfatos e de cloreto de amônio foram autoclavados separadamente (120°C, 1 atm, 20 min), e adicionados ao meio de cultura antes da inoculação das estirpes. Soluções estoque (1 M) das diferentes fontes de carbono utilizadas nos testes de fisiologia de produção de EPS foram esterilizadas separadamente, e adicionadas ao meio de cultura antes da inoculação. O pH de todos os meios de crescimento foi ajustado para 6,5.

As diferentes fontes de carbono utilizadas foram adicionadas em diferentes volumes a fim de garantir a mesma relação C/N em todos os meios de cultura, sendo as concentrações finais de cada fonte a seguinte: malato de sódio (23,47 g/L), acetato de sódio (28,79 g/L), citrato de sódio (30,12 g/L), frutose (21,05 g/L), galactose (21,05 g/L), glicerol (21,55 g/L), glucose (21,05 g/L), e manitol (21,27 g/L).

As fontes de carbono foram calculadas e ajustadas para terem proporções aproximadas no número de átomos de carbono inicial para cada meio em específico. A concentração da fonte de carbono foi calculada para manter uma relação de massa de C/N igual a 30. A relação carbono nitrogênio foi calculada de acordo com a concentração apenas de carbono do meio, sem alterar a concentração de nitrogênio, conforme descrito pela equação abaixo:

$$\text{Relação } C/N = \frac{[(nC \times C)/MMFC)] \times (C_{g/L})_C}{[(nN \times N)/MMFN] \times (C_{g/L})_N}$$

Onde:

nC = número de átomos de carbono na fonte de carbono utilizada;

C = peso atômico do átomo de carbono;

MMFC = massa molar da fonte de carbono utilizada;

Cg/L(C) = concentração da fonte de carbono utilizada em g/L;

nN = número de átomos de nitrogênio na fonte de nitrogênio utilizada;

N = peso atômico do átomo de nitrogênio;

MMFN = massa molar da fonte de nitrogênio utilizada;

Cg/L(N) = concentração da fonte de nitrogênio utilizada em g/L;

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foram cultivadas em meio NFb líquido utilizando diferentes fontes de carbono conforme descrito. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas, sendo mantidos em shaker rotatório (120 rpm) à 30 °C. Após a recuperação das estirpes preservadas em glicerol 50%, as células foram repicadas e crescidas por 24 h para gerar os pré-inóculos frescos. Após a determinação da densidade óptica dos pré-inóculos em 600 nm ($D.O._{600}$), um volume calculado, suficiente para iniciar o cultivo experimental com D.O. inicial igual a 0,05, foi transferido o meio de cultura final e crescido por 24 ou 48 h para posterior avaliação da produção de EPS, determinação da DO final e proteínas totais.

3.4 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS E PRODUÇÃO DE EPS

A determinação da produção de EPS por cada estirpe de *Herbaspirillum* foi realizada após os cultivos em pequena escala contendo o meio NFb com diferentes fontes de carbono (10 mL) e com D.O. inicial de 0,05. Após 48 h de cultivo, as células foram removidas por centrifugação (5.000 rpm, 5 min) e o meio de cultura foi recuperado para as análises. Uma alíquota de 1,0 mL do meio de cultura livre de células foi utilizado para determinação de carboidratos totais pelo método do PhOH:H_2SO_4 (Dubois et al., 1956). O restante do meio de cultura livre de células (9,0 mL) foi tratado com etanol (3 v/v) à -20 ºC por três vezes, a fim de precipitar os EPS. Após cada precipitação, o material foi recuperado por centrifugação (10.000 rpm, 15 min), e ressolubilizado em 1,0 mL de água, até ser liofilizado e submetido à determinação de carboidratos totais. A curva de calibração foi realizada com soluções de glucose nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL, e as absorbâncias determinadas por espectrofotômetro no comprimento de onda de 495 nm.

3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas totais nos meios de cultura após 48 h de crescimento foi realizada a partir das mesmas amostras submetidas à determinação de produção de EPS. Para tanto, antes de remover as células por centrifugação, uma alíquota de 100 µL da cultura foi submetida à quantificação de proteínas totais realizada conforme Bradford (1976). As amostras foram tratadas com 100 µL de NaOH 0,2 N e incubadas a 37 °C por 2 h. Na sequência, 30 µL dessa solução foram transferidos para uma placa de 96 poços e posteriormente adicionado 170 µL do reativo Coomassie Blue G250. 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 595 nm.

3.6 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CARBOIDRATO:PROTEÍNA

A relação carboidrato:proteína (µg/µg) foi realizada como forma de avaliação entre a quantidade de EPS produzido em relação ao crescimento bacteriano, e foi determinada para cada uma das estirpe de *H. rubrisubalbicans*, cultivada na presença de diferentes fontes de carbono. Os valores de carboidratos totais utilizados (em µg) foram aqueles obtidos para os precipitados etanólicos descrito anteriormente, em relação com os valores de proteínas totais (em µg) presentes em cada condição de cultivo.

3.7 ISOLAMENTO DOS EPS PARA ANÁLISES ESTRUTURAIS

A fim de se obter material suficiente para a realização das análises químicas e estruturais, as estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* selecionadas, nas condições de cultivo com maior produção de EPS, foram crescidas em 500 mL de meio NFb (D.O. inicial 0,05). Após 24 h, uma alíquota de 1,0 mL do meio de cultura foi utilizada para quantificar carboidratos e proteínas totais pelos métodos descritos anteriormente. As

células do restante do meio crescido foram removidas por centrifugação (5.000 rpm, 5 min) e o meio de cultura submetido à tratamento com etanol (3 v/v) para precipitação dos EPS, conforme descrito anteriormente. O precipitado resultante contendo os EPS foi recuperado por centrifugação (10.000 rpm, 15 min), ressolubilizado no menor volume de água possível e submetidos à diálise exaustiva (MWCO 6-8 kDa) em água corrente. O material retido na membrana de diálise foi congelado e liofilizado para obtenção do rendimento de EPS seco, posteriormente utilizado nas análises estruturais.

3.8 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EPS

3.8.1 Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

Os EPS obtidos das estirpes selecionadas foram submetidos à hidrólise total com ácido trifluoroacético (1 mol.L^{-1}, 100 ^{o}C, 8 h). Após evaporação até a secura, os hidrolisados foram analisados por cromatografia de camada delgada, utilizando placas de alumínio revestidas com sílica (SiO_2). A fase móvel utilizada foi uma mistura contendo acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v) (Hough & Jones, 1962). Após a corrida e a secagem das placas em estufa (5 min à 100°C), as placas foram reveladas com uma solução de orcinol (2,5 g.L^{-1}) em etanol contendo 5% de H_2SO_4 e submetidas a aquecimento à 100 ^{o}C por 5 min. Soluções padrão de monossacarídeos (1,0 mg.mL^{-1}) foram utilizadas para comparação dos R_f (galactose, ácido galacturônico, glucose, manose, xylose e rhamnose).

3.8.2 Derivatização dos EPS em acetatos de alditol (AA)

Para a determinação da composição monossacarídica, 2,0 mg dos EPS obtidos das estirpes selecionadas foram submetidos à uma hidrólise ácida total utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 1 mol.L^{-1}, durante 8 h à 100 ^{o}C. Após evaporação do ácido por fluxo de ar, o hidrolisado foi submetido à redução com $NaBH_4$ em excesso (WOLFROM & THOMPSON, 1963a) e acetilação com anidrido acético:piridina (1:1, v/v) (WOLFROM & THOMPSON, 1963b). Os derivados alditol acetato foram extraídos por

partição com clorofórmio ($CHCl_3$) e o excesso de piridina removido com repetidas lavagens com solução de sulfato de cobre 5% antes de serem analisados por GC-MS.

3.8.3 Derivatização dos EPS em acetados de alditol parcialmente metilados (PMAA)

A determinação das ligações glicosídicas presentes nos EPS foi realizada a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente per-O-metilados (PMAAs) segundo o método descrito por CIUCANU & KEREK (1984). 5,0 mg de EPS liofilizado foram solubilizados em 1,0 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) contendo NaOH pulverizado anidro em excesso, e deixado sob agitação por 12 h. Adições de 0,2 mL de iodeto de metila (CH_3I) foram realizadas a cada 5 min, agitando-se intermitantemente o material em vórtex no intervalo de cada adição até um volume final de 1,0 mL. O material foi deixado por 12 h à temperatura ambiente antes de ser neutralizado com gotas de ácido acético glacial, diluído em 3 volumes de água, e submetido à diálise exaustiva (MWCO 6.000 Da) contra água corrente. O material retido na membrana foi liofilizado e submetido ao procedimento de metilação novamente. Os EPS permetilados foram hidrolisados com ácido trifluoracético (TFA) 1 $mol.L^{-1}$, durante 8 h à 100 ^{o}C. O hidrolisado resultante foi liofilizado e submetido aos processos de redução e acetilação, conforme descrito anteriormente, exceto pela substituição do $NaBH_4$ por $NaBD_4$ (boridreto de sódio deuterado). Os derivados PMAA foram submetidos à análise por GC-MS e identificados de acordo com o tempo de retenção e perfil de fragmentação por impacto de elétrons (Sassaki *et al*., 2005).

3.8.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises foram realizadas em cromatógrafo GC-MS/MS da marca Shimadzu, modelo TQ 8040 equipado com coluna capilar (30 m x 0.25 mm d. i.) modelo SH-Rtx-5MS. As injeções na coluna foram feitas partindo-se de 100 ^{o}C (mantida por 1,0 min), seguindo-se de um aumento gradual até a temperatura atingir 280 ^{o}C sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min.

3.8.5 Ressonância Magnética Nuclear

Os EPS obtidos das estirpes selecionadas nas condições de cultivo determinadas foram solubilizadas em 400 µL D_2O 99,8% (aprox. 20 mg/mL) e inseridas em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro para serem analisadas utilizando um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. As análises mono- e bidimensionais foram realizadas à 70 °C, sendo utilizado o sinal de HOD como referência em δ 4,22 (^{1}H), além do sinal de $-CH_3$ do padrão interno de acetona em δ 2,22 (^{1}H) e δ 30,2 (^{13}C). Foram realizados experimentos unidimensionais de ^{1}H com amplitude espectral de 8 kHz. Experimentos de correlação heteronuclear ^{1}H/^{13}C (HSQC) foram realizados com amplitude espectral de 2,25 e 13,9 kHz para ^{1}H e ^{13}C respectivamente, e *dataset* (t1 x t2) 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

Inicialmente, a capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS) pelas diferentes estirpes da espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans,* foi observada utilizando-se o meio de cultura padrão para esta bactéria, NFb-malato líquido. Os cultivos e os experimentos colorimétricos, tanto para carboidratos quanto para proteínas, foram realizados em triplicata, e os resultados obtidos estão descritos na tabela 4. A quantificação de açúcares totais presentes do meio de cultura após 24 h de crescimento mostrou a eficiência de transformação do malato em carboidratos por esta bactéria. A maior parte das estirpes apresentou concentrações de açúcares totais do meio de cultura que variaram de 57,07 µg/mL (estirpe M1) até 181,93 µg/mL (estirpe M4), destacando-se as estirpes M4, BA15 e BA16 dentre as que apresentaram maior eficiência na conversão de malato em açúcares, com valores observados de 181,93 µg/mL, 116,94 µg/mL e 166,56 µg/mL, respectivamente.

Os resultados da quantificação de açúcares totais presente no precipitado etanólico do meio de cultura e a quantificação de proteínas totais também estão descritos na tabela 4, bem como a relação carboidrato-proteína (CHO:proteína). Os resultados obtidos através da relação carboidrato:proteína podem também ser

visualizados na figura 3. Quando analisadas pela relação carboidrato:proteína, foi possível observar que a estirpe M4 apresentou a maior relação (8,67 μg/μg) e também a maior quantidade de carboidratos totais presentes no precipitado etanólico (113,70 μg/mL). A estirpe que apresentou a menor relação carboidrato:proteína (2,61 μg/μg) foi a HCC103. É relevante destacar que a estirpe M1 foi a estirpe que apresentou a menor concentração de açúcares totais do precipitado etanólico (34,20 μg/mL) e apresentou a menor concentração de proteínas totais dentre todas as estirpes analisadas. Percebe-se que na quantificação de proteínas totais, 8 das 9 estirpes apresentaram valores semelhantes (20,97 a 22,37 μg/mL), indicando que o crescimento celular não teve muita influência na determinação da produção de EPS, observado pela relação carboidrato:proteína.

TABELA 4. Quantificação de carboidratos e proteínas totais de estirpes de *H. rubrisubalbicans* após cultivo em meio NFb-malato por 24h.

ESTIRPE	D.O.$_{600}$ Final	Carboidratos totais (ppt EtOH) (μg/mL)[a]	Carboidratos totais (meio) (μg/mL)[b]	Proteínas totais (μg/mL)[c]	CHO:Proteína (ug/μg)[d]
M4	0,822 ± 0,029	113,70 ± 10,98	181,93 ± 1,26	20,97 ± 1,53	8,67
BA16	0,908 ± 0,016	77,67 ± 3,15	166,56 ± 2,90	21,68 ± 0,20	7,68
BA15	0,910 ± 0,017	50,00 ± 4,28	116,94 ± 1,08	21,53 ± 1,25	5,43
BA11	0,915 ± 0,012	45,04 ± 7,26	103,88 ± 3,23	21,01 ± 0,69	4,95
BA10	0,914 ± 0,011	75,03 ± 2,04	88,67 ± 1,87	21,13 ± 0,94	4,20
M1	0,973 ± 0,034	34,20 ± 8,84	57,07 ± 1,89	14,74 ± 0,84	3,87
AB7	0,918 ± 0,029	60,63 ± 10,71	82,90 ± 3,19	22,37 ± 0,57	3,71
BA149	0,876 ± 0,031	75,46 ± 2,69	83,98 ± 4,08	22,25 ± 1,18	3,39
HCC103	0,902 ± 0,092	55,29 ± 2,81	61,27 ± 9,25	21,17 ± 0,54	2,61

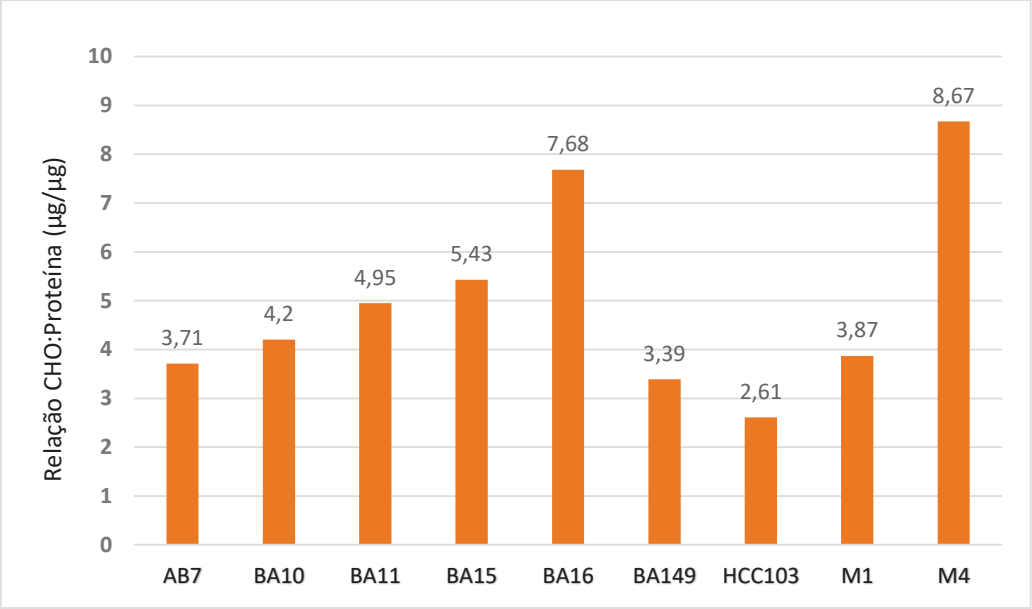
[a] Açúcares totais determinados após repetidas precipitações etanólicas (3 v/v) do meio de cultura desprovido de células.

[b] Açúcares totais do meio de cultura NFb-malato desprovido de células.

[c] Proteínas totais determinadas a partir de 100 uL do meio de cultura.

[d] Relação entre carboidratos totais determinados após precipitação etanólica (3 v/v) do meio de cultura e proteínas totais do meio de cultura.

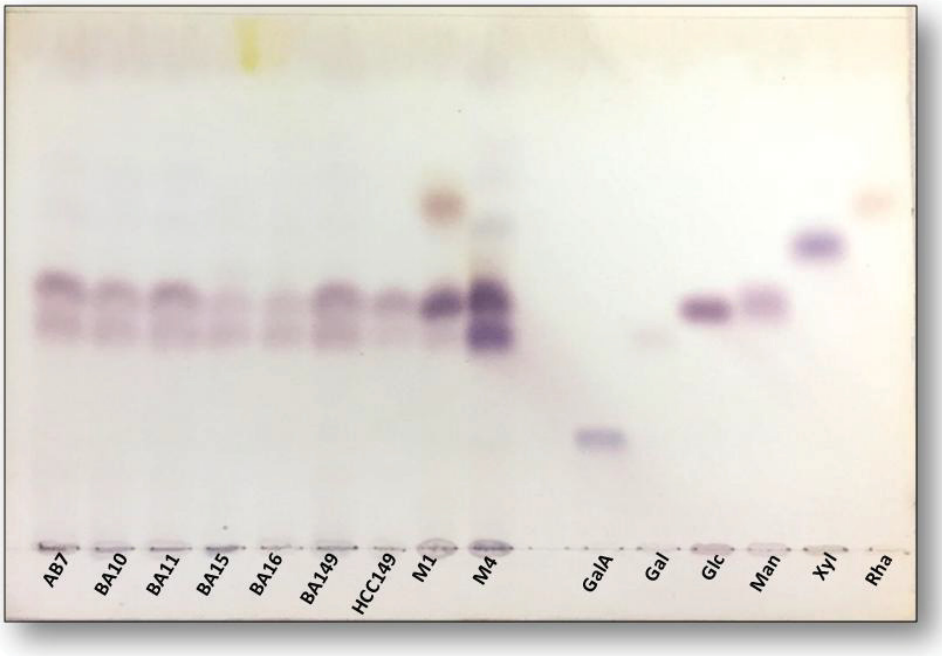
FIGURA 3. Avaliação da produção de EPS por estirpes de *H. rubrisubalbicans* de acordo com a relação carboidrato:proteína após cultivo em meio NFb-malato.



4.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

O material obtido após hidrólise total dos EPS foi analisado por cromatografia em camada delgada (Figura 4) a fim de observar a composição monossacarídica dos EPS produzidos pelas diferentes estirpes. Para tanto, foram utilizadas na cromatoplaca soluções padrão de monossacarídeos (1,0 mg/mL) para que fossem eluídos junto com os hidrolisados. Após a revelação, as bandas observadas corroboram os resultados previamente obtidos na análise dos derivados alditol acetato por GC-MS. Pela comparação dos R_f de cada banda, observou-se que glucose é um dos componentes principais de todos os EPS, assim como galactose. Também foi possível observar claramente a presença de rhamnose na amostra da estirpe M1, através da banda com maior R_f.

FIGURA 4. Cromatografia em camada delgada dos EPS obtidos das estirpes de *H. rubrisubalbicans* crescidas em meio NFb-malato.



Fase móvel: acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v).

Revelador: solução de orcinol (2,5 $g.L^{-1}$) em etanol contendo 5% de H_2SO_4.

O material obtido do sobrenadante dos cultivos em NFb-malato foi submetido à análise da composição monossacarídica. Os resultados são apresentados na tabela 5. Todas as estirpes apresentaram quantidades significativas de Glc e Gal como componentes principais, exceto pela estirpe M1 que apresentou apenas 4,7% de Gal em sua composição, e mostrou a presença de Xyl (24,2%) e Rha (28,9%) em quantidades muito superiores às demais estirpes analisadas. A estirpe M4, observada anteriormente como a maior produtora de EPS dentre as estirpes analisadas, mostrou principalmente as hexoses Gal, Glc e Man em sua composição, numa relação molar aproximada de 4:3:2 respectivamente.

TABELA 5. Composição monossacarídica dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans.*

	Derivados Alditol Acetato[a] (%)						
Estirpe	**Rha**	**Fuc**	**Ara**	**Xyl**	**Man**	**Gal**	**Glc**
AB7	7,1	1,3	2,4	-	6,7	31,4	50,7
BA10	2,6	0,7	6,2	-	7,4	39,3	43,5
BA11	9,9	1,4	1,8	-	5,5	27,1	54,0
BA15	7,9	6,0	5,7	-	9,9	37,1	33,1
BA16	6,6	2,6	6,3	-	8,1	39,1	37,1
BA149	3,06	0,7	15,2	5,8	3,9	28,8	42,3
HCC103	0,7	1,9	2,7	-	4,2	22,3	67,9
M1	28,9	0,5	0,3	24,2	7,5	4,7	33,6
M4	1,8	2,8	1,9	0,1	19,6	43,8	29,8

[a] Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise, redução com $NaBH_4$ e acetilação. Os valores para os derivados alditol acetato estão representados em %.

Visando avaliar a capacidade de produção de exopolissacarídeos pela espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em diferentes fontes de carbono, as estirpes estudadas foram crescidas em meio de cultura NFb contendo diferentes fontes de carbono, como descrito anteriormente. Os cultivos e os experimentos colorimétricos, tanto para carboidratos quanto para proteínas, também foram realizados em triplicata, e os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 6. No geral, pode ser observado uma heterogeneidade entre os resultados das fontes de carbono, que correlacionam carboidrato:proteína, com exceção disso, a estirpe BA10 apresentou a menor relação CHO:proteína em 3 das 7 fontes de carbono testadas, sendo elas frutose (1,60 µg/µg), galactose (2,17 µg/µg) e glicerol (0,99 µg/µg). Com exceção da estirpe M1, os resultados da relação CHO:proteína da fonte manitol se apresentaram homogêneos, variando apenas ± 1,36 µg/µg da estirpe com menor resultado (HCC103 – 1,47 µg/µg) até a estirpe com maior resultado (M4 – 2,83 µg/µg).

As estirpes que apresentaram a maior relação CHO:proteína foram BA11 e BA15 em citrato de sódio; M1 em frutose, glicerol e manitol; BA15 em galactose; BA149 e M4 em glucose; M4 e BA10 em malato. Com isso, podemos observar que as condições e a composição do meio de cultivo, interferem diretamente na produção de EPS microbiano. Contudo, podemos verificar que as estirpes adotadas nesse trabalho possuem a capacidade de produzir EPS em fontes de carbono alternativas.

Um estudo realizado por Ribeiro *et al*. (2015), também obtiveram essa constatação quando utilizaram bactérias diazotróficas de outros gêneros (*Rhizobium* e *Mesorhizobium*) e puderam concluir que elas foram capazes de produzir EPS com a alteração da fonte de carbono. Portanto, a fonte de carbono é um importante fator de influência no processo de biossíntese de EPS (Ruas-Madiedo & Los Reyes, 2005; Gharzouli *et al*., 2012).

Contudo, no meio de cultivo contendo citrato de sódio como fonte de carbono, as estirpes se apresentaram com dificuldade maior de crescimento, necessitando portanto de um tempo maior de incubação (72 h), apresentando finalmente uma taxa de crescimento satisfatória com $D.O_{600}$ final de ± 1,500. Com exceção das estirpes abordadas na tabela 5, apenas HCC103, M1 e M4 não apresentaram crescimento em citrato de sódio mesmo após 72 horas de incubação, sendo que ainda permaneceram 96 h e após esse período essas estirpes foram descartadas do trabalho. Já no meio de cultivo contendo acetato de sódio como fonte de carbono, nenhuma das 9 estirpes testadas apresentou crescimento satisfatório.

TABELA 6. Avaliação da produção de EPS pelas estirpes de *H. rubrisubalbicans* após cultivos em meio NFb líquido contendo diferentes fontes de carbono.

FONTE DE CARBONO	ESTIRPE	$D.O._{600}$ final	Carboidratos totais (ppto EtOH) (µg/mL)	Proteínas totais (µg/mL)	Relação CHO:Proteína (µg/µg)
CITRATO DE SÓDIO[a]	AB7	1,505 ± 0,06	185,38 ± 3,75	22,47 ± 0,42	8,25
	BA10	1,442 ± 0,13	179,23 ± 2,54	21,79 ± 0,19	8,22
	BA11	1,498 ± 0,01	263,48 ± 2,24	21,00 ± 0,52	12,55
	BA15	1,518 ± 0,06	202,80 ± 1,30	20,25 ± 0,48	10,01
	BA16	1,550 ± 0,04	237,38 ± 2,57	24,18 ± 0,60	9,82
	BA149	1,560 ± 0,04	127,89 ± 6,27	39,08 ± 4,72	3,27
	HCC103	-	-	-	-
	M1	-	-	-	-
	M4	-	-	-	-
FRUTOSE	AB7	0,542 ± 0,02	33,12 ± 4,12	11,51 ± 0,25	2,88
	BA10	0,841 ± 0,09	33,12 ± 3,58	20,72 ± 0,54	1,60
	BA11	0,695 ± 0,01	39,97 ± 2,38	16,66 ± 0,23	2,40
	BA15	0,668 ± 0,10	56,42 ± 5,20	18,30 ± 0,14	3,08
	BA16	0,812 ± 0,03	24,38 ± 0,83	20,74 ± 0,44	1,18
	BA149	0,783 ± 0,11	32,90 ± 1,79	19,81 ± 0,79	1,66
	HCC103	0,612 ± 0,03	48,06 ± 6,92	20,21 ± 0,49	2,38
	M1	0,922 ± 0,02	69,69 ± 6,90	14,47 ± 0,60	4,82
	M4	0,878 ± 0,03	58,31 ± 6,64	16,37 ± 0,46	3,56

GALACTOSE	AB7	0,468 ± 0,03	33,17 ± 8,28	12,12 ± 0,33	2,74
	BA10	0,272 ± 0,01	22,11 ± 7,05	10,17 ± 0,24	2,17
	BA11	0,280 ± 0,04	30,31 ± 2,18	9,94 ± 0,18	3,05
	BA15	0,221 ± 0,00	110,79 ± 2,40	10,31 ± 0,41	10,74
	BA16	0,237 ± 0,02	98,98 ± 1,54	10,22 ± 0,19	9,68
	BA149	0,221 ± 0,03	86,14 ± 3,91	10,64 ± 0,36	8,10
	HCC103	0,203 ± 0,00	85,11 ± 1,38	10,09 ± 0,17	8,43
	M1	0,982 ± 0,02	74,81 ± 2,36	13,32 ± 0,62	5,62
	M4	0,920 ± 0,08	76,97 ± 1,75	17,04 ± 0,78	4,52
GLICEROL	AB7	0,191 ± 0,04	16,40 ± 0,25	8,64 ± 0,40	1,90
	BA10	0,715 ± 0,03	17,96 ± 0,58	18,06 ± 0,57	0,99
	BA11	0,160 ± 0,01	24,97 ± 2,34	12,85 ± 0,22	1,94
	BA15	0,629 ± 0,02	22,33 ± 3,65	17,84 ± 0,18	1,25
	BA16	0,759 ± 0,04	24,38 ± 1,14	19,57 ± 0,71	1,25
	BA149	0,737 ± 0,03	42,50 ± 2,63	18,40 ± 0,21	2,31
	HCC103	0,730 ± 0,04	36,35 ± 5,91	19,45 ± 0,69	1,87
	M1	0,811 ± 0,10	241,05 ± 7,61	13,83 ± 0,53	17,43
	M4	0,663 ± 0,03	44,98 ± 3,38	13,49 ± 0,39	3,33
GLUCOSE	AB7	0,870 ± 0,02	28,69 ± 1,19	16,50 ± 0,51	1,74
	BA10	0,958 ± 0,01	88,30 ± 1,38	19,47 ± 0,38	4,54
	BA11	0,667 ± 0,02	29,07 ± 5,98	13,62 ± 0,85	2,14
	BA15	0,870 ± 0,01	53,51 ± 5,87	16,67 ± 0,23	3,21
	BA16	0,987 ± 0,02	42,18 ± 5,20	18,62 ± 0,56	2,27
	BA149	0,918 ± 0,02	119,31 ± 3,27	15,03 ± 0,53	7,94
	HCC103	0,883 ± 0,02	56,90 ± 2,39	16,18 ± 0,59	3,52
	M1	0,981 ± 0,01	47,95 ± 1,10	12,53 ± 0,18	3,83
	M4	1,127 ± 0,02	121,36 ± 6,04	16,91 ± 0,24	7,18
MALATO	AB7	1,681 ± 0,15	132,85 ± 1,54	23,96 ± 1,29	5,54
	BA10	1,165 ± 0,11	147,84 ± 1,50	22,23 ± 1,85	6,65
	BA11	1,186 ± 0,12	37,38 ± 2,28	22,24 ± 0,50	1,68
	BA15	0,904 ± 0,02	31,12 ± 1,55	16,74 ± 0,32	1,86
	BA16	0,515 ± 0,07	62,19 ± 3,90	16,48 ± 1,06	3,77
	BA149	1,261 ± 0,05	92,56 ± 4,82	23,97 ± 0,55	3,86
	HCC103	1,407 ± 0,02	89,10 ± 6,40	30,00 ± 0,99	2,97
	M1	1,254 ± 0,15	72,01 ± 1,91	16,40 ± 0,47	4,39
	M4	1,319 ± 0,05	103,18 ± 3,19	18,13 ± 0,62	5,69
MANITOL	AB7	0,535 ± 0,05	25,62 ± 1,24	12,75 ± 0,43	2,01
	BA10	1,021 ± 0,01	43,58 ± 4,42	18,30 ± 0,82	2,38
	BA11	1,089 ± 0,09	26,81 ± 2,83	17,37 ± 0,12	1,54
	BA15	0,834 ± 0,01	26,48 ± 2,90	15,86 ± 0,28	1,67
	BA16	0,970 ± 0,02	28,80 ± 4,74	16,81 ± 0,52	1,71
	BA149	0,965 ± 0,03	35,81 ± 6,40	16,12 ± 0,66	2,22
	HCC103	0,992 ± 0,01	25,08 ± 8,67	17,09 ± 0,50	1,47
	M1	0,993 ± 0,01	75,62 ± 7,20	12,58 ± 0,88	6,01
	M4	0,911 ± 0,02	48,14 ± 1,49	16,98 ± 0,62	2,83

[a]Resultados só puderam ser obtidos após 72h de incubação devido a incapacidade de crescimento bacteriano visualizado por esta fonte de carbono. As estirpes HCC103, M1 e M4 não apresentaram crescimento mesmo após esse período.

Visto que a produção de EPS é uma condição com importante significância nas interações planta-bactéria, compreende-se a importância de aprender a controlar sua produção modificando as condições de crescimento (Serrato *et al*., 2006), pois como abordado anteriormente neste trabalho, é sabido que existem parâmetros de crescimento que afetam a produção de EPS, como por exemplo, a fonte de carbono.

Após realizar o cultivo de todas as estirpes nas fontes de carbono de interesse, os dados obtidos foram analisados e a estirpe M1 foi selecionada como sendo a maior produtora de EPS (CHO:Proteína > 6 µg/µg), especialmente quando crescida na presença de glicerol e manitol. Uma vez que bactérias do gênero *Herbaspirillum* crescem preferencialmente na presença de ácidos orgânicos, também foi selecionada a estirpe M1 crescida na presença de malato para fins de comparação.

Já com a finalidade de obter material suficiente para prosseguir com a caracterização estrutural, foi realizado o crescimento em grande escala da estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 7 e revalidam os resultados anteriores, onde as quantificações tanto de açúcares totais como de proteínas coincidiram, apresentando apenas uma variação ligeiramente pequena, onde torna-se aceitável uma vez que as condições de cultivo em escala podem variar em termos de oxigenação do meio. Também, a estirpe M1 inoculada em glicerol, mais uma vez apresentou valores expressivos na quantificação de açúcares totais (174,54 µg/mL).

TABELA 7. Avaliação da produção em grande escala de EPS pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* cultivados em manitol, malato e glicerol.

Fonte de carbono	D.O.$_{600}$ final	Carboidratos totais (ppt EtOH) (µg/mL)	Proteínas totais (µg/mL)	Relação CHO:Proteína (µg/µg)
Manitol	0,617	81,72	13,07	6,25
Malato	0,500	71,31	13,30	5,36
Glicerol	0,427	174,54	13,72	12,72

4.2 PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Durante o processo de isolamento dos EPS produzidos nos cultivos de grande escala da estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em meio NFb-malato, foi possível observar uma grande quantidade de PHB após o processo de precipitação etanólica, o que não aconteceu quando M1 foi cultivada na presença de glicerol e manitol. Este fenômeno indica que há uma mudança na fisiologia bacteriana, uma vez que a bactéria é capaz de desviar diferentes fontes de carbono para a produção de PHB, em detrimento da biossíntese de EPS. Na figura 5 é possível observar a comparação entre o meio de cultura precipitado por etanol da estirpe crescida em glicerol e em malato. Após diálise e liofilização do material precipitado, a quantidade de EPS recuperado do meio de cultura contendo malato (42,6 mg) foi muito inferior à quantidade obtida quando M1 foi crescida em glicerol (129 mg). O peso seco do PHB recolhido da amostra crescida em malato foi de 35,91 g.

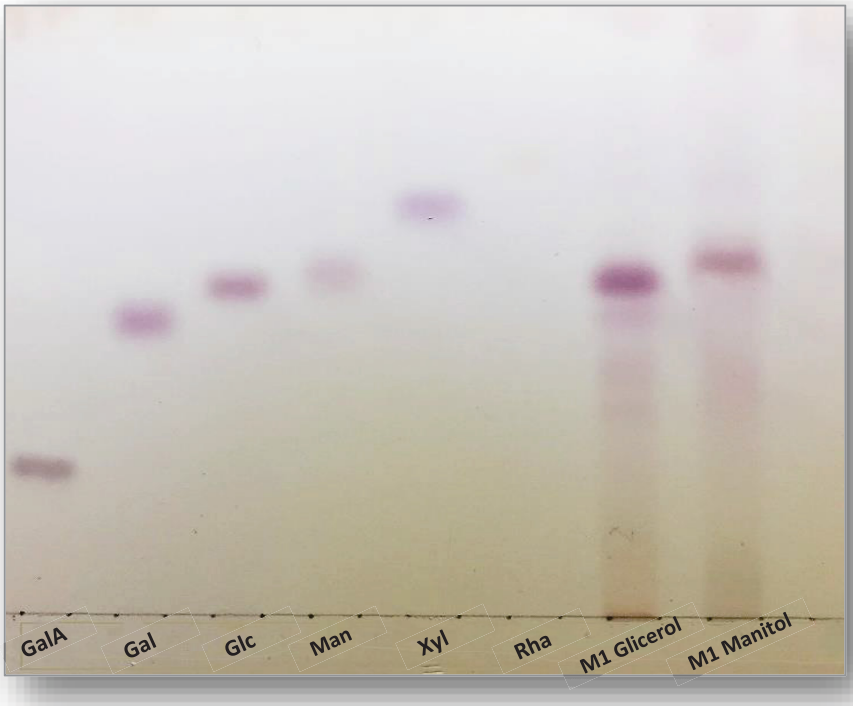
FIGURA 5. Comparativo entre as produções de EPS pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* crescida na presença de glicerol e malato.

FONTE: O autor.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

O material obtido após hidrólise total dos EPS produzidos pela estirpe M1 no cultivo em grande escala foi analisado por cromatografia em camada delgada (Figura 6) a fim de observar a composição monossacarídica dos EPS produzidos pelas diferentes fontes de carbono. Foram utilizadas na cromatoplaca soluções padrão de monossacarídeos (1,0 mg/mL) para que fossem eluídos junto com os hidrolisados. Após a revelação, as bandas observadas corroboram os resultados previamente obtidos na análise dos derivados alditol acetato por GC-MS. Pela comparação dos R_f de cada banda, observou-se que no meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono, pode-se visualizar bandas dos monossacarídeos de glucose e galactose. Também foi possível observar claramente a presença de manose na amostra contendo manitol como fonte de carbono. Já a amostra contendo malato como fonte de carbono não pôde ser visualizada na cromatoplaca, mesmo após serem realizadas várias aplicações, possivelmente pela baixa concentração da amostra.

FIGURA 6. Cromatografia em camada delgada dos EPS obtidos da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* cultivados na presença de glicerol e manitol, após hidrólise total.



Fase móvel: acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v).
Revelador: solução de orcinol (2,5 $g.L^{-1}$) em etanol contendo 5% de H_2SO_4.

O material obtido do sobrenadante dos cultivos em grande escala da estirpe M1, foi submetido à análise da composição monossacarídica. Para isso, a análise foi realizada por derivatização química para formar derivados alditol acetato (AA) e derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA), seguido por análise em GC-MS. Os resultados dos derivados AA são apresentados na tabela 8. A estirpe M1 apresentou um perfil heterogêneo em relação a maioria dos componentes monossacarídicos, quando testada nas duas diferentes fontes de carbono. Como componentes principais, a estirpe M1 apresentou quantidades significativas de Glc em meio contendo glicerol e Man em meio contendo manitol. Mostrou também a presença de Fuc (14%) e Gal (7%) quando cultivada em glicerol e a presença de Ara (2%), Man (67%) e Rha (17%) quando cultivada em manitol. Os resultados da amostra contendo malato como fonte de carbono não foram abordadas nesta tabela, pois o resultado da composição monossacarídica em malato de todas as estirpes foram explanadas na tabela 5.

TABELA 8. Composição monossacarídica dos EPS da estipe M1 de *H. rubrisubalbicans* cultivados em manitol e glicerol.

Fonte de carbono	**Derivados Alditol Acetato[a] (%)**						
	Rha	**Fuc**	**Ara**	**Xyl**	**Man**	**Gal**	**Glc**
Manitol	17,22	-	2,59	0,52	66,98	-	12,66
Glicerol	-	13,64	-	-	-	6,98	79,37

[a] Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise, redução com $NaBH_4$ e acetilação. Os valores para os derivados estão representados em % relativa.

A determinação das ligações glicosídicas dos EPS foi obtida a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA). Os resultados estão compilados na tabela 9 e foram avaliados com base no perfil de fragmentação (dexosi, hexose e hexoses) e tempo de retenção dos padrões. A análise das ligações glicosídicas do EPS da estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, mostraram que os principais derivados PMAA presentes foram 2,3,6-Me_3-Glc (36,75% e 37,25%), 2,3,4-Me_3-Glc (20,24% e 22,88%) e 2,3-Me_2-Glc (21,80% e 30,24%) para manitol e glicerol respectivamente. As duas amostras submetidas a determinação das ligações glicosídicas não apresentaram diferenças significativas, apresentando portanto, os

mesmos perfis de fragmentação e os mesmos tempos de retenção, sugerindo a presença de uma glucana 4,6-ligadas. Esses dados não foram compatíveis com a composição monossacarídica observada anteriormente, provavelmente devido a presença de outros polissacarídeos insolúveis que não foram completamente metilados para as análises de derivados PMAA. Portanto, se faz necessário realizar novas análises para confirmar os dados observados.

TABELA 9. Derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA) de EPS da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* em glicerol e manitol.

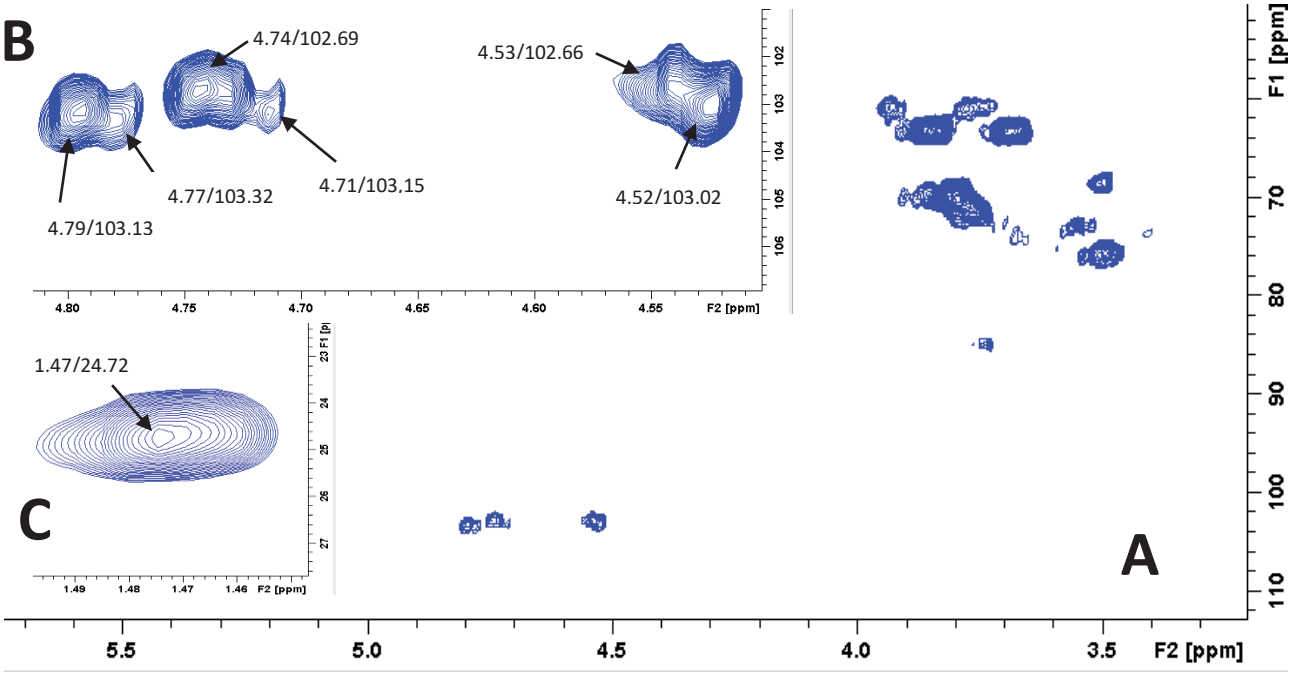
Fonte de carbono	PMAA	$R_{t\ (min)}$	Ligação glicosídica	M%*
Manitol	2,3,6-Me_3-Glc	14,86	→4)-Glc*p*-(1→	36,75
	2,3,4-Me_3-Glc	15,12	→6)-Glc*p*-(1→	20,24
	2,3-Me_2-Glc	16,38	→4,6)-Glc*p*-(1→	21,80
Glicerol	2,3,6-Me_3-Glc	14,87	→4)-Glc*p*-(1→	37,25
	2,3,4-Me_3-Glc	15,13	→6)-Glc*p*-(1→	22,88
	2,3-Me_2-Glc	16,40	→4,6)-Glc*p*-(1→	30,24

*Nesta tabela são abordados apenas os derivados que foram identificados em maior quantidade. Não foi possível determinar os demais derivados presentes.

Essas frações também foram submetidas a análise por RMN. A figura 7 exibe o espectro de HSQC da estirpe M1 cuja fonte de carbono utilizada foi manitol. O espectro de HSQC mostrou sinais na região anomérica (Fig. 7-B) em δ 4,52/103,02; 4,53/102,66; 4,71/103,15; 4,74/102,69; 4,77/103,32; e 4,79/103,13, mostrando que as unidades monossacarídicas encontram-se predominantemente na configuração anomérica β, o que pode explicar em parte a baixa solubilidade do material.

Também foi observado o sinal em δ 1,47/24,72 (Fig. 07-C), atribuído ao C-6 das unidades de rhamnose.

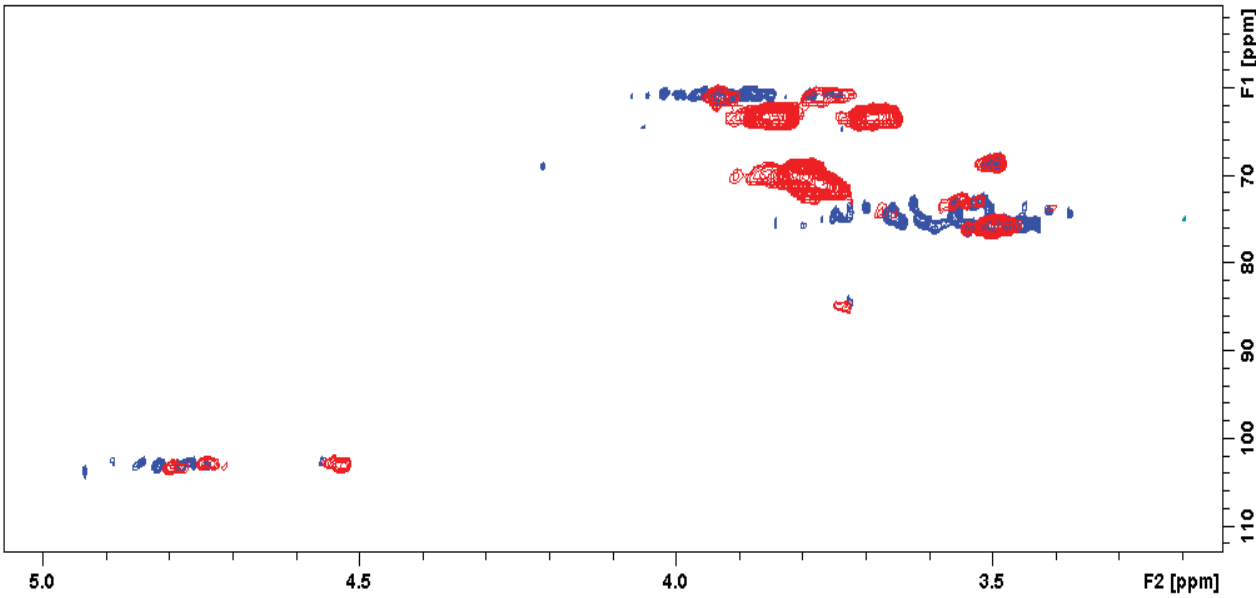
FIGURA 7. Espectro de correlação heteronuclear $^{1}H/^{13}C$ (HSQC) do EPS produzido pela estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* cultivada em manitol como fonte de carbono.



O espectro de HSQC obtido para o EPS produzido por M1 após cultivo com glicerol mostrou-se praticamente idêntico quando comparado com o espectro do EPS cultivado na presença de manitol (Figura 8), com exceção dos sinais atribuídos à rhamnose, que não foram observados. Na região anomérica, também é possível observar uma correlação em 4,74/102,69 que não foi observada na amostra anterior.

Devido aos dados inconclusivos obtidos na análise das ligações glicosídicas através dos derivados PMAA, não foi possível atribuir as correlações observadas à nenhuma unidade monossacarídica até o presente momento.

FIGURA 8. Sobreposição dos espectros de correlação heteronuclear $^{1}H/^{13}C$ (HSQC) da estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* realizando um comparativo entre os espectros contendo glicerol (azul) e manitol (vermelho) como fonte de carbono.



5 CONCLUSÕES

- Através da quantificação de açúcares totais presentes no meio NFb-malato, verificou-se que as estirpes M4, BA15 e BA16 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* se destacaram por obter a maior eficiência de transformação do malato em carboidrato com 181,93 µg/mL, 116,94 µg/mL e 166,56 µg/mL respectivamente.
- No material analisado por cromatografia em camada delgada pode-se observar que Glc é um dos componentes principais de todos os EPS, assim como Gal. Observa-se também, a presença de Rha na amostra da estirpe M1.
- A análise da composição monossacarídica revelou que as amostras apresentaram quantidades significativas de Glc e Gal como componentes principais, exceto pela estirpe M1 que apresentou 4,7% de Gal e mostrou a presença de Xyl (24,2%) e Rha (28,9%) em quantidades muito superiores às demais estirpes analisadas.

- As estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* obtiveram rendimento variado quando cultivadas em diferentes fontes de carbono, indicando que a alteração da fonte de carbono é um importante fator de influência no processo de biossíntese de EPS.
- As estirpes que obtiveram a maior relação carboidrato:proteína foram BA11 e BA15 em citrato de sódio; M1 em frutose, glicerol e manitol; BA15 em galactose; BA149 e M4 em glucose; M4 e BA10 em malato, indicando que as condições e composição do meio de cultivo interferem diretamente na produção de EPS microbiano.
- A estirpe M1 quando cultivada em meio NFb-malato obteve um rendimento de EPS muito inferior (42,6 mg) quando comparada ao cultivo contendo glicerol (129 mg). Indicando assim que acontece um desvio metabólico bacteriano para a utilização do carbono da fonte de carbono na biossíntese de PHB em detrimento à síntese de EPS.
- Através da cromatografia em camada delgada pode ser visualizado bandas dos monossacarídeos de Glc e Gal no meio contendo glicerol, como também é possível visualizar a presença de Man na amostra contendo manitol como fonte de carbono.
- Constata-se através da análise da composição monossacarídica que a estirpe M1 possui quantidades significativas de Glc em meio contendo glicerol e Man em meio contendo manitol. Também, visualiza-se a presença de Fuc (14%) e Gal (7%) em glicerol e Ara (2%), Man (67%) e Rha (17%) em manitol. Apresentando portanto, um perfil heterogêneo.
- Os cromatogramas dos derivados PMAA obtidos dos EPS produzidos pela estirpe M1 cultivada na presença de manitol e glicerol apresentaram-se praticamente idênticos, sendo os principais derivados observados 2,3,6-Me_3-Glc, 2,3,4-Me_3-Glc e 2,3-Me_2-Glc em ambas as amostras, sugerindo a presença de uma glucana com ligações em O-4 e O-6.
- As análises de RMN para os EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* M1 na presença de manitol e glicerol mostraram que ambos são bastante semelhantes, com a exceção dos sinais atribuídos à unidades de Rha no EPS produzido no cultivo com manitol.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. P. S.; AMARAL, F. P.; KIM, D.; BOM, M. T.; GAVÍDIA, M. P.; TEIXEIRA, C. S.; HOLTHMAN, F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; SANTOS, M. M.; STACEY, G. Importance of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) metabolism to the ability of *Herbaspirillum seropedicae* to promote plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 2019.

AUNG, K.; JIANG, Y.; HE, S. Y. The role of water in plant–microbe interactions. **The Plant Journal**, v. 93, p. 771–780, 2018.

BABEL, W.; ACKERMANN, J. U.; BREUER, U. Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB). **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology,** v. 71, p. 125–157, 2001.

BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K.; LIPSKI, A.; HANS-JURGEN, B.; PADUR, L.; WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p. 3197–3203, 2013.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. 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.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

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

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédica:UFRRJ, p. 238, Tese de Doutorado, 1996.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; DE BAURA, V. A.; SASSAKI, G.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 2233-2244, 2010.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C. S.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of Herbaspirillum seropedicae during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343-2356, 2016.

BALSANELLI, E.; TULESKI, T. R.; BAURA, V. A.; YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.

BARRETO, M. C. S; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 17, n. 2-4, p. 221-227, 2011.

BATISTA, M. B.; TEIXEIRA, C. S.; SFEIR, M. Z. T.; ALVES, L. P. S.; VALDAMERI, G.; PEDROSA, F. O.; SASSAKI, G. L.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; SANTOS, M. M. PHB Biosynthesis Counteracts Redox Stress in *Herbaspirillum seropedicae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-12, 2018.

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.

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.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUERÉ, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W. J. Flavonoid-inducible modifications to Rhmnan O Antigens are necessary for *Rhizobium sp*. Strain NGR234-legume symbioses. **Jornal of bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

CARDOSO, L. O. B.; **Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metitotróficas**. Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2017.

CARRO, C.; RIVAS, R.; LEÓN-BARRIOS, M.; GONZÁLEZ-TIRANTE, M.; VELÁZQUEZ, M.; VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov., and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1300-1306, 2012.

CASTELLANE, T. C. L,; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 2014, p. 111-191, 2014.

CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W.; New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, p. 362-372, 2016.

CAVALCANTE, A. H. M.; CARVALHO, L. B.; CUNHA, M. G. C. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea sp*. as a film support for trypsin immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 258–261, 2006.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHEMALY, R. F.; DANTES, R.; SHAH, D. P.; SHAH, P. K.; PASCOE, N.; ARIZA-HEREDIA, E.; PEREGO, C.; NGUYEN, D. B.; NGUYEN, K.; MODARAI, F.; MOULTON-MEISSNER, H.; NOBLE-WANG, J.; TARRAND, J. J.; LIPUMA, J. J.; GUH, A. Y.; MACCANNELL, T.; RAAD, I.; MULANOVICH, V. Cluster and sporadic cases of *Herbaspirillum* species infections in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, p. 48-54, 2015.

CHEN, J.; SU, Z.; LIU, Y.; SANDOGHCHIAN, S.; ZHENG, D.; WANG, S.; XU, H. *Herbaspirillum* Species: A potential pathogenic bacteria isolated from acute lymphoblastic leukemia patient. **Current Microbiology**, p. 331-333, 2011.

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

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

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (Musa spp) and pineapple (Ananas comosus (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DECHO, A. W.; GUTIERREZ, T. Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) in Ocean Systems, **Frontiers in Microbiology,** 2017.

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.

DOBRITSA, 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.

DUBOC, P.; MOLLET, B.; Applications of exopolysaccharides in dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768, 2001.

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

FIGUEIREDO, T. V. B.; CAMPOS, M. I.; SOUSA, L. S.; SILVA, J. R.; DRUZIAN, J. I. Produção e caracterização de polihidroxialcanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2014.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.

GLICK, B. R. Plant growth promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientific article**, p. 1-15, 2012.

HOUGH, L.; JONES, K. N. Chromatography on Paper. In Methods in Carbohydrate Chemistry, Edited by R. L. Whistler and M. L. Wolfrom. New York and London: **Academic Press**, vol. 1, p.21-31, 1962.

IM, W. T.; BAE, H. S.; YOKOTA, A.; LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 54, p. 851–855, 2004.

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

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of Sorghum bicolor L. Moench. **Journal of Experimantal Botany**, v. 48, p. 785-797, 1997.

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

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON Y. Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 69, p. 3244–3250, 2003.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C_4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KOCHARIN, K.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Improved polyhydroxybutyrate production by *Saccharomyces cerevisiae* through the use of the phosphoketolase pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 8, p. 2216- 2224, 2013.

KOSKIMAKI, J. J.; KAJULA, M.; HOKKANEN, J.; IHANTOLA, E. L.; KIM, J. H.; HAUTAJARVI, H. Methyl-esterified 3-hydroxybutyrate oligomers protect bacteria from hydroxyl radicals. **Nature Chemical Biology,** v.12, p. 332–338. 2016.

LAGIER, J. C.; GIMENEZ, G.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. 2012. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, p. 200-209, 2012.

LEIGH, J. A.; COPLIN, D. L. Exopolysaccharides in plant-bacteria interaction. **Annual Review Microbiology**, v. 46, p. 307-346, 1992.

LIU, C.; KWON, M. J.; KIM, M.; BYUN, J.H.; YONG, D.; LEE, K. Septicemia Caused by *Herbaspirillum huttiense* Secondary to Pneumonia. **Annals of laboratory medicine**, 2018.

LIU, S.; CHEN, X.; HE, H.; ZHANG, X.; XIE, B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the artic sea ice bacterium pseudolateromonas sp. Strain SM20310. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 1. p. 224, 2013.

LOPES, A. A.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Quando os micro-organismos salvam vidas. ***Ciência Hoje***, São Paulo, v. 48, n. 286, p. 30-35, 2011.

LOPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J.; NIKEL, P. I.; MENDEZ, B. S. Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. **Advances in Applied Microbiology**, v. 93, p. 73–106, 2015.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A; HUNGRIA, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, p. 3-21, 2013.

MARQUES, A. C.; PALUDO, K. S.; DALLAGASSA, C. B.; SUREK, M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; LIPUMA, J. J.; ZANATA, S. M.; REGO, F. G.; FADELPICHETH, C. M. Biochemical characteristics, adhesion, and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 302-308, 2015.

MENESES, C. H. S. G.; GONÇALVES, T.; ALQUERES, S.; ROUWS, L. F. M.; *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. **Plant and Soil**, DOI 10.1007/s11104-017-3201-5. 2017.

MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogenfixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1448–1458, 2011.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. **International Journal Molecular Sciences**, v. 13, p. 14002-14015, 2012.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 252–263, 2013.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistand sugar cane varieties by the endophitic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1997.

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

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, 2011.

PETERSON, B. W.; HE, Y.; REN, Y.; ZERDOUM, A.; LIBERA, M. R.; SHARMA, P. K.; WINKELHOFF, A. J.; NEUT, D.; STOODLEY, P.; MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, p. 234–245, 2015.

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

POLESE, V.; SOARES, C. P.; SILVA, P. R. A.; SIMÕES-ARAUJO, J. L.; BALDANI, J. I.; VIDAL, M. S. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR indicates that juice of sugarcane varieties modulate the expression of C metabolism genes in the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum rubrisubalbicans* strain HCC103. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 1555–1568, 2017.

POTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly (3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 552-560, 2005.

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GÖTTFERT, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about bacteria plant interactions? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 137-47, 2004.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N.; Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1183-1191, 2012.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 15–33, 2003.

RIBEIRO, V. A.; TEIXEIRA, M.; BURKERT, C. A. V.; Cultivo de bactérias utilizando glicerina residual para obtenção de exopolissacarídeos, **Conference: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, v. 1, n. 2, p. 1530-1536, 2015.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 56, p. 1341–1348, 2006.

SACOMBOIO, E. N. M. Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e mutante ntrC em diferentes fontes de carbono e relações carbono/nitrogênio. **Dissertação de mestrado** (Mestrado em Ciências – Bioquímica), 2014.

SACOMBOIO, E. N. M.; KIM, E. Y. S.; CORREA, H. L. R.; BONATO, P.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E. M. The transcriptional regulator NtrC controls glucose6-phosphate dehydrogenase expression and polyhydroxybutyrate synthesis through NADPH availability in *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 13546, 2017.

SANTOS, J. F.; SACRAMENTO, B. L.; MOTA, K. N. A. B.; SOUZA, J. T.; NETO, A. D. A. Sunflower growth according to seed inoculation with endophytic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 44, n. 2, p. 142-150, 2014.

SANTOS, L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Production and use of exopolysaccharids: Levan polysaccharide and the moderate permission potential of drugs. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 4, n. 2, p. 254-270, 2011.

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

SCHMIDT, M. A.; BALSANELLI, E.; FAORO, H. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Gramineae. **BMC Microbiology**, v. 12: DOI 10.1186/1471-2180-12-98, 2012.

SERRATO, R. V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas**. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

SHAH, A. K.; ASHTAPUTRE, A. A. Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 for application in oil exploration. **Journal of Industrial Microbiology,** v. 23, p. 442-445, 1999.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. **Bioresource Technology,** v. 102, p. 26-34, 2011.

SINGH, R. K.; MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (Zea mays L.). **Bioscience**, v. 5, p. 8-14, 2013.

SPILKER, T. Recovery of *Herbaspirillum* Species from Persons with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2774-2777, 2008.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bactéria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia,** v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. **Biomaterials: novel materials from biological sources**, p. 124-213, 1991.

STEINBUCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology,** v. 71, p. 81–123, 2001.

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, n. 5, p. 277-279, 2005.

TAN, Z.Q.; MEN, R.; ZHANG, R.Y.; HUANG, Z. First Report of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* Causing Mottled Stripe Disease on Sugarcane in China. **The American Phytopathological Society**, v. 94, p. 379, 2010.

TARIQ, M.; HAMEED, S.; KHAN, H. U.; MUNIR, M. I.; NUSHIN, F.; JAMIL, S.; NAWAZ, S.; ZAFAR, M. Role of Microsymbionts in Plant Microbe Symbiosis. **Journal of Applied Microbiology and Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 1-5, 2017.

UCHINO, K.; SAITO, T.; GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme a (COA) and degradation of PHB to Acetyl-coa. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 8250-8256, 2007.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.-M. *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, 2003.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). Methods in carbohydrate chemistry 2. New York: **Academic Press**, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L. (Ed.). Methods in carbohydrate chemistry 2. New York: **Academic Press**, p. 65-68, 1963a.

XIA, Y.; DEBOLT, S.; DREYER, J.; SCOTT, D.; WILLIANS, M. A. Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. **Frontiers Plant Science**, v. 6, p. 490, 2015.

XIE, P.; HAO, X.; MOHAMAD, O. A.; LIANG, J.; WEI, G. I. Comparative study of chromium biosorption by *Mesorhizobium amorphae* strain CCNWGS0123 in single and binary mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 570– 587, 2013.

XU, G.; CHANG, J.; XUE, H.; GUO, M.; CHUN-GEN, P.; LI, Y. *Herbaspirillum piri* sp. nov., isolated from bark of a pear tree. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 3652–3656, 2018.

ZHOU, X.; Hong, T.; YU, Q.; NIE, S.; GONG, D.; XIONG, T.; XIE, M. Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 induce c-Jun dependent Fas/Faslmediated apoptosis via TLR2 in mouse intestinal epithelial cancer cells. **Scientific Reports**. v. 7, 2017.