

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PHILIPPE RODRIGUES BENEDETTI

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE LIPOPOLISSACARÍDEOS
PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO *Herbaspirillum*

CURITIBA

2020

PHILIPPE RODRIGUES BENEDETTI

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE LIPOPOLISSACARÍDEOS
PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO *Herbaspirillum*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica) ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, *Campus* Politécnico, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato

Coorientador: Dr. Eduardo Balsanelli

CURITIBA

2020

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

Benedetti, Philippe Rodrigues.

Caracterização estrutural de lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*. / Philippe Rodrigues Benedetti. – Curitiba, 2020.

78 f. : il.

Orientador: Rodrigo Vassoler Serrato.

Coorientador: Eduardo Balsanelli.

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

1.Lipopolissacarídeos. 2.Herbaspirillum. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Bactérias diazotróficas. 5. Plantas I. Título. II. Serrato, Rodrigo Vassoler. III. Balsanelli, Eduardo. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.545



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
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 **PHILIPPE RODRIGUES BENEDETTI** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE LIPOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO *Herbaspirillum***, sob orientação do Prof. Dr. RODRIGO VASSOLER SERRATO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAO 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, 27 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 17:44:50.0

RODRIGO VASSOLER SERRATO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 17:46:10.0

ADRIANO GONÇALVES VIANA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

27/03/2020 17:43:43.0

THALES RICARDO CIPRIANI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho ao meu pai.

Obrigado por tudo, você é meu exemplo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio durante esta etapa. Obrigado família pelo apoio e compreensão pela ausência durante vários momentos.

Agradeço ao meu orientador, Prof^o Dr. Rodrigo Vassoler, pela oportunidade de trabalhar nesta linha pesquisa e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço ao Prof^o. Dr. Fábio Seiva, meu orientador durante a graduação e amigo, pelo incentivo para prosseguir com a carreira acadêmica e pelo exemplo profissional.

Agradeço aos Técnicos do Departamento de Bioquímica envolvidos de alguma forma em etapas deste trabalho, D. Rose, Bruna, Arquimedes, Rosane e Flávia. Também estendo os agradecimentos ao Departamento de Química, ao Prof. Dr. Bruno José e ao Técnico Thiago por todo tempo e dedicação na realização das análises de GC-MS.

Aos amigos do Grupo de Carboidratos, Giuliana, Alinne, Shayane, Iglesias, Vanessa, Jéssica, Pedro, André, Wellington, Matheus, Maria e Carina (desculpe se esqueci alguém) meus sinceros agradecimentos por todo o apoio, por todo tempo ouvindo reclamações, pelos momentos de distrações e risadas, vocês são feras.

Agradeço aos amigos que iniciaram comigo o mestrado, André, Eduardo e Fernanda. Obrigado pela companhia nas disciplinas e pelos bons momentos.

Aos amigos de longa data, Lara, Ana Catarina, Marlon, Catarine, Luana, Guilherme e tantos outros que fizeram parte da minha trajetória até este momento, obrigado por participarem desta caminhada. Sempre lembro de vocês com muito carinho.

José, muito obrigado pelo incentivo e pelo apoio durante este trabalho e também em diversas outras etapas da minha vida. Obrigado por todos os conselhos e abraços nos momentos difíceis, eles foram amenizados com seu apoio.

Agradeço aos professores da Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) pelos ensinamentos transmitidos, à Coordenação e Secretaria pela dedicação ao Programa.

Agradeço a todos aqueles que contribuem para o desenvolvimento da Ciência, que se esforçam e se dedicam, principalmente em momentos obscuros. Obrigado a todos, do passado, que quebraram barreiras e aqueles do presente, que enfrentam com cabeça erguida as insanidades contra o desenvolvimento da Ciência.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, e a Universidade Federal do Paraná por toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Obrigado!

Eu estava esperando por você, Obi-wan. Finalmente, nós nos encontramos de novo. O círculo está agora completo. Quando o deixei, eu era só o aprendiz; agora eu sou o mestre.

Darth Vader, Star Wars Episódio IV: Uma Nova Esperança (1977).

RESUMO

As projeções de crescimento populacional nas próximas décadas fazem presente o debate sobre a incapacidade de atender as necessidades por alimentos. O aumento da produção de alimentos é resultado do uso, muitas vezes excessivo, de fertilizantes químicos, proporcionando danos ambientais. Uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados é a utilização da fixação biológica de nitrogênio. A fixação de N_2 *in planta* depende inicialmente de um processo de colonização eficiente, e durante todos os passos do processo, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende de diversas biomoléculas, dentre elas os lipopolissacarídeos (LPS), que possuem estrutura complexa e são encontrados exclusivamente em bactérias gram-negativas. Estes glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente distintas: a porção lipídeo-A; o núcleo oligossacarídico; e o *O*-antígeno, e podem apresentar significativas diferenças estruturais em bactérias, mesmo dentro de uma mesma classe, ou nas regiões estruturalmente mais conservadas entre classes distintas. A porção *O*-antigênica apresenta a maior variabilidade estrutural em sua composição, sendo essa porção a mais importante no processo de interação. Sua elucidação estrutural é fundamental para se obter um maior entendimento deste processo. Neste trabalho foram extraídos LPS das diferentes espécies de *Herbaspirillum* a partir da fração aquosa, indicando que se tratam de LPS do tipo “smooth”. Além disso, a composição monossacarídica desses LPS apresentou uma grande variabilidade intra- e inter-espécies, porém, unidades de Rha, Man, Gal e Glc, foram observadas em todas as espécies estudadas. A mesma variabilidade estrutural é observada na composição de ácidos graxos nas porções lipídeo-A das diferentes espécies. As análises químicas e espectroscópicas mais aprofundadas do LPS extraído de *H. rubrisubalbicans* M1, mostraram que a composição monossacarídica desta molécula é formada majoritariamente por Rha, Man e Glc, corroborando resultados anteriormente descritos na literatura; e análises de metilação e RMN sugerem que a porção *O*-polissacarídica possui uma cadeia principal formada por unidades de β -Rhap 2-*O* e 3-*O* substituídas, bem como de β -Manp 4-*O*-substituídas. Também se observa para este *O*-polissacarídeo a presença de outras ligações glicosídicas em menor proporção, tal como unidades de 6-*O*-Gal, e ramificações em unidades de Rha (2,3-*O*-Rhap), Gal (3,6-*O*-Galp), Glc (4,6-*O*-Glc) e Man (4,6-*O*-Manp).

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

ABSTRACT

Projections of population growth in the coming decades bring the debate about the inability to meet food needs. The increase in food production is the result of the use, often excessive, of chemical fertilizers, causing environmental damage. An alternative to the use of chemical nitrogen fertilizers is the use of biological nitrogen fixation. The fixation of N in planta depends initially on an efficient colonization process, and during all the steps of the process, the communication of the bacteria with the host depends on several biomolecules, among them lipopolysaccharides (LPS), which have a complex structure and are found exclusively in gram-negative bacteria. These glycoconjugates are formed by three structurally distinct regions: the lipid-A portion; the oligosaccharide nucleus; and the *O*-antigen, and can present significant structural changes in bacteria, even within the same class, or in the structurally more conserved regions between different classes. The *O*-antigenic portion has the greatest structural variability in its composition, this portion being the most important in the interaction process, its structural elucidation is fundamental to obtain a better understanding of this process. The LPS extracted from the different species of *Herbaspirillum* were obtained in the aqueous fraction, indicating that they are LPS of the “smooth” type. In addition, the monosaccharide composition showed great intra- and inter-species variability, however, units of Rha, Man, Gal and Glc, are observed in all studied species. The same structural variability is observed in the composition of fatty acids in the lipid-A portions of the different species. Further chemical and spectroscopic analyzes of the LPS extracted from *H. rubrisubalbicans* M1, showed that the monosaccharide composition of this molecule is formed mainly by Rha, Man and Glc, corroborating results previously described in the literature; and methylation and NMR analyzes suggest that the *O*-polysaccharide moiety has a backbone formed by substituted β -Rhap 2-*O* and 3-*O* units, as well as 4-*O*-substituted β -Manp. Also observed for this *O*-polysaccharide the presence of other glycosidic bonds to a lesser extent, such as 6-*O*-Gal units, and branches in units of Rha (2,3-*O*-Rhap), Gal (3,6-*O*-Galp), Glc 4,6-*O*-Glc p) and Man (4,6-*O*-Manp).

Key-words: Lipopolysaccharide. *Herbaspirillum*. Biological Nitrogen Fixation. Diazotrophic bacteria. Plant-Bacteria interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS DE <i>H. seropedicae</i> CULTIVADAS EM ÁGAR NUTRIENTE	25
FIGURA 2 – ESTRUTURA GERAL DOS PEPTIDEOGLICANOS	28
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS	29
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	30
FIGURA 5 – MODELO DAS MEMBRANAS INTERNA E EXTERNA DE <i>Escherichia coli</i> K-12	30
FIGURA 6 – ESTRUTURA DO LIPÍDEO-A E DO NÚCLEO DO LPS DE <i>E. coli</i> , ESTIRPE K-12	32
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA ESTRUTURA LIPOPOLISSACARÍDICA	33
FIGURA 8 – ESTRUTURA DO LPS COMPLETO (LPS I) DE <i>Rhizobium etli</i> CE3	35
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DE ETAPAS (TRATAMENTO ENZIMÁTICO, DIÁLISE, HIDRÓLISE BRANDA - HB, PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA PARA OBTENÇÃO DO LPS HIDROLISADO (O-ANTÍGENO E LIPÍDEO-A) DA ESTIRME M1 DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	44
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS INICIAIS DO TRABALHO	48
FIGURA 11 – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NOS LPS EXTRAÍDOS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	57
FIGURA 12 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) DOS LPS EXTRAÍDOS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, ANTES DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO (AQ - AZUL) E APÓS O TRATAMENTO (AQ - T - VERMELHO)	58
FIGURA 13 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) DOS LPS EXTRAÍDOS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, DA PORÇÃO SbnEt Sbn-HB DA FRAÇÃO AQ-T RETIDA	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CHAVE TAXONÔMICA DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i>	22
TABELA 2 – ESPÉCIES E ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> UTILIZADAS NESTE TRABALHO	40
TABELA 3 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DOS LPS DE <i>Herbaspirillum</i> spp. EXTRAÍDOS NA FRAÇÃO AQUOSA	49
TABELA 4 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DOS LPS DE <i>Herbaspirillum</i> spp. EXTRAÍDOS NA FRAÇÃO FENÓLICA	50
TABELA 5 – ÁCIDOS GRAXOS METIL ESTERIFICADOS DA PORÇÃO LIPÍDEO-A DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> spp. ..	52
TABELA 6 – RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES EM GRANDE ESCALA DE LPS DAS FRAÇÕES AQUOSAS (AQ) E FENÓLICAS (FE) DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i>	54
TABELA 7 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DOS LPS DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> EXTRAÍDOS NAS FRAÇÕES AQUOSA (AQ) E FENÓLICA (FE) APÓS TRATAMENTO COM DNase, RNase E PROK	55
TABELA 8 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DAS FRAÇÕES RETIDA E ELUÍDA APÓS DIÁLISE DA FRAÇÃO AQUOSA TRATADA (AQ – T) DOS LPS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	59
TABELA 9 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO RETIDA EM DIÁLISE (AQ-T Retida) OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LPS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	60
TABELA 10 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO ELUÍDA EM DIÁLISE (AQ-T Eluída) OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LPS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	60
TABELA 11 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DAS PORÇÕES O-ANTÍGENO OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE BRANDA DOS LPS EXTRAÍDOS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, SEGUIDAS DE PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA	61
TABELA 12 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T ELUÍDA PRECIPITADA APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T ELUÍDA PptEt Sbn-HB)	62

TABELA 13 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T ELUÍDA SOBRENADANTE APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T ELUÍDA SbnEt Sbn-HB)	63
TABELA 14 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T RETIDA PRECIPITADA APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T RETIDA PptEt Sbn-HB)	63
TABELA 15 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T RETIDA SOBRENADANTE APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T RETIDA SbnEt Sbn-HB)	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α – Alfa;

β – Beta;

γ – Gama;

δ – Delta (Deslocamento Químico);

ηm – Nanômetro;

μg – Micrograma;

% – Porcentagem;

μL – Microlitro;

μm – Micrômetro;

^{15}N – Isótopo de Nitrogênio;

AA – Alditol Acetato;

Ac_2O – Anidrido Acético;

AGs – Ácidos Graxos;

Ala – Alanina;

AQ – Aquoso;

Ara – Arabinose;

ATP – Adenosina Trifosfato;

BacNAc – 4-acetamido-2-amino-2,4,6-trideoxi-D-glucose;

C – Citosina;

CCD – Cromatografia de Camada Delgada;

D – Série Estereoquímica D;

d.i. – Diâmetro Interno;

D.O.₆₀₀ – Densidade Óptica em 600 nanômetros;

D_2O – Óxido de Deutério;

Da – Dalton;

Dha – Ácido 3-deoxi-D-lixo-hept-2-ulosárico;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DNase – Desoxirribonuclease;

DOC – Ácido Desoxicólico;

e^- – Elétron;

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
EPS – Exopolissacarídeo;
Et – Etanólico;
eV – Elétron-volt;
f – Furanosídico;
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;
FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio;
FE – Fenólico;
Fuc – Fucose;
G – Guanina;
Gal – Galactose;
GalA – Ácido galacturônico;
GalNAc – N-acetilgalactosamina;
galU – Gene que Impede a Ligação da Porção *O*-antígeno ao Núcleo Externo
GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas;
Glc – Glucose;
GlcA – Ácido glucurônico;
GlcN – Glucosamina;
GlcNAc – N-Acetilglucosamina;
GlcNato – 2-amino-2-deoxigluconato;
Glu – Ácido glutâmico;
H⁺ – Próton;
HB – Hidrólise Branca;
Hep – Heptose;
HSQC – Correlação Quântica Única Heteronuclear;
Imp/RlpB – Transportador que desloca LPS;
KDa – Quilodalton;
Kdo – Ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico;
Ko – Ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosônico;
KPS – Polissacarídeos Capsulares;
L – Série Estereoquímica L
LCO – Lipoquitoligossacarídeos;

LPS – Lipopolissacarídeo;

LptA – Proteína Periplasmática;

LptB – Proteína Auxiliadoras no Direcionamento da Molécula de LPS;

M – Molar;

m/z – Massa/carga;

MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*;

Man – Manose;

ManNAc – N-acetilmanosamina;

m-DAP – Ácido meso-Diaminopimérico;

Mg – Magnésio;

MHz – Mega-hertz;

MJ/Kg – Megajoule por Quilograma

mm – Milímetro;

mM – Milimolar;

mol% – Mol por cento;

MsbA – Proteína Necessária para o Deslocamento do Lipídeo-A na Membrana;

MurNAc – N-Acilmurâmico;

NFb – Meio de Cultivo;

nifD – Gene da Proteína Nitrogenase Mo-Fe alfa;

Nod – Fatores de Nodulação;

p – Piranosídico;

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida;

PBS – Tampão Fosfato Salino;

pEtN – Fosfoetanolamina;

pH – Potencial Hidrogeniônico;

Pi – Fosfato Inorgânico;

PMAA – Alditol Acetato Parcialmente Metilado;

PP – Pirofosfato;

ppm – Partes por Milhão;

Ppt – Precipitado;

PROK – Proteinase K;

QuiNAc – N-acetilquinosamina;

R – *Rough*;

Rt – Tempo de Retenção;

rfbB – Gene Relacionado à Biossíntese de Rha;

rfbC – Gene Relacionado à Biossíntese de Rha;

Rha – Ramnose;

Rib – Ribose;

rmlC – Gene Responsável Por Um Passo da Biossíntese de UDP-Rha

RMN – Ressonância Magnética Nuclear;

RNA – Ácido Ribonucleico;

RNase – Ribonuclease;

rpm – Rotações por Minuto;

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico;

S – *Smooth*;

Sbn – Sobrenadante;

SR – *Semirough*;

SSP – Sistemas de Secreção de Proteínas;

t – Terminal;

t – Tonelada;

T – Tratado;

TFA – Ácido Trifluoroacético;

T_m – Temperatura de Melting;

TRIS – Aminometilidenotrimetanol;

UDP – Uridina Difosfato;

Und – Ácido Graxo Undecaprenil;

v/v – Volume por Volume;

WGA – Aglutinina de Germe de Trigo;

wss – Genes da Via de Síntese e Degradação da Celulose;

Wzx – Antígeno-O flipase;

Wzy – Antígeno-O polimerase;

Xyl – Xilose;

YerA – Yersiniose;

YrbK – Proteína Auxiliadora no Direcionamento da Molécula de LPS;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.2	OBJETIVOS	15
1.2.1	Objetivo Geral	15
1.2.2	Objetivos Específicos	16
1.3	JUSTIFICATIVA	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS	17
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	19
2.2.1	Diazotrofos Associativos	20
2.3	GÊNERO <i>Herbaspirillum</i>	21
2.3.1	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	22
2.3.2	<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	23
2.3.3	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	23
2.3.4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	24
2.4	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	25
2.5	PAREDE CELULAR BACTERIANA	27
2.6	LIPOPOLISSACARÍDEOS	30
2.6.1	Estrutura dos LPS	30
2.6.2	Estrutura dos LPS em Diazotrófos	34
2.6.3	Os LPS na Interação Planta-Bactéria	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	40
3.2	CULTIVO BACTERIANO	41
3.2.1	Meio de Cultura	41
3.2.2	Condições de Crescimento	41
3.3	EXTRAÇÃO DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS	41
3.3.1	Extração em Pequena Escala	41
3.3.2	Extração em Grande Escala	42
3.3.3	Micro-extração do Lipídeo-A	42
3.4	PURIFICAÇÃO DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS	43
3.4.1	Tratamento Enzimático	43

3.4.2	Precipitação Etanólica	43
3.5	MÉTODOS QUÍMICOS	43
3.5.1	Hidrólise Branda (HB)	43
3.5.2	Derivados Alditol Acetato (AA)	44
3.5.3	Derivados Alditol Acetato Parcialmente Metilados (PMAA)	45
3.5.4	Derivados Metil Ésteres de Ácidos Graxos (FAME)	45
3.6	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	46
3.6.1	Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	46
3.6.2	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	46
3.7	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	RESULTADOS DA EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA	48
4.2	RESULTADOS DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA	53
4.2.1	Caracterização Química e Estrutural do LPS da estirpe M1 de <i>H. rubrisubalbicans</i>	56
5	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Plantas não leguminosas fornecem alimentos básicos para bilhões de pessoas, e o aumento exponencial da população mundial indica a necessidade de se aumentar a produção agrícola (BHATTACHARJEE *et al.*, 2008). O aumento da produção é resultado do uso, muitas vezes excessivo, de fertilizantes químicos, sendo a fertilização nitrogenada em culturas de não leguminosas um dos insumos mais caros da agricultura. Ainda, aproximadamente 65% do nitrogênio (N) aplicado é perdido do sistema solo-planta através de volatilização, erosão e lixiviação, podendo trazer danos ambientais como a poluição por nitrato de águas (REJESUS e HORNBAKER, 1999), além do alto custo energético requerido para a produção de fertilizantes químicos. Uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados é a utilização da fixação biológica de nitrogênio (WU *et al.*, 1995). Um inoculante eficiente estimula o crescimento vegetal não apenas como consequência da fixação biológica de nitrogênio, mas também pela produção de fitohormônios, controle direto e indireto de patógenos e pelo aumento da disponibilidade de minerais (MONTEIRO *et al.*, 2008; BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Entre as várias bactérias com potencial uso como biofertilizantes, aquelas com capacidade de desenvolver populações endofíticas são foco de crescente interesse, pois ocupam nichos da planta, como os vasos condutores, onde têm acesso direto aos nutrientes, fontes de carbono e condições ideais para fixação de nitrogênio, estando protegidas do excesso de oxigênio (SANTI *et al.*, 2013), essas circunstâncias viabilizam uma expressiva eficiência em relação aos microrganismos epifíticos ou de vida livre. As bactérias fixadoras reduzem o N₂ atmosférico, uma forma não reativa e não assimilável pelas plantas, em amônia, que é facilmente metabolizada, reação esta catalisada pela enzima nitrogenase, sensível ao oxigênio (BHATTACHARJEE *et al.*, 2008).

O estímulo efetivo do crescimento vegetal e a fixação de nitrogênio *in planta* dependem inicialmente de um processo de colonização eficiente. Entretanto, os mecanismos da colonização endofítica em bactérias associativas ainda não são claramente compreendidos, devido à dispersão da bactéria por toda a planta (BALSANELLI, 2013). Durante todos os passos do processo de adesão e colonização, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende de diversas biomoléculas, dentre elas os exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos capsulares, sistemas de secreção de proteínas e lipopolissacarídeos

(LPS) (MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006). LPS são moléculas de estrutura extremamente complexa, encontrados exclusivamente na monocamada externa da membrana externa das bactérias gram-negativas, onde, por sua vez, representam aproximadamente 60% do peso seco desta camada e cerca de 1% do peso seco total da bactéria (COLLINS e FERRIER, 1995). Esse volume expressivo dos LPS na superfície celular, unido a sua característica anfipática, impõe uma grande importância na interação com o microambiente e na competição direta com outros microrganismos (MORRISON e LEIVE, 1975).

Estes glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente e geneticamente distintas: a porção chamada de lipídeo-A; o núcleo oligossacarídico; e a região externa ou *O*-antígeno (SUTHERLAND, 1985). O lipídeo-A é a porção lipofílica do LPS, responsável por ancorar toda a estrutura à membrana externa da bactéria, sendo a região estruturalmente mais conservada entre as diferentes classes de bactérias (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). A ligação entre o lipídeo-A e a porção hidrofílica dos LPS é realizada quase sempre por uma unidade de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo) (RAETZ e WHITFIELD, 2002). O núcleo do LPS pode ser dividido em dois domínios, interno e externo; no interno, além das unidades de Kdo que fazem a ligação com o lipídeo-A, é comum encontrar unidades de heptose; o núcleo externo consiste geralmente de hexoses (RAETZ, 1990). Dentro de um gênero ou família, a estrutura do núcleo interno tende a ser conservada, e o fato de que bactérias distantemente relacionadas compartilham características estruturais é um reflexo da importância do núcleo na integridade da membrana externa (RAETZ e WHITFIELD, 2002). A porção *O*-antígeno geralmente é constituída de unidades oligossacarídicas repetitivas, os diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com massas moleculares diferentes, fenômeno facilmente observado pelo padrão de bandas na análise eletroforética dos LPS (ERRIDGE *et al.*, 2002).

Os LPS podem apresentar significativas diferenças estruturais nos diversos tipos de bactérias, mesmo dentro de uma mesma classe, ou mesmo nas regiões estruturalmente mais conservadas entre classes distintas, como na porção lipídeo-A, conforme descrito por Zähringer *et al.* (1999). O núcleo externo do LPS de bactérias diazotróficas regularmente possui monossacarídeos expectáveis, como a Rha (ramnose), de acordo com Raetz (1990), no entanto, é comum observar a presença de muitos outros. Dessa forma, é algo variável que pode ser determinado para inúmeras estirpes. Além das variações encontradas na fração interna, a porção *O*-antigênica apresenta a maior variabilidade estrutural e modificações nas suas unidades oligossacarídicas repetitivas, segundo Erridge *et al.*

(2002), sendo essa porção a mais importante nos LPS durante os processos de interação, sendo, portanto, sua elucidação estrutural fundamental para obter um maior entendimento deste processo.

A importância dos LPS na comunicação planta-bactéria já foi demonstrada para algumas espécies, tais como *Pseudomonas solanacearum* (SEQUEIRA, 1995), *Erwinia amylovora* (LEIGH e COPLIN, 1992), *E. stewartii* (METZGER *et al.*, 1994), *P. syringae* (OVOD *et al.*, 1995) e *Xantomonas campestris* (KINGSLEY *et al.*, 1993), *Agrobacterium tumefaciens* (WEIBGEN *et al.*, 1993; PUEPPKE, 1984), etc. Entretanto, o papel exato dessas moléculas no processo de interação ainda não é completamente conhecido (DENNY, 1995). As cadeias polissacarídicas de composição e estrutura variáveis projetam-se a partir da membrana externa da bactéria para o meio, constituindo a superfície molecular que realiza o primeiro contato com o hospedeiro, e devido a esta característica, os LPS exercem uma importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular (KANNENBERG *et al.*, 1998). Embora alguns LPS de algumas espécies são relacionados ao processo de infecção e colonização de hospedeiros vegetais, existem várias lacunas no processo que são pouco compreendidas e requerem mais investigação (SERRATO, 2014). Logo, a ampliação dos conhecimentos acerca destas moléculas, presentes em diversas bactérias com potencial fixador de nitrogênio, é fundamental para esclarecer etapas envolvidas na comunicação planta-bactéria e a concretização de uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos. Além do mais, os LPS de bactérias diazotróficas que se associam a gramíneas de interesse econômico, como as do gênero *Herbaspirillum*, são pouco estudados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral abordado neste trabalho foi avaliar a composição química e a estrutura de moléculas de LPS, tendo como objetos de estudo diferentes estirpes dos *Herbaspirillum spp.*, *Herbaspirillum autotrophicum*, *Herbaspirillum lusitanum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Herbaspirillum seropedicae*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Cultivo bacteriano em pequena escala das diferentes estirpes de *Herbaspirillum* e extração dos LPS e Lipídeo-A;
- Purificação dos LPS extraídos por tratamentos enzimáticos e diálise;
- Determinação da composição monossacarídica dos LPS isolados e da composição de ácidos graxos das frações Lipídeo-A de cada estirpe analisada;
- Cultivo bacteriano em grande escala da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*, selecionadas para extração dos LPS em maior quantidade;
- Fracionamento das porções O-Antigênica e Lipídeo-A dos LPS de *H. rubrisubalbicans* estirpe M1 através de hidrólise branda;
- Caracterizações químicas e estruturais da porção polissacarídica do LPS da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* por métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

1.2 JUSTIFICATIVA

O fenômeno de fixação biológica de nitrogênio é observado tanto em processos simbióticos quanto na associação de bactérias diazotróficas. A interação desses diazotrofos com seus hospedeiros é dependente de uma complexa comunicação molecular planta-bactéria, onde os LPS têm papéis específicos em cada estágio do processo simbiótico, que é extensivamente conhecido e estudado para bactérias do gênero *Rhizobium*. Por outro lado, os diazotrofos associativos endofíticos, dentre os quais encontram-se algumas espécies do gênero *Herbaspirillum*, não formam nenhum tipo de estrutura especializada nas plantas (nódulos), tal qual ocorre com diazotrofos simbióticos, e a fixação de nitrogênio ocorre dentro dos tecidos vegetais. Nestes casos, os mecanismos de comunicação planta-bactéria ainda não são completamente compreendidos, mas especula-se que o LPS bacteriano seja fundamental nesse processo. Dessa maneira, é oportuno o estudo e a caracterização dos LPS da superfície celular de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, diazotrofos que se associam com plantas de interesse econômico e que possuem papéis fundamentais na alimentação mundial, isso que propiciará dados que colaborarão com a pesquisa acerca da comunicação planta-bactéria e uma melhor compreensão da finalidade do LPS nesse mecanismo de interação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS

As projeções de crescimento populacional, do aumento do consumo per capita, da expansão das cidades e das restrições no uso de terra cultivável nas próximas décadas fazem mais presente o debate sobre a incapacidade de atender às necessidades humanas por alimentos e combustíveis renováveis. As projeções indicam crescimento acelerado e contínuo nas próximas décadas, o que deve elevar a demanda de alimentos em geral (SAATH e FACHINELLO, 2018). De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) (2012), a população mundial em 2024 será superior a 8 bilhões de pessoas e, em 2050, superior a 9,5 bilhões. Tais números representam crescimento de 13,16% de 2012 a 2024 e de 34,90% entre 2012 e 2050.

De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a disponibilidade de áreas agrícolas está centrada em poucos países; cerca de 90% das terras para a expansão agrícola estão na América Latina e África-Subsaariana (FAO, 2013). Além disso, países como China e EUA não possuem mais novas áreas para expandir a produção agrícola. Diante das restrições sobre a expansão do uso de terra para uso agropecuário no Brasil, a ampliação da produtividade se apresenta como um caminho necessário para a ampliação da oferta de alimentos (SAATH e FACHINELLO, 2018). Para as próximas décadas, o aumento da produtividade também enfrenta importantes restrições, pois segundo a FAO (2009), o modelo tecnológico atual está esgotado e observa-se redução nas taxas de crescimento da produtividade das principais lavouras nas últimas décadas, em razão de que muitos métodos utilizados já estão maximizados e perfeitamente adaptados para as principais culturas. Em vista disso, a busca por novas tecnologias é o elemento essencial para a retomada da expansão produtiva.

A produção de grãos do Brasil deve alcançar 239,6 milhões de toneladas para a safra 2019/2020, de acordo com o 8º Levantamento da Safra de Grãos 2018/2019, divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), sendo que a colheita de milho deve ultrapassar 98 milhões de toneladas (CONAB, 2019). A estimativa de área cultivada total de milho, na temporada 2019/2020, é de 17.534,8 mil hectares (CONAB, 2019). Na atualidade, o milho é uma das plantas da família *poaceae* (gramínea) com maior interesse econômico, pois além de fornecer alimento a humanos, é principalmente utilizada para alimentação de animais, especialmente aves e bovinos.

De acordo com Coelho e França (1995), para alcançar produção de 9,20 t de grãos/ha, a cultura do milho absorve um total de 185 kg/ha de nitrogênio (N), dos quais 138 kg/ha (75%), são exportados nos grãos e 47 kg/ha se encontra na palhada, está que pode ser restituída ao solo e ser degradada, retornando o N para o mesmo. No entanto, os 138 kg/ha extraídos com os grãos devem ser fornecidos ao solo na forma de adubação química, para que a próxima safra não seja improdutiva pela falta deste nutriente. Somente para essa reposição de N, seriam necessárias para a safra de 2019/2020, segundo as estimativas da Conab de área total de milho cultivada, 2.419,80 mil toneladas de N na forma de adubos químicos.

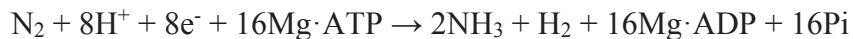
Os principais adubos nitrogenados utilizados são: uréia, sulfato de amônio, nitrato de cálcio e nitrato de amônio, contendo, respectivamente 45, 20, 14 e 34% de N (EMBRAPA, 2014). Ao utilizar uréia (45% de N) para a reposição de N para a safra 2019/2020 de milho, seriam necessárias 5.377,33 mil toneladas deste composto. O valor da uréia em agosto/2019, historicamente o mês que concentra as entregas do produto ao consumidor final, ficou cotada, em média, em R\$ 1.617,10 por tonelada em São Paulo, sem considerar o frete (RIBEIRO, 2019). Assim sendo, o custo total somente para a adubação nitrogenada de reposição para uma única cultura, o milho, em uma única safra (2019/2020), é estimado em aproximadamente 8,7 bilhões de reais.

Uma das alternativas para diminuir o uso de fertilizantes químicos é a utilização de microrganismos diazotrofos, que promovem a fixação biológica do nitrogênio (FBN) nestas lavouras. Bashan *et al.* (2004) demonstraram vários casos em que a inoculação de diazotrofos reduziu o uso de fertilizantes químicos, especialmente nitrogenados, na faixa de 20 a 50% e aumentou a relação custo-benefício. Segundo Hungria *et al.* (2010), a substituição parcial (50%) de fertilizantes nitrogenados exigidos pelas culturas de milho e trigo quando inoculados com *Azospirillum brasilense* pode gerar uma economia mundial de bilhões de dólares por ano em fertilizantes químicos. Em um estudo realizado por Alves (2007) utilizando a estirpe BR 11417 de *Herbaspirillum seropedicae* e o híbrido SHS 5050 de milho, concluiu pela técnica da abundância natural de ^{15}N , que para a combinação dessa estirpe com o híbrido selecionado, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribuiu em 36% na safra (cultivo de verão) e 45% na safrinha (cultivo de outono/inverno) em N.

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Com exceção da água, entre os nutrientes, o nitrogênio é normalmente considerado o elemento mais limitante para o desenvolvimento vegetal em seu ambiente natural (FRANCO e DÖBEREINER, 1994). Aproximadamente 80% da atmosfera terrestre é composta por nitrogênio molecular, ou dinitrogênio. Entretanto, mesmo mergulhados numa atmosfera rica em N₂, a maioria dos organismos não consegue captá-lo e utilizá-lo metabolicamente. É necessário que o N esteja disponível numa forma mais reduzida, como amônio (NH₄⁺), para que possa ser utilizado na biossíntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos e outros compostos nitrogenados (SERRATO, 2008).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o N₂ atmosférico inerte é transformado em NH₃ biologicamente útil para os organismos. Este processo é realizado na natureza apenas por um seletivo grupo de procariotos que consegue converter enzimaticamente o dinitrogênio em amônia. Em condições ótimas, o complexo da nitrogenase presente nestes organismos é capaz de realizar a conversão segundo a reação estequiometricamente balanceada mostrada abaixo (SIMPSON e BURRIS, 1984):



As bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas de diazotróficas, são a principal via de incorporação de N ao ecossistema, que é constantemente reciclado, voltando à atmosfera pela ação de outros organismos decompositores de matéria orgânica no solo. Estima-se que sejam fixados por ano aproximadamente 180 x 10⁶ toneladas de N através do processo de fixação biológica realizada pelos diazotrofos no mundo, correspondente a pelo menos duas vezes mais do que aquela que compreende a fixação química e industrial (PEOPLES e CRASWELL, 1992). Estes números demonstram a importância ambiental e econômica desses microrganismos, uma vez que a FBN mantém o ecossistema em equilíbrio, evitando a contaminação das águas e do solo por resíduos nitrogenados indesejáveis que são liberados no processo industrial de fixação de nitrogênio. Além da enorme importância econômica e ambiental a FBN também contribui para a redução do consumo energético no país uma vez que a síntese de fertilizantes nitrogenados depende do uso de energia fóssil, e consome energia na razão de 56,9 MJ/kg de N fixado industrialmente (BEN, 2006).

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

2.2.1 Diazotrofos Associativos

Algumas das bactérias que fazem parte dos diazotrofos associativos podem também ser denominadas de diazotrofos endofíticos por colonizarem o interior das plantas (DÖBEREINER *et al.*, 1988). Em geral estas bactérias colonizam os espaços intercelulares dos tecidos vegetais, sendo raramente intracelulares (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997). Os diazotrofos endofíticos podem ser divididos em dois subgrupos de acordo com sua ecologia, sendo eles endofíticos facultativos, podendo colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, ou endofíticos obrigatórios, colonizando exclusivamente o interior dos tecidos das plantas (BALDANI *et al.*, 1997). Essa classificação, contudo, não é aceita por alguns pesquisadores, uma vez que bactérias ditas endofíticas obrigatórias podem ser cultivadas em laboratório sem que haja a presença de seus hospedeiros.

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

2.3 GÊNERO *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* (TABELA 1) faz parte da divisão das β -proteobactérias e foi descrito como sendo formado por bactérias fixadoras de N_2 , microaeróbicas, gram-negativas e com morfologia curvilínea (BALDANI *et al.*, 1986). A ecologia destas bactérias tem mostrado que estas podem ser isoladas do interior de raízes, hastes e folhas de diversas gramíneas (OLIVARES *et al.*, 1996; DÖBEREINER *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1992). A característica endofítica das espécies de *Herbaspirillum* é constatada como sendo não prejudicial para arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (PIMENTEL *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1992; OLIVARES *et al.*, 1996). Contudo, há algumas espécies desse gênero que são fitopatogênicas, como *H. rubrisubalbicans*, responsável pela doença da estria mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1992; CHRISTOPHER e EDGERON, 1932) e por causar outras doenças em sorgo (HALE e WILKIE, 1972), sendo afetadas, contudo, apenas algumas variedades susceptíveis. Uma característica do gênero é a capacidade de metabolizar ácidos orgânicos como malato, succinato, piruvato e citrato, sendo estas fontes de carbono preferenciais para o cultivo (BALDANI *et al.*, 1986). Outras fontes de carbono também utilizadas por algumas espécies são açúcares simples (glucose, galactose e arabinose), manitol, sorbitol e glicerol (SCHMID *et al.*, 2006).

TABELA 1 – CHAVE TAXONÔMICA DO GÊNERO *Herbaspirillum*.

Taxonomia do Gênero <i>Herbaspirillum</i>	
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Betaproteobacteria</i>
Ordem	<i>Burkholderiales</i>
Família	<i>Oxalobacteriaceae</i>
Gênero	<i>Herbaspirillum</i>
Espécie	<i>Herbaspirillum spp.</i>

FONTE: “The catalogue of life” <<http://catalogueoflife.org/col-browse/tree/id/73dc636f668d235c488e5ee00e4f33c7>>.

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 & 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).

2.3.1 *Herbaspirillum autotrophicum*

São células curvadas em espiral, com 0,6 a 0,8 μm de largura e 2 a 5 μm de comprimento (células mais antigas podem ter até 50 μm); Gram-negativas, móveis por meio de fascículos bipolares contendo de um a cinco flagelos. Grânulos intracitoplasmáticos de poli- β -hidroxibutirato estão presentes no interior das células. Temperatura ideal para crescimento é de 28 °C, com um ligeiro crescimento ocorrendo entre 10 a 35 °C. Quimiolitototrófico, usando H_2 como doador de elétrons e CO_2 como fonte de carbono, ou quimiorganoheterotrófico; metabolismo estritamente respiratório, com oxigênio como acceptor final de elétrons. O CO_2 é fixado autotroficamente através do ciclo de Calvin. Uma ampla variedade de ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares ácidos podem servir como únicas fontes de carbono com amônio como fonte de nitrogênio. Açúcares e álcoois não são metabolizados. Amônio, nitrato, uréia e asparagina podem ser utilizados como únicas fontes de nitrogênio. O conteúdo de G + C do DNA é de 60 a 62 mol% (T_m) (AHAGNO e SCHLEGEL, 1978). Além disso, os principais ácidos graxos

celulares da estirpe DSM732 são 16: 0, 16: 1 e 18: 1 e os principais ácidos graxos 3-hidroxi são 3-OH 12: 0 e 3-OH 14: 0. (DING e YOKOTA, 2004). Essa bactéria foi isolada da água de um pequeno lago eutrófico perto de Neuchâtel (*Neuenburg*), na Suíça.

2.3.2 *Herbaspirillum lusitanum*

Herbaspirillum lusitanum P6-12, nome dado em referência à Lusitânia, o nome romano de Portugal, foi isolado de nódulos de raiz da planta *Phaseolus vulgaris* (feijão). As células são curvas, gram-negativas, aeróbicas e sem formação de esporos, com 1-6 µm de comprimento e 0-5 µm de diâmetro. A movimentação é por flagelos polares (um ou dois). Foi observado que o *H. lusitanum* P6-12 tem capacidade de crescimento em temperaturas entre 20 ° e 40 °C e pH ótimo de crescimento entre 5 e 8. Testes fisiológicos e bioquímicos demonstraram que o *H. lusitanum* P6-12 é capaz de redução de nitrato, produção de β-galactosidase, e pode assimilar meso-inositol, meso-eritritol, L-ramnose e arabinose. Testes usando antibióticos demonstraram resistência gentamicina, cefotaxima, ceftazidima, tobramicina, netilmicina e amicacina (VALVERDE *et al.*, 2003).

Herbaspirillum lusitanum P6-12 foi descrito como uma bactéria fixadora de nitrogênio através do crescimento em meio livre de nitrogênio e da amplificação do gene *nifD*, embora a banda correspondente ao produto amplificado em gel de agarose não tenha sido sequenciada. Seu DNA foi estimado com um conteúdo de G + C de 57,9 mol% (VALVERDE *et al.*, 2003).

2.3.3 *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 e colonizar plantas, sendo consideradas bactérias endofíticas obrigatórias e apresentando baixa sobrevivência no solo. Mais tarde, em 1996, uma segunda espécie diazotrófica, *Pseudomonas rubrisubalbicans*, descrito pela primeira vez por Christopher e Edgerton (1932) como a causadora da doença da estria mosqueada em cultivares de cana-de-açúcar susceptíveis e por Hale e Wilkie (1972) como o causador da doença da estria vermelha em algumas variedades de sorgo, foi reclassificada pelos mesmos autores, com o nome de *H. rubrisubalbicans* após análise e sequenciamento da porção 16S de seu rRNA.

A descrição aqui apresentada é baseada na de Palleroni *et al.* (1984) para *P. rubrisubalbicans* e as Baldani *et al.* (1996): O organismo aparece como hastes ligeiramente curvas e é móvel por meio de vários flagelos polares. Acumula poli- β -hidroxibutirato. A maioria das cepas reduz o nitrato em nitrito. A desnitrificação é negativa. O crescimento ocorre até 40 °C, sendo a temperatura ideal 30 °C. Fixam N₂, tão eficientemente quanto *H. seropedicae*. A atividade da nitrogenase e a eficiência na FBN são as mesmas de *H. seropedicae*. Em contraste com essa espécie, sua ocorrência parece limitada à cana-de-açúcar. O conteúdo de G + C do DNA é de 62 a 63 mol%.

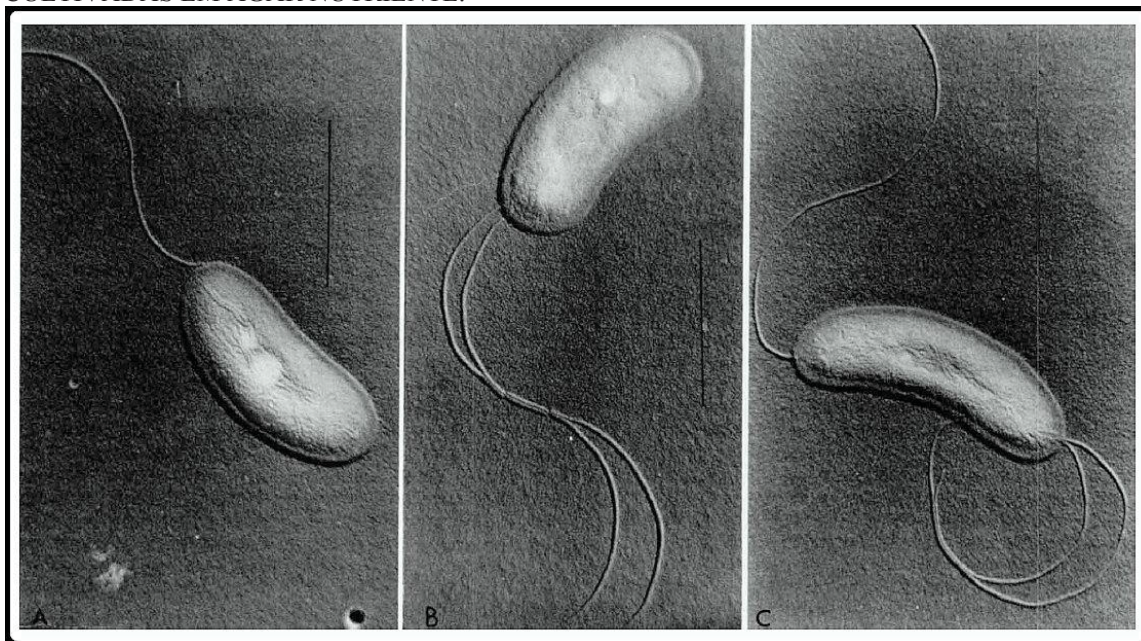
Essa espécie possui a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbias, promovendo o crescimento vegetal, mas também pode atuar como um fitopatógeno onde coloniza as raízes, caules e, principalmente, folhas em algumas variedades de sorgo e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1996; 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).

2.3.4 *Herbaspirillum seropedicae*

A espécie *H. seropedicae* foi originalmente isolada de raízes de milho, sorgo e arroz, e foi inicialmente identificada como uma nova espécie de *Azospirillum* por apresentar características bastante semelhantes de crescimento e fixação de nitrogênio, formando uma fina película de crescimento abaixo da superfície quando cultivadas em meio semi-sólido (BALDANI *et al.*, 1986).

As células de *H. seropedicae* (de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, onde a espécie foi isolada pela primeira vez) são células vibrióides e às vezes helicoidais e tornam-se muito móveis quando expostas a uma fonte de O₂. As células geralmente têm dois flagelos polares (ocasionalmente um a três flagelos) em um ou nos dois polos (FIGURA 1). O tamanho da célula é descrito como sendo acima do padrão para o gênero (*Herbaspirillum*). A eficiência da fixação de N₂ no meio semi-sólido de NFb é de 12 a 15 mg de N por g de D/L-malato ou 13 mg de N por g de manitol. A temperatura ideal para o crescimento dependente de N₂ é 34 °C, não ocorrendo crescimento a 22 e 38°C. O conteúdo de G + C do DNA é de 67 ± 0,5 mol% (BALDANI *et al.*, 1986).

FIGURA 1 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM ÁGAR NUTRIENTE.



FONTE: BALDANI *et al.*, 1986.

NOTAS: (A, B e C) Um, dois e três flagelos em um ou ambos os polos, respectivamente. Barras = 1 μm .

No estudo realizado por Baldani *et al.* (1986), *H. seropedicae* pareceu representar um grupo muito estável e uniforme de estirpes, a julgar por todas as características fisiológicas das estirpes se apresentarem muito parecidas, sendo até a utilização de substratos de carbono idêntica para todas as estirpes testadas (Z67, Z176, ZA95, ZA113, Z78, ZM141, ZA110, ZS57, ZA80).

2.4 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Praticamente todas as plantas vivem em íntima associação com microrganismos, os quais podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços em tecidos internos (colonização endofítica) (BRENCIC e WINANS, 2005). As plantas podem estabelecer associações com várias bactérias, sendo que todas ou algumas destas bactérias podem ser responsáveis pelo suprimento de nitrogênio fixado à planta (DÖBEREINER *et al.*, 1992; BARRAQUIO *et al.*, 1982; LADHA e REDDY, 1995; MALIK *et al.*, 1997).

Entre vários diazotrofos com potencial uso como biofertilizantes, bactérias com a capacidade de desenvolver populações endofíticas são foco de crescente interesse. Essas populações formam associações estáveis com plantas de importância comercial e ocupam nichos da planta nos quais têm acesso aos nutrientes necessários para fixação de nitrogênio e provavelmente protegidas contra excesso de oxigênio (QUADT-HALLMANN *et al.*,

1997; SANTI *et al.*, 2013), um inibidor da atividade da enzima nitrogenase. Além do mais, um inoculante eficiente estimula o crescimento vegetal não apenas como consequência da fixação de nitrogênio (ELBELTAGY *et al.*, 2001; HUREK *et al.*, 2002; INIGUEZ *et al.*, 2004), mas também pela produção de fitohormônios, controle de fitopatógenos ou por aumentar disponibilidade de minerais (STURZ *et al.*, 2000; SESSITSCH *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA e JHA, 2012). *H. seropedicae* tem o potencial genético para produzir vários destes benefícios (PEDROSA *et al.*, 2011), e mostrou-se capaz de aumentar o crescimento vegetal e a produtividade de várias plantas de interesse econômico (BODDEY *et al.*, 1995; ELBELTAGY *et al.*, 2001; GYANESHWAR *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

O estímulo efetivo do crescimento vegetal e a fixação de nitrogênio *in planta* dependem de uma colonização eficiente. Entretanto, os mecanismos da colonização pelo endófito associativo não são claramente compreendidos, devido em parte à dispersão da bactéria por toda a planta (BALSANELLI, 2013). Esta situação contrasta, por exemplo, com a colonização localizada que ocorre na simbiose rizóbio - leguminosa, na qual a bactéria fica confinada em estruturas morfo-genéticas (nódulos) desenvolvidas com a finalidade específica de abrigar as células colonizadoras (HALVERSON e STACEY, 1986; PÜHLER *et al.*, 2004). Essa colonização de rizóbios em leguminosas inicia-se pela quimiotaxia da bactéria em direção às raízes, decorrente da liberação de flavonoides na rizosfera. Estes flavonoides também induzem a expressão de fatores de nodulação (fatores *Nod*) pela bactéria, causando a secreção de lipoquitooligossacarídeos (LCO). Essas macromoléculas, por sua vez, são reconhecidas por receptores protéicos vegetais (LIMPENS *et al.*, 2003), que desencadeiam alterações celulares nas raízes em contato com as bactérias, levando à formação do cordão de infecção. Após a internalização dos rizóbios, ocorre a formação do simbiossomo, com a diferenciação das bactérias em bacteroides dedicados exclusivamente à fixação de nitrogênio. Durante todos esses passos do processo de colonização, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende de diversas biomoléculas, dentre elas exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos capsulares (KPS), sistemas de secreção de proteínas (SSP) e lipopolissacarídeos (LPS) (MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006).

Para que um microrganismo associativo endofítico seja capaz de colonizar as raízes das plantas intercelularmente é necessário primeiramente que seja capaz de superar os mecanismos de defesa da planta (QUISPEL, 1992; SANTI *et al.*, 2013). Contudo, tanto nas interações associativas como nas simbióticas, o evento chave parece ser a colonização

do rizoplano (PÜHLER *et al.*, 2004). Dentre os estágios deste processo estão a percepção da planta pelo microrganismo, a quimiotaxia em direção à raiz, a aderência e a colonização da superfície da mesma. *Pseudomonas fluorescens* exibe quimiotaxia em resposta a exsudatos de plantas, como flavonoides, que são considerados dirigentes da interação planta-microrganismo (DE WEERT *et al.*, 2002). A adesão e colonização de raízes de milho por *Azospirillum brasilense* exigem a presença do flagelo, biossíntese de lipopolissacarídeos e polissacarídeos fibrilares, além da secreção de exopolissacarídeos (BURDMAN, OKON e JURKEVITCH, 2000; JOFRÉ *et al.*, 2004).

Algumas bactérias endofíticas adentram a epiderme radicular através de enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997). Estudos realizados por Olivares e colaboradores (1996) concluíram que a infecção por *Herbaspirillum* spp. ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta, seguido de proliferação preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos, penetração e espalhamento da bactéria através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas com subsequente colonização e estabelecimento nos vasos do xilema. Entretanto, em *H. rubrisubalbicans* o mecanismo parece ser diferente, em trabalho conduzido por Tuleski e colaboradores (2013), foi observada a presença de 8 genes relacionadas com a via de síntese e degradação da celulose (genes *wss*) na estirpe M1, podendo ser umas das razões da patogenicidade de *H. rubrisubalbicans*. Além disso, um ponto interessante a ser retratado é o fato de *H. rubrisubalbicans* produzir uma quantidade visivelmente superior de muco em relação a *H. seropedicae*, possivelmente exopolissacarídeos (JAMES *et al.*, 1997), podendo ser um fator importante na adesão e competição dessa bactéria.

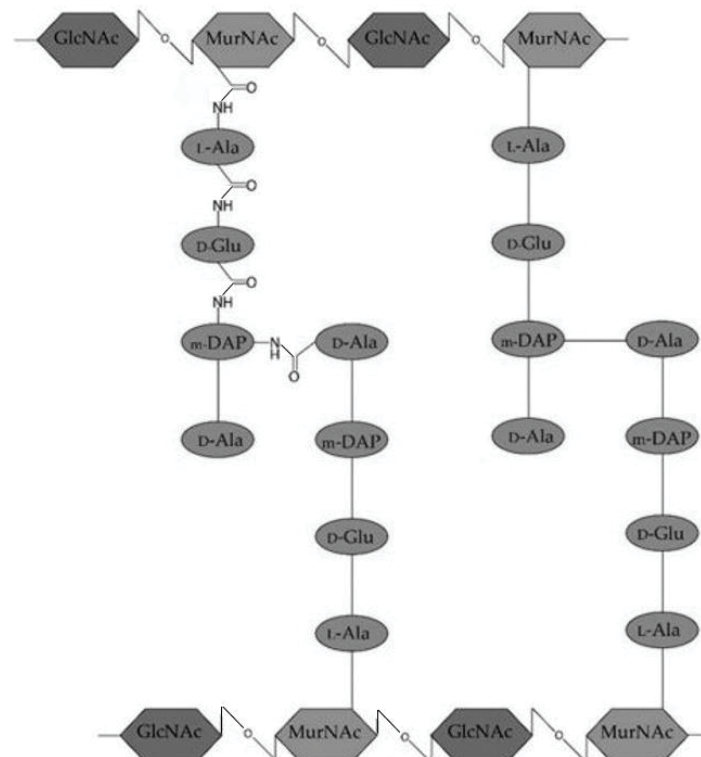
2.5 PAREDE CELULAR BACTERIANA

Na maioria das células bacterianas a parede celular protege o protoplasma de choques mecânicos e variações osmóticas. A parede celular também determina a forma da célula, uma vez que a célula desprovida dessa estrutura sempre será esférica, independentemente da sua forma na presença da parede celular, já que o formato esférico proporciona o máximo de estabilidade para as vesículas em meio aquoso (NELSON e COX, 2014). Além disso, a parede celular também funciona como uma barreira molecular, impedindo que muitos compostos atinjam a superfície da membrana plasmática. Contudo, a parede celular não deve ser vista como uma proteção inerte, ela possui papel ativo na

regulação e captação de moléculas pela célula e no reconhecimento celular por outros organismos (PELCZAR, 1980).

De acordo com a estrutura observada na parede celular, as bactérias são divididas em dois grupos, gram-positivas e gram-negativas. A estrutura básica da parede celular de ambos os grupos é formada por moléculas de peptidoglicano, formando uma camada externa à membrana citoplasmática como um invólucro de polissacarídeos ligados por pontes peptídicas, cobrindo toda a superfície celular como uma macromolécula gigante (GLASER, 1973). Como descrito por Love e colaboradores (2018), o polissacarídeo dos peptidoglicanos é formado por unidades de N-acetilglucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose) (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (2-acetamido-2-deoxi-3-O-lactil-D-glucopiranosose) (MurNAc). Estes dois amino-acúcares são ligados alternadamente por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) e contém pequenas cadeias peptídicas (4 aminoácidos) que se projetam das unidades de MurNAc. Algumas destas cadeias são unidas de maneira cruzada à outra cadeia polissacarídica, dando grande rigidez à estrutura (FIGURA 2).

FIGURA 2 – ESTRUTURA GERAL DOS PEPTIDEOGLICANOS

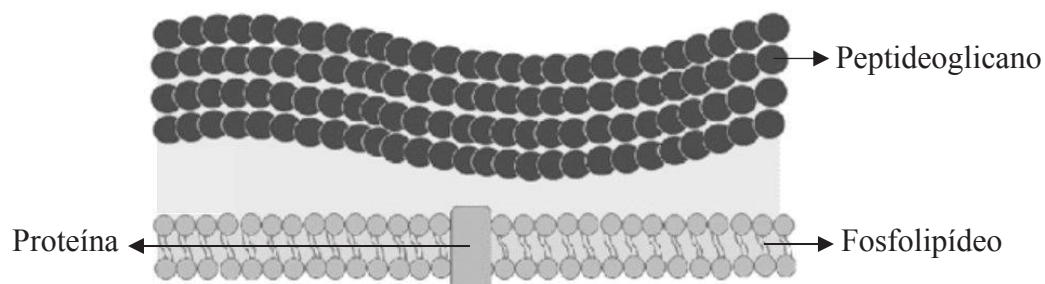


FONTE: Adaptado de Love *et al.* (2018).

NOTAS: Diagrama da estrutura peptidoglicana de bactérias, sendo composto por unidades repetidas de açúcar, N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc), que são reticuladas por meio de uma ponte interpeptídica entre o ácido meso-diaminopimélico (*m*-DAP) e resíduos de D-alanina (D-Ala) das cadeias tetrapeptídicas adjacentes. As cadeias também contêm L-alanina (L-Ala) e ácido D-glutâmico (D-Glu).

Na parede celular de bactérias gram-positivas (FIGURA 3) o peptidoglicano é o principal constituinte. Nestes microrganismos a parede celular é bastante grossa, chegando a ter de 30 a 100 nm de espessura. Em certos organismos, tal como *Micrococcus luteus*, o peptidoglicano é responsável por $\frac{3}{4}$ do peso total da parede celular (SHARON, 1975).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

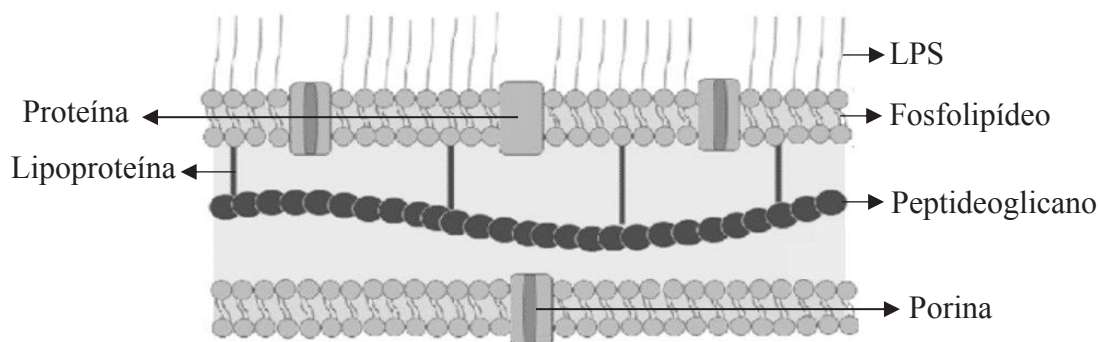


FONTE: Adaptado de Munishwar *et al.*, 2020.

A parede celular de bactérias gram-negativas (FIGURA 4) apresenta maior complexidade, sendo muitas vezes descrita pelo termo envelope celular, ela é constituída por três camadas: membrana citoplasmática, camada peptidoglicana e membrana externa. A fina porção de peptidoglicano, geralmente monocamada, encontra-se comprimida entre as membranas plasmática e externa (SHARON, 1975). Desta forma, o peptidoglicano não é acessível à ação de lisozimas ou outras enzimas líticas ao menos que esta membrana seja danificada. A membrana externa também possui uma certa impermeabilidade a determinados compostos hidrofóbicos como detergentes, além de vários antibióticos, sendo, portanto, altamente responsável pela resistência destas bactérias. Além disso, nesta membrana encontra-se LPS, fosfolípidios, porinas e proteínas (MUNISHWAR *et al.*, 2020), sendo os LPS responsáveis por aproximadamente 60% do peso seco da camada externa (COLLINS e FERRIER, 1995). Eles conferem à membrana externa uma tendência negativa essencial para a integridade estrutural das bactérias (MUNISHWAR *et al.*, 2020).

A membrana externa interage não covalentemente com a camada de peptidoglicano através de uma proteína hidrofóbica, que está covalentemente ligada por seu terminal carboxílico ao grupo amino de um aminoácido do peptidoglicano que não faz ligação cruzada, geralmente L-Ala (LOVE *et al.*, 2018). O terminal amino da proteína hidrofóbica está ligado a um lipídeo que se encontra ancorado por forças hidrofóbicas na membrana externa (COLLINS e FERRIER, 1995).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE PAREDE CELULAR DAS BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS



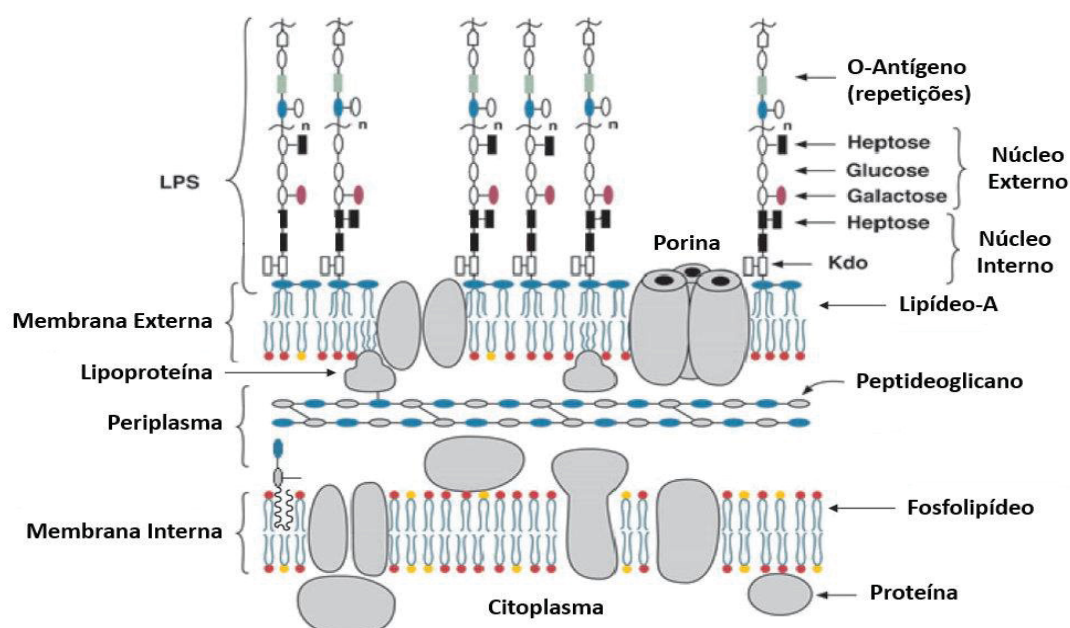
FONTE: Adaptado de Munishwar *et al.*, 2020.

2.6 LIPOPOLISSACARÍDEOS

2.6.1 Estrutura dos LPS

Os LPS são moléculas de estrutura extremamente complexa encontrados exclusivamente na camada externa da membrana externa das bactérias gram-negativas (COLLINS e FERRIER, 1995). Estes glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente e geneticamente distintas (FIGURA 5): a porção chamada de lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico, e a região externa ou *O*-antígeno (SUTHERLAND, 1985).

FIGURA 5 – MODELO DAS MEMBRANAS INTERNA E EXTERNA DE *Escherichia coli* K-12.



FONTE: Adaptado de Raetz e Whitfield, 2002.

NOTA: Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico).

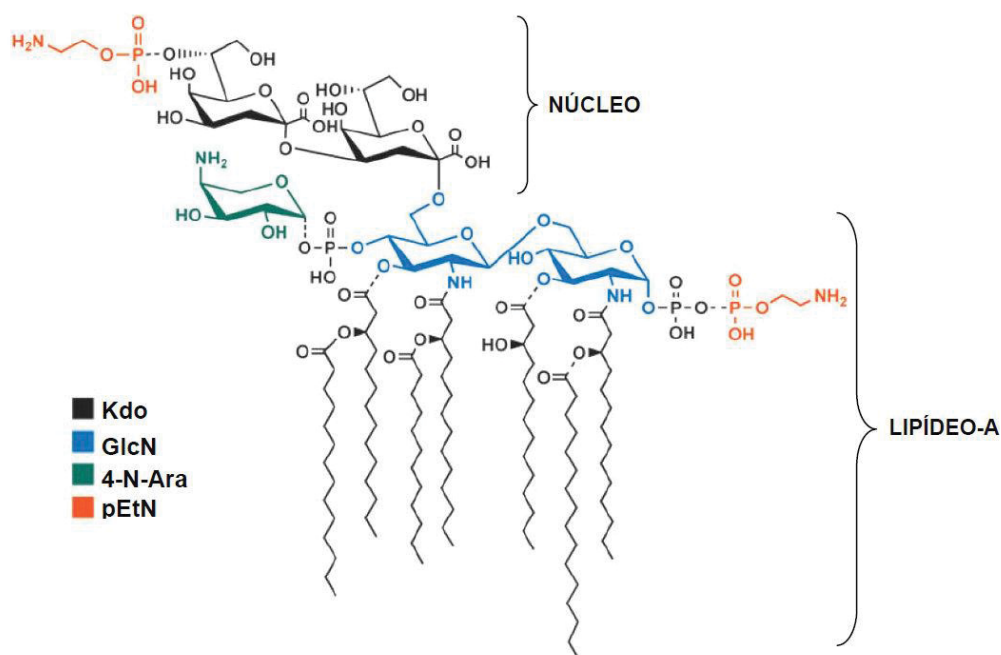
O lipídeo-A é a porção lipofílica do LPS, responsável por ancorar toda a estrutura à membrana externa da bactéria. Essa também é a região estruturalmente mais conservada entre as classes de bactérias e é basicamente formada por dímeros de 2-amino-2-deoxi-D-glucose (GlcN) ligadas entre si por ligações do tipo β -(1→6) e fosforiladas nas posições 1' e 4', além de apresentarem substituições por ácidos graxos de cadeia longa nas demais posições (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). Os lipídeo-A encontrados em Enterobacteriaceae também são chamados de endotoxinas por apresentarem atividade citotóxica em células animais (KARUNARATNE *et al.*, 1992). As unidades de GlcN podem estar substituídas por ácidos graxos ligados por ligações do tipo éster ou amida. Grupos acil de cadeia longa são encontrados esterificando as hidroxilas livres ou ligados em N como substituições do tipo amida em C-2 de ambas as unidades de GlcN (RAETZ *et al.*, 2007). Frequentemente são observados nessas estruturas ácidos graxos hidroxilados nas posições 2 (α -hidroxilados) ou 3 (β -hidroxilados). Essas hidroxilas podem ainda estar substituídas por outros grupamentos acil (LÜDERITZ *et al.*, 1971). A composição de ácidos graxos bem como seu posicionamento são bastante variáveis. Alguns ácidos graxos raros são descritos somente para os LPS de algumas espécies de bactérias como é o caso do ácido 27-hidroxi-octacosanóico (*Rhizobium* spp.), ácido 5,9-dihidroxi-tetradecanóico (*Pseudomonas diminuta* e *P. vesicularis*) e ácido 3-oxotetradecanóico (*Rhodobacter* spp.) (FORSBERG e CARLSON, 1998; KASAI *et al.*, 1987; TEGTMEYER *et al.*, 1985). Além dos ácidos graxos, outros grupamentos também podem estar presentes na estrutura do lipídeo-A, ligados aos fosfatos nas posições 1' e 4' ou substituindo-os. Alguns dos casos descritos mostram a presença de unidades de fosfoetanolamina (pEtN) ligados à 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (N-Ara) em *Salmonella typhimurium* (ZHOU *et al.*, 2001).

A ligação entre o lipídeo-A e a porção hidrofílica dos LPS é realizada quase sempre por uma unidade de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo), ligada ao C-6 livre da unidade distal de glucosamina (RAETZ e WHITFIELD, 2002). Entretanto, em algumas estruturas atípicas de LPS, outros cetomonoossacarídeos ácidos podem ser encontrados fazendo essa ponte entre o lipídeo-A e o núcleo. *Acinetobacter haemolyticus* e alguns membros da família Rhizobiaceae apresentam unidades de ácido D-glicero-D-talo-oct-2-ulosônico (Ko) e ácido 3-deoxi-D-lixo-hept-2-ulosárico (Dha) fazendo esse papel (VINOGRADOV *et al.*, 1997; RUSSA *et al.*, 1996).

O núcleo do LPS pode ser dividido em dois domínios, interno e externo. No núcleo interno, além das unidades de Kdo que fazem a ligação com o lipídeo-A, é comum encontrar uma ou mais unidades de heptose, geralmente L-glicero-D-mano-heptose (Hep),

enquanto outros podem ter uma diversidade de hexopiranoses e aminoaçúcares (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). O núcleo externo consiste geralmente de hexoses, sendo frequente a presença de Glc (glucose), Gal (galactose) e GlcNAc (N-acetilglucosamina) (RAETZ, 1990). Todas as unidades do núcleo encontram-se na forma piranosídica, e geralmente estão ligados na configuração α -anomérica (JANSSON *et al.*, 1981). A FIGURA 6 mostra a estrutura básica do lipídeo-A ligado ao núcleo interno em uma bactéria gram-negativa típica.

FIGURA 6 – ESTRUTURA DO LIPÍDEO-A E DO NÚCLEO DO LPS DE *E. coli*, ESTIRPE K-12

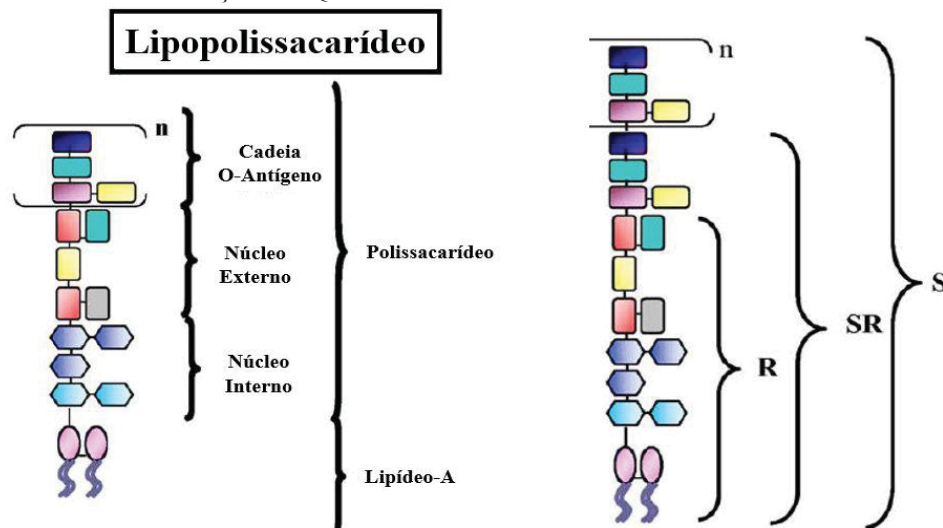


FONTE: Adaptado de Raetz *et al.* (2007)

NOTAS: Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico), GlcN (2-amino-2-deoxi-D-glucose), 4-N-Ara (4-amino-4-L-arabinose) e pEtN (fosfoetanolamina).

Em alguns casos, os LPS são classificados de acordo com a presença ou ausência do *O*-antígeno na estrutura (FIGURA 7). Quando a bactéria é incapaz de produzir o LPS completo, trata-se de um mutante rugoso (R – *rough*), uma vez que normalmente a ausência da porção *O*-antígeno na estrutura do LPS cria colônias bacterianas deformadas ou enrugadas. Por outro lado, mutantes lisos (S – *smooth*) são aqueles capazes de sintetizar a estrutura completa do LPS, contendo o *O*-antígeno nativo. Mutantes SR (*semirough*) são aqueles que produzem estruturas intermediárias do LPS, com a maior parte do *O*-antígeno ligado ao núcleo da molécula, porém com algumas deficiências estruturais e propriedades biológicas alteradas (ASPINALL, 1970).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA ESTRUTURA LIPOPOLISSACARÍDICA



FONTE: Adaptado de Caroff e Karibian, 2003.

NOTAS: R, SR e S indicam as estruturas do tipo *Rough*, *Semi-Rough* (com apenas uma subunidade da cadeia O-Antígeno) e lipopolissacarídeos do tipo *Smooth*, respectivamente

A porção *O*-antígeno geralmente é constituída de unidades oligossacarídicas repetitivas. Diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com massas moleculares diferentes, fenômeno facilmente observado pelo padrão de bandas em uma análise eletroforética dos LPS (ERRIDGE *et al.*, 2002). As cadeias polissacarídicas formadas projetam-se a partir da membrana externa da bactéria em direção ao meio, e em microrganismos patogênicos esses polissacarídeos estão em contato direto com a célula hospedeira durante a infecção (HEUMANN e ROGER, 2002). Por apresentarem propriedades antigênicas, essas moléculas são a base das espécies bacterianas em sorotipos. A presença destas cadeias polissacarídicas na superfície celular promove proteção contra a ação de lisozimas e antibióticos, como descrito por Sharon (1975), uma vez que mutantes rugosos são consideravelmente mais sensíveis a esses ataques (CAROFF e KARIBIAN, 2003). Esse fato pode ser em alguns casos explicado por interações LPS-LPS, que são estabilizadas por cátions divalentes e promovem a impermeabilização da membrana a alguns compostos (MAAGD *et al.*, 1989).

A biossíntese da porção lipídeo-A é iniciada pela ligação consecutiva de dois ácidos graxos (geralmente decanoil) à UDP-GlcN. Esta molécula, denominada de lipídeo-X, é condensada com um segundo lipídeo-X, formando a estrutura básica do lipídeo-A. As duas GlcN ligadas β -(1-6) são *N*-substituídas por ácidos graxos e *O*-ligadas ao primeiro monossacarídeo do oligossacarídeo central, geralmente um Kdo (RAETZ, 1990). A reação inicial da biossíntese do antígeno-*O* envolve uma ligação éster entre GlcNAc ou GalNAc ao ácido graxo undecaprenil-PP. Essa molécula serve de suporte inicial para a ligação de

NTP-açúcares por glucosiltransferases ancoradas na face citosólica da membrana interna. Após formação de uma unidade oligossacarídica ligada ao Und-PP, a molécula é translocada para a face periplasmática da membrana interna com o auxílio da proteína Wzx (antígeno-*O* flipase). As unidades oligossacarídicas do antígeno-*O* são polimerizadas pela antígeno-*O* polimerase (Wzy), e o produto é transferido ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central pela antígeno-*O* ligase. A biossíntese da porção de oligossacarídeo central ainda é incerta, porém sabe-se que a proteína MsbA é necessária para o deslocamento do lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central da face citosólica para a periplasmática da membrana interna. A proteína periplasmática LptA, juntamente com as proteínas YrbK e LptB, agem como auxiliadoras no direcionamento da molécula de LPS para o transportador Imp/RlpB, que desloca o LPS para a face externa da membrana externa (VALVANO, 2003; RAETZ *et al.*, 2007).

A diversidade estrutural encontrada nos *O*-antígenos é imensa. Mais de 60 monossacarídeos e 30 diferentes substituintes já foram encontrados nessas estruturas (RAETZ e WHITFIELD, 2002). As unidades repetitivas que formam os polissacarídeos podem variar em sua composição monossacarídica, posição e estereoquímica, além da presença ou ausência de substituintes não glicídicos. A alta heterogeneidade dessas moléculas torna sua identificação bastante complexa, essa complexidade reflete as dificuldades encontradas para determinar suas estruturas finas, uma vez que na mesma cultura podem ser encontradas diversas estruturas intermediárias do polissacarídeo maduro (LÜDERITZ *et al.*, 1971). Em muitos casos, apenas a estrutura do esqueleto polissacárido predominante é conhecida. A extração de LPS de culturas bacterianas também pode ser afetada pela idade da cultura e condição de crescimento. No caso de bactérias associadas a plantas, as condições de cultura podem ser inadequadas para observar o LPS presente durante a interação com o hospedeiro (SERRATO, 2014).

2.6.2 Estrutura dos LPS em Diazotrofos

As estruturas de LPS presentes em bactérias fixadoras de nitrogênio são mais bem descritas para espécies da família Rhizobiaceae, visto que os estudos em bactérias diazotróficas iniciou com microrganismos capazes de formar estruturas diferenciadas (nódulos) para a fixação de nitrogênio, como descrito nos trabalhos de Hellriegel (1886) e Hellriegel e Wilfarth (1888), publicações que se tornaram clássicas, e que anunciaram ao mundo a grande descoberta: são os nódulos das raízes onde habitam microrganismos que

conferem às leguminosas a capacidade de utilizar o N_2 gasoso da atmosfera. Já os estudos com as bactérias endofíticas envolvidas na FBN são mais recentes, partindo da década de 80, como os de Baldani *et al.* (1986) e Döbereiner *et al.* (1988).

A composição monossacarídica e de lipídeos dos LPS de rizóbios pode variar consideravelmente, contudo, a arquitetura básica dessas moléculas é conservada (KANNENBERG *et al.*, 1998). O LPS de *Rhizobium etli* estirpe CE3 (FIGURA 8) é um dos mais extensivamente estudados, e apresenta uma variedade estrutural que é usada para a classificação dessas moléculas em duas classes principais (CARLSON *et al.*, 1987a). A primeira classe consiste de um LPS com rápida migração eletroforética por ser formado apenas pela porção lipídeo-A e uma porção do núcleo oligossacarídico interno (LPS II), também chamado de LPS do tipo R - *rough*. A outra classe é formada pela estrutura completa do LPS, contendo a região O-antígeno, além do núcleo completo e do lipídeo-A (LPS I ou LPS do tipo S - *smooth*) (RIDLEY, 2000).



FONTE: Serrato, 2008 (Adaptado de Ridley, 2000)

A porção lipídeo-A de *R. etli* é estruturalmente similar àquela encontrada em *R. leguminosarum*. Ambas apresentam um trissacarídeo formado por glucosamina (GlcN), ácido galacturônico (GalA) e 2-amino-2-deoxigluconato (GlcNato) como estrutura primária do lipídeo-A (CARLSON *et al.*, 1999). Além da substituição do grupamento fosfato por uma unidade de GalA na posição 4', ambas as unidades de GlcN e GlcNato

apresentam-se *N*-aciladas na posição 2 e *O*-aciladas na posição 3 por ácidos graxos β -hidroxilados de comprimentos variados (BHAT *et al.*, 1994). A maioria dos lipídeo-A presente nas Rhizobiaceae, incluindo *R. etli*, são acilados com ácidos graxos de cadeias relativamente longas, como o ácido 27-hidroxi-octacosanoico (C-27-OH) (KANNENBERG *et al.*, 1998). O núcleo interno de *R. etli* CE3 é formado por um octassacarídeo ramificado complexo, contendo unidades de Kdo, GalA, Man (Manose) e Gal. A porção do núcleo externo, que faz a ligação com o *O*-antígeno, consiste em unidades de QuiNAc (N-acetilquinovosamina), Man e Fuc (Fucose) (FORSBERG e CARLSON, 1998). Apesar da variedade estrutural dos *O*-antígenos encontrados para rizóbios é comum a presença de açúcares hidrofóbicos, incluindo deoxi-hexoses, 6-deoxi-amino-açúcares, deoxi-hexoses metiladas e N-metil-6-deoxi-açúcares. Além disso, é frequente a presença de grupamentos acetil (SCHNAITMAN e KLENA, 1983). O LPS I de *R. etli* CE3 possui, no final da estrutura polissacarídica, uma sequência formada por cinco unidades trissacarídicas, cada uma formada por um dissacarídeo GlcA (ácido glucurônico)-Fuc contendo uma unidade terminal de 3-metil-6-deoxitalose (3Me-6dTal) ligada às unidades de Fuc. A cadeia do *O*-antígeno ainda possui uma unidade terminal de 2,3,4-tri-*O*-metil fucose (FORSBERG e CARLSON, 1998; BHAT e CARLSON, 1992). Microheterogeneidades estruturais podem ocorrer devido às alterações na metilação dos resíduos fucosil e na composição de ácidos graxos do lipídeo-A.

Diversos outros diazotrofos também já tiveram as estruturas de seus lipopolissacarídeos determinadas. A presença de unidades de Rha (Ramnose) na estrutura dos *O*-antígenos é um traço comum entre várias espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. *R. trifolli* apresenta um pentassacarídeo repetitivo como estrutura principal de seu *O*-antígeno que é formado por três unidades de Rha, além de ManNAc (N-acetilmanosamina) e GlcNAc (WANG e HOLLINGSWORTH, 1994). No caso da γ -proteobactéria *Pseudomonas syringae*, a estrutura do *O*-antígeno é formada por um polímero linear de β -(1 \rightarrow 2)-L-Rha. Os diazotrofos endofíticos do gênero *Azospirillum* também apresentam grandes quantidades de Rha na estrutura dos *O*-antígenos. No caso de *A. brasilense*, a estrutura do *O*-antígeno é formada exclusivamente por esse monossacarídeo na forma de uma homoramnana linear, onde todas as unidades são encontradas como D-isômeros (FEDONENKO *et al.*, 2002). *A. lipoferum* apresenta uma cadeia principal de Rha com ramificações de Glc e substituições por grupamento acetil (SKVORTSOV e IGNATOV, 1998). A bactéria *Acetobacter diazotrophicus* sintetiza uma estrutura similar àquelas descritas (PREVIATO *et al.*, 1997) indicando que algumas α -

proteobactérias podem apresentar algum tipo de relação estrutural em seus *O*-antígenos. Entretanto, análises de composição em diferentes estirpes de *A. diazotrophicus* indicam uma grande variabilidade estrutural dentro da própria espécie (FONTAINE *et al.*, 1995).

Diazotrofos da classe das β -proteobactérias apresentam uma variabilidade muito grande de estruturas descritas, e em muitos casos são encontradas unidades monossacarídicas raras. Um exemplo é a presença de unidades de yersiniose (YerA) na estrutura do *O*-antígeno produzido por *Burkholderia brasiliensis* (MATTOS *et al.*, 2005). Essa unidade de YerA (3,6-dideoxi-4-C-(4'-hidroxietil)-D-xylo-hexose) é ramificante em uma estrutura com cadeia principal formada por unidades de Rha. *Ralstonia pickettii* apresenta outro monossacarídeo incomum, BacNAc (4-acetamido-2-amino-2,4,6-trideoxi-D-glucose), na estrutura do *O*-antígeno (VINOGRADOV, 2004).

2.6.3 Os LPS na Interação Planta-Bactéria

A importância dos LPS na comunicação celular planta-bactéria já foi demonstrada para algumas espécies, mas o papel exato dessas moléculas no processo ainda não é conhecido (DENNY, 1995). Entretanto, esses polissacarídeos de superfície são a interface entre as células e o ambiente e, portanto, devem apresentar importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular (KANNENBERG *et al.*, 1998).

No caso de *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, bactéria causadora de cancro em frutos susceptíveis, a perda ou alteração da estrutura da porção *O*-antígeno está relacionada com a perda da virulência (SMITH *et al.*, 1994). Alguns trabalhos sugerem que os LPS estão envolvidos no processo de adesão de *Agrobacterium tumefaciens* às células hospedeiras (PUEPPKE, 1984). Contudo, avaliações posteriores não conseguiram suportar a hipótese de que os LPS de *A. tumefaciens* possuem um papel direto na agregação bacteriana com seu hospedeiro. Mutantes de *A. tumefaciens* que produzem um LPS deficiente na região do núcleo, mas que sintetizam a porção *O*-antígeno sem defeitos, são capazes de aderir às células de cenoura normalmente (PUEPPKE, 1984) mostrando que a estrutura total do LPS não é fundamental.

Em *Pseudomonas aeruginosa*, a mutação do gene *rmlC*, responsável por um passo da biossíntese de UDP-Rha, mostrou que o LPS formado não é detectado por anticorpos específicos para o LPS nativo (RAHIM *et al.*, 2000). Uma mutação no gene *galU* de *P. aeruginosa* impede a ligação da porção *O*-antígeno ao núcleo externo do LPS (CHOUDHURY, *et al.*, 2005). O LPS produzido por algumas cepas de *Herbaspirillum* foi

analisado por Serrato e colaboradores (2010) mostrando que o LPS produzido por *H. seropedicae* SmR1 foi diferente na composição de monossacarídeos e ácidos graxos quando comparado a outras cepas (Z67, Z78, ZA95, M1, M2 e M4). Em estudo posterior, conduzido por Balsanelli *et al.*, (2010), genes relacionados à biossíntese de Rha foram eliminados em *H. seropedicae* SmR1 e foram observadas alterações na estrutura da biomolécula. O LPS dos mutantes *rfbB*- e *rfbC*- carece da porção inteira do O-antígeno e de ambas as unidades 4-N-Ara no lipídeo-A. O principal efeito observado para os dois mutantes é a capacidade reduzida de colonizar os tecidos internos da raiz do milho.

O processo de nodulação em leguminosas realizado durante a simbiose com bactérias da família Rhizobiaceae parece ser alterado na ausência de LPS intactos (MAAGD *et al.*, 1988). Contudo, os LPS não afetam os primeiros estágios de nodulação, como a adesão e formação do cordão de infecção (KANNENBERG *et al.*, 1998). Foi demonstrado que os LPS de *R. etli* são responsáveis pela manutenção das células viáveis dentro dos nódulos após a formação dos mesmos em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (NOEL *et al.*, 2000). Além disso, os bacterióides dentro dos nódulos apresentam variações drásticas na estrutura dos LPS em relação às células antes da infecção, como demonstrado *in situ* para os LPS de *R. leguminosarum* durante a simbiose com *Pisum sativum*, *Vicia sativa* e *P. vulgaris* (GOOSEN-DEROO *et al.*, 1991). Bacterióides de *R. etli* retirados de nódulos de *P. vulgaris* (TAO *et al.*, 1992), e de *Sinorhizobium meliloti* retirados de alfafa (REUHS *et al.*, 1999) mostraram diferenças estruturais na porção O-antígeno dos LPS similares àquelas observadas quando essas bactérias são cultivadas em baixos níveis de oxigênio e baixo pH, indicando que as mudanças nas estruturas podem ser uma consequência das condições fisiológicas à que as células estão expostas dentro dos nódulos (KANNENBERG *et al.*, 1998). A formação de nódulos, resultante da simbiose, facilita o estudo de alterações estruturais dos LPS em relação as bactérias endofíticas, visto que, no caso dos diazotrofos associativos não ocorre formação de estruturas específicas para a colonização e as bactérias podem colonizar toda a planta, dessa forma, a obtenção do LPS se torna complexa. Mutantes de *R. etli* que produzem uma estrutura truncada de LPS formam nódulos defeituosos e não possuem a capacidade de fixar nitrogênio (NOEL e DUELLI, 2000). Quanto maior a anomalia na estrutura do LPS, menores as chances de sobrevivência dos bacterióides, e em casos de extremos de alteração estrutural dos LPS, o processo de infecção pode parar antes do início de formação do nódulo (CARLSON *et al.*, 1995; RIDLEY, 2000). Há indícios de que a atividade dos genes *nod* pode afetar a estrutura dos LPS (CARLSON *et al.*, 1987b), e estudos de homologia da sequência de nucleotídeos dos

genes *nod* também sugerem que eles podem estar envolvidos na biossíntese ou modificação de lipopolissacarídeos (MAAGD e LUGTENBERG *et al.*, 1989).

Além da função geral de barreira de proteção exibida pelas moléculas de LPS, como exposto anteriormente, um papel muito mais específico para essas moléculas foi descrito durante um estudo dirigido por Balsanelli (2013) envolvendo a ligação de *H. seropedicae* à superfície da raiz do milho, o qual apresentou que a fixação eficiente requer a porção *O*-antígeno do LPS, uma vez que o número de bactérias do tipo selvagem ligadas às superfícies radiculares do milho era aproximadamente 100 vezes maior que em linhagens mutantes sem o *O*-antígeno. O possível papel das proteínas da membrana externa bacteriana na etapa de ligação é desconsiderado, já que bactérias tratadas com proteinase-K aderem normalmente em raízes. Por outro lado, quando as raízes são tratadas com proteinase-K, a ligação de bactérias do tipo selvagem diminuiu para níveis semelhantes a mutantes sem a porção *O*-antígeno do LPS. Estes dados sugerem que o *O*-antígeno do LPS de *H. seropedicae* participa da etapa de ligação da colonização, ancorando a bactéria às plantas através de lectinas (BALSANELLI, 2013).

A aglutinina de germe de trigo (WGA), uma lectina com alta afinidade para a GlcNAc, está presente nos ápices das raízes de plantas de trigo adultas (MISHKIND *et al.*, 1983), e pode, portanto, ser um local específico de fixação de rizobactérias que contribuem para a adesão bacteriana à superfície da raiz (DEL GALLO *et al.*, 1989). As lectinas de ligação a GlcNAc do milho têm homólogos em outras gramíneas, como trigo, arroz e sorgo, plantas altamente colonizadas por *H. seropedicae*, e de fato, as lectinas desses cereais podem ser inibidas por GlcNAc (STINISSEN *et al.*, 1985). *Azospirillum brasilense* também interage com a WGA, embora não esteja claro qual polissacarídeo da membrana externa está envolvido com essa ligação (KONNOVA *et al.*, 1994).

Dessa forma, nota-se que a porção *O*-antígeno pode contribuir na determinação da especificidade das interações bactéria-planta, já que os estudos anteriores mostraram que o polissacarídeo é essencial para a fixação de determinada estirpe bacteriana nas lectinas da planta hospedeira. Sendo assim a estrutura desses polissacarídeos pode contribuir na determinação da especificidade das interações planta-bactéria. Além disso, Balsanelli (2013) destaca que a questão de como exatamente essas proteínas vegetais promovem a ligação de rizobactérias à raiz permanece sem solução, e que algumas lectinas apresentam domínios de membrana que podem ancorá-las na membrana celular da planta e, conseqüentemente, ancorar as bactérias. No entanto, várias lectinas podem ser secretadas na rizosfera, aglutinando bactérias na mucilagem da raiz.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizadas nesse trabalho diversas estirpes das bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, provenientes da coleção de culturas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), ou gentilmente cedidas pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (NFN – UFPR). Os estoques de células foram mantidos em suspensão de glicerol 50% e armazenados a -20 °C, ou estocados em meio semissólido à temperatura ambiente. A TABELA 2 mostra a lista de estirpes que foram utilizadas.

TABELA 2 – ESPÉCIES E ESTIRPES DE *Herbaspirillum* UTILIZADAS NESTE TRABALHO.

Espécie	Estirpe	Referência
<i>H. rubrisubalbicans</i>	AB7	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA10	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA11	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA12	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA14	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA149	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA15	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	BA16	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	HCC103	EMBRAPA
	M1	BALDANI <i>et al.</i> (1986)
M4	BALDANI <i>et al.</i> (1986)	
<i>H. seropedicae</i>	M2	RAMOS <i>et al.</i> (2003)
	SmR1	MACHADO <i>et al.</i> (1996)
	X8	CRUZ <i>et al.</i> (2001)
	Z67	BALDANI <i>et al.</i> (1986)
<i>Herbaspirillum</i> spp.	BA13	WEBER <i>et al.</i> (2001)
	BA143	EMBRAPA
	ZA45	EMBRAPA
<i>H. autotrophicum</i>	DSM732	DING e YOKOTA (2004)
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	VALVERDE <i>et al.</i> (2003)

3.2 CULTIVO BACTERIANO

3.2.1 Meio de Cultura

Para o crescimento foi utilizado o meio NFb (PEDROSA e YATES, 1984) composto por: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), NaCl ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), CaCl_2 (20 mg.L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mg.L^{-1}), biotina ($100 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($2,4 \text{ mg.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($2,8 \text{ mg.L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($8,0 \text{ mg.L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($240 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($17,8 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($159,5 \text{ g.L}^{-1}$). Como fonte de carbono foi utilizado ácido málico ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e como fonte de N o cloreto de amônio (NH_4Cl) (20 mM). O pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado em autoclave, sendo os sais de fosfatos e de cloreto de amônio autoclavados separadamente e adicionados ao restante do meio antes da inoculação.

3.2.2 Condições de Crescimento

O preparo dos pré-inóculos foi realizado em frascos de 10 mL contendo 2 mL de meio de cultura inoculados com 5 μL da suspensão estoque de células em glicerol 50%. Os cultivos foram realizados a 30 °C em shaker rotativo (120 rpm). Para o cultivo em grande escala foram utilizados frascos erlenmeyer de 2,0 L de capacidade, contendo 0,5 L de meio de cultura e inoculados com o pré-inóculo fresco crescido até uma densidade óptica de 600 nm (D.O._{600}) de 0,8. A D.O._{600} inicial de todos os cultivos foi padronizada em 0,05.

3.3 EXTRAÇÃO DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS

3.3.1 Extração em Pequena Escala

Após crescimento das células de *Herbaspirillum* em frascos do tipo vial de 10 mL contendo 2 mL de meio de cultura como descrito, as células foram removidas por centrifugação (1 min, $10.000 \times g$) e coletadas. Depois de repetidas lavagens das células com PBS (pH 7,2) e, posteriormente, com água destilada, as células foram liofilizadas. A extração dos LPS produzidos pelas estirpes selecionadas foi realizada a partir de adaptação do protocolo de Hitchcock (1983) para que se obtivesse LPS para análises de composição monossacarídica. As células secas foram suspensas em 150 μL de tampão de lise e fervidas por 10 min. 10 μL de Proteinase K (de um estoque a 20 mg/mL) foi adicionada a solução,

seguida de incubação a 60 °C por 180 min. Após a incubação foi adicionado fenol 90% pré aquecido (70 °C) e incubado por 15 min com agitações vigorosas a cada 5 min, posteriormente a solução foi transferida para banho de gelo seguida de centrifugação (10 min, 10.000 x g), foi então obtido duas frações, fenólica e aquosa, que foram dialisadas em membranas de 3.500 Da de exclusão e liofilizadas para obtenção do LPS.

3.3.2 Extração em Grande Escala

Após crescimento das células de *Herbaspirillum* spp. em frascos do tipo erlenmeyer contendo 0,5 L de meio de cultura, as células foram removidas por centrifugação (5 min, 8.000 x g) e coletadas. Depois de repetidas lavagens das células com solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente, com água destilada, as células foram liofilizadas. A extração dos LPS produzidos por estirpes selecionadas foi realizada para a obtenção de LPS para análises espectrométricas. As células secas foram suspensas em 17 mL de água para cada grama de células e aquecidas à 65 °C. Posteriormente, 17 mL (p/ cada g de célula) de fenol 90%, pré-aquecido à 65 °C, foi adicionado. A solução foi mantida à 65 °C sob agitação por 20 min e posteriormente resfriada em banho de gelo por 10 min (WESTPHAL e JANN, 1965). Após centrifugação, a fase aquosa foi removida, enquanto a fase fenólica foi extraída novamente com nova adição de água nas mesmas condições. Ambas as fases, aquosa e fenólica, foram então dialisadas exaustivamente em membranas de 3.500 Da de exclusão. As frações foram centrifugadas, para a remoção de materiais insolúveis, e o material solúvel contendo LPS foi liofilizado para posterior análise (RIDLEY *et al.*, 2000).

3.3.3 Micro-extração do Lipídeo-A

Para a micro-extração do Lipídeo-A diretamente das bactérias foi utilizada a metodologia proposta por Wang *et al.* (2010) com modificações. As estirpes foram inoculadas em meio líquido e após 24 h foram centrifugadas para eliminação do meio, foi então adicionado PBS contendo 1% de fenol. O pellet foi lavado e ressuspenso em 100 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) contendo proteinase K (60 µg/mL). A suspensão foi aquecida a 100 °C por 1 h. A mistura foi centrifugada e os sedimentos lavados com metanol. O lipídeo-A foi extraído dos pellets com 100 µL de clorofórmio e metanol (1:1, v/v).

3.4 PURIFICAÇÃO DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS

3.4.1 Tratamento Enzimático

Os métodos que removem contaminantes individuais como ácidos nucleicos e lipoproteínas podem ser combinados em um único protocolo como o de Wang *et al.* (2010), no qual os LPS extraídos pelo método de Westphal & Jann (1965) liofilizados foram ressuspenso em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, adicionada RNase a uma concentração final de 25 µg/mL e DNase I a uma concentração final de 100 µg/mL. A suspensão foi incubada a 37 °C por 2 h e posteriormente adicionada Proteinase K (PROK) a uma concentração final de 100 µg/mL, incubando a suspensão a 37 °C por 2 h. É adicionado 5 mL de fenol saturado com água prosseguido de agitação vigorosa, em seguida a suspensão é centrifugada a $3.000 \times g$ por 30 min em temperatura ambiente. Foi realizada dialise da fração aquosa por 12 h contra água destilada a 4 °C. Após a diálise, a suspensão foi centrifugada e a solução aquosa foi liofilizada para a recuperação do LPS purificado.

3.4.2 Precipitação Etanólica

Com o propósito de separar compostos de alta e baixa massa, foi realizada a precipitação etanólica com álcool absoluto gelado (3 volumes) para a precipitação dos compostos de alta massa. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 rpm, 15 min), sendo as frações obtidas congeladas e liofilizadas para posteriores análises.

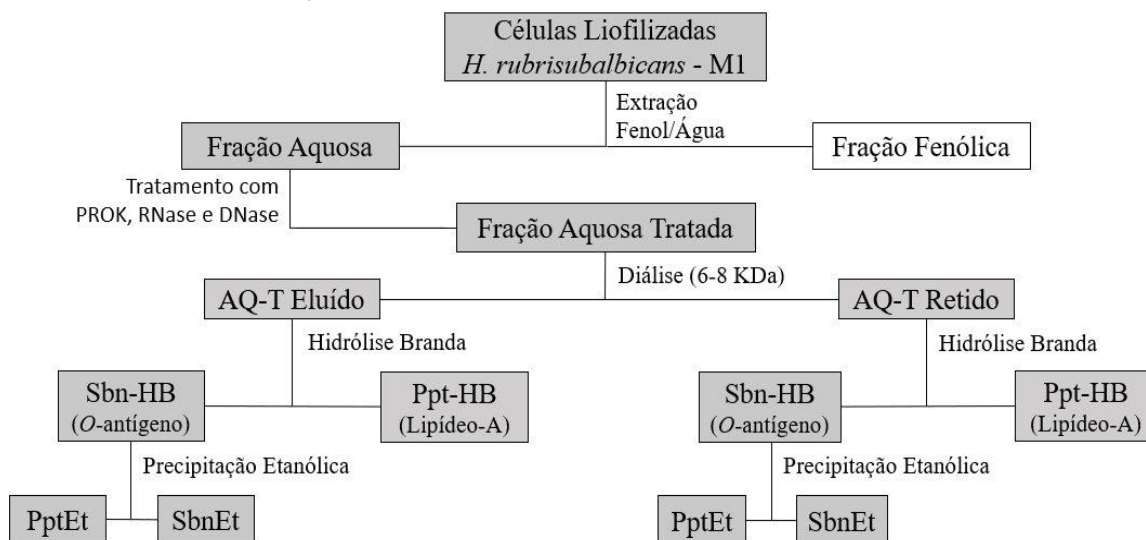
3.5 MÉTODOS QUÍMICOS

3.5.1 Hidrólise Branda (HB)

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

3x com água, seguido de centrifugação. As frações solúveis foram combinadas e contém os oligossacarídeos da porção *O*-antigênica. O material precipitado e o solúvel foram liofilizados para posterior análise estrutural. A FIGURA 9 resume os procedimentos para a geração das frações que surgiram após a HB, assim como a nomenclatura das frações.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DE ETAPAS (TRATAMENTO ENZIMÁTICO, DIÁLISE, HIDRÓLISE BRANDA – HB, PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA) PARA OBTENÇÃO DO LPS HIDROLISADO (*O*-ANTÍGENO E LIPÍDEO-A) DA ESTIRME M1 DE *H. rubrisubalbicans*.



NOTAS: Em branco amostra que não foi trabalhada. AQ-T (Aquoso tratado); Sbn (Sobrenadante); Ppt (Precipitado); Et (Etanólico); HB (Hidrólise branda)

Na fração Sbn-HB podemos também encontrar fragmentos do EPS que eventualmente estejam contaminando a amostra. Dessa forma, foi realizada uma precipitação etanólica com o propósito de separar compostos de alta massa de compostos de baixa massa, gerando, respectivamente as frações PptEt-Sbn-HB e SbnEt-Sbn-HB.

3.5.2 Derivados Alditol Acetato (AA)

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

para posterior análise por GC-MS. (WOLFROM e THOMPSON, 1963a; WOLFROM e THOMPSON, 1963b).

3.5.3 Derivados Alditol Acetato Parcialmente Metilados (PMAA)

A determinação das ligações glicosídicas presentes nos LPS foi realizada a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente per-*O*-metilados (PMAAs). Para isso, 5,0 mg de LPS liofilizado foi solubilizado em 3,0 mL dimetil sulfóxido (DMSO) contendo NaOH pulverizado anidro em excesso, e deixado sob agitação por 12 h. Adições de 0,1 mL de iodeto de metila (CH_3I) foram realizadas a cada 5 min, agitando-se intermitentemente o material em vórtex no intervalo de cada adição até um volume final de 1,0 mL (CIUCANU e KEREK, 1984). O material foi deixado por 12 horas à temperatura ambiente antes de ser neutralizado com gotas de ácido acético glacial e diluído em 3 volumes de água. Os LPS totalmente per-metilados foram extraídos da mistura com CHCl_3 . Após a secura do material, os LPS per-metilados foram hidrolisados com TFA 2 M, sendo mantidos a 100 °C por 8 h. A neutralização do TFA foi realizada pela adição de carbonato de bário (BaCO_3) e centrifugação, antes do material ser levado à secura. Após liofilização, o material foi submetido ao processo de redução e acetilação como descrito acima, exceto pelo passo de redução, que foi realizado com NaBD_4 (boroidreto de sódio deuterado). Os derivados PMAA foram analisados por GC-MS segundo o tempo de retenção e perfil de fragmentação (SASSAKI *et al.*, 2005).

3.5.4 Derivados Metil Ésteres de Ácidos Graxos (FAME)

Para a análise da composição de ácidos graxos lineares presentes nos LPS, 500 μg de amostra foram submetidos à metanólise com 1 mL de HCl 1M em MeOH anidro por 18 h à 80 °C com posterior resfriamento do material em banho de gelo, durante todo o restante do processo as amostras foram mantidas a 4 °C. MeOH:HCl foram evaporados em fluxo de nitrogênio até cerca de 1/3 do volume total, após foi adicionado 1 mL de CHCl_3 ; o material foi então lavado 3 vezes com 3 mL de solução saturada de NaCl, removendo-se a porção aquosa após cada lavagem. A fase orgânica foi então lavada outras 5 vezes com água deionizada para a remoção do sal residual, filtrada em filtro contendo sulfato de sódio anidro e analisada em GC-MS (SERRATO, 2008).

3.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.6.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada foram realizadas em placas de alumínio contendo como fase estacionária sílica (SiO_2) e como fase móvel foi utilizado acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v) (HOUGH e JONES, 1962). O objetivo foi verificar a eficiência da hidrólise dos LPS e determinar qualitativamente sua composição monossacarídica. Como padrões foram utilizadas soluções de diferentes monossacarídeos ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). Após a secagem das placas, foi utilizada uma solução de orcinol ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) em etanol contendo 5% de H_2SO_4 , e as placas foram aquecidas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min para revelação das bandas.

3.6.2 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás SHIMADZU, modelo GC - 2010 *Plus*, acoplado a um espectrômetro de massa de marca SHIMADZU, modelo GCMS - TQ8040, com varredura de massa entre 30 e 600 m/z e energia de geração de elétrons de 70 eV, equipado com coluna capilar SH-Rtx-5MS (Shimadzu) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida. As injeções nas colunas foram realizadas utilizando sistema *Auto Sampler* AOC-5000 *Plus* (Shimadzu), partindo-se de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de $40 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$, até $215 \text{ }^\circ\text{C}$ (para acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados), ou $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (para acetatos de alditóis e para ácidos graxos metil esterificados), sendo mantida constante até o final da análise. Hélio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

3.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

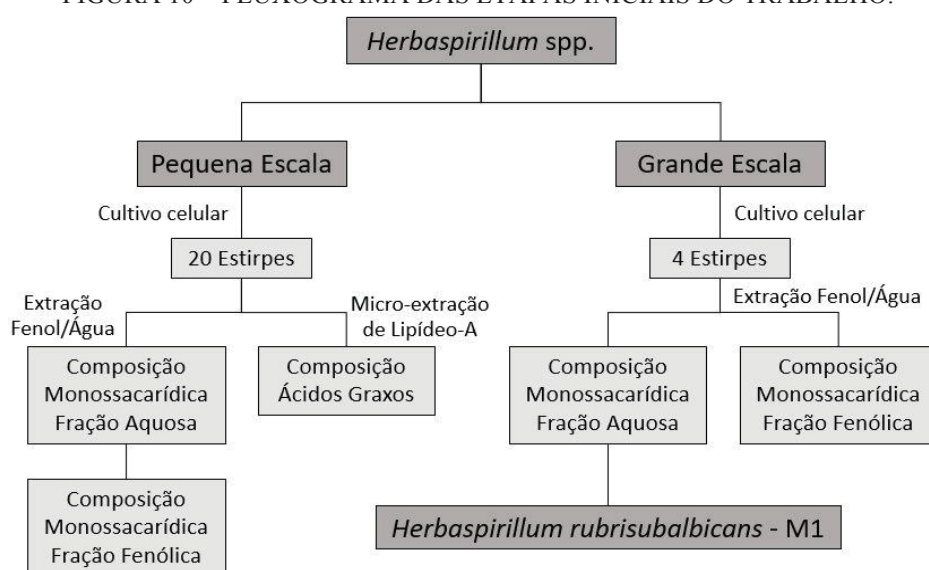
As análises de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker *Avance* 400 MHz. Cada amostra foi solubilizada em D_2O 99,8% e liofilizada para a troca dos prótons intercambiáveis por deutério. Para a análise, o material foi solubilizado em $500 \text{ } \mu\text{L}$ de D_2O e colocado em tubos de RMN (5 mm de diâmetro interno). As análises mono- e bidirecionais foram realizadas à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ sendo utilizado o sinal de $-\text{CH}_3$ do padrão interno

de acetona em δ 2,22 (^1H) e δ 30,2 (^{13}C). Experimentos unidimensionais de ^1H foram realizados com amplitude espectral de 8 kHz. Experimentos de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) foram realizados com amplitude espectral de 2,25 e 13,9 kHz para ^1H e ^{13}C respectivamente, e dataset (t1 x t2) de 128 x 512 pontos com 8 scans. Após aquisição, os dados foram processados utilizando o software *NMR TopSpin* (Bruker), versão 4.0.7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado em duas etapas (FIGURA 10), uma chamada de “Pequena Escala”, constituída por vinte estirpes de *Herbaspirillum* spp., e que teve como objetivo realizar um *screening* das estirpes, e outra etapa denominada “Grande Escala” onde foram selecionadas quatro estirpes, sendo uma a escolhida para realizar as caracterizações químicas e estruturais mais detalhadas do LPS. Dessa forma, os resultados serão apresentados em dois tópicos distintos para melhor compreensão.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS INICIAIS DO TRABALHO.



4.1 RESULTADOS DA EXTRAÇÃO EM PEQUENA ESCALA

Para a obtenção do *screening*, com o propósito de se conhecer de forma básica a composição molecular dos LPS das vinte estirpes, foi realizado o cultivo celular em meio NFb-malato incluindo fontes de fosfato e nitrogênio, em frascos do tipo vial de 10 mL contendo 2 mL de meio de cultura. O cultivo foi realizado até atingir uma quantidade de células de aproximadamente 6 mg, essas células foram lavadas e liofilizadas. A extração dos LPS em pequena escala baseou-se na lise celular, tratamento com PROK (E.C. 3.4.21.64) e incubação com fenol 90%, assim, após centrifugação, obteve-se duas frações, sendo uma aquosa e outra fenólica. Essas frações foram dialisadas para remoção de resíduos de fenol e liofilizadas para obtenção dos LPS. Os LPS de ambas as frações foram hidrolisados com TFA 1 M e derivatizados para análise de composição monossacarídica via GC-MS.

Os LPS podem ser extraídos em ambas as frações, aquosa (TABELA 3) ou fenólica (TABELA 4), a depender maioritariamente da sua estrutura, conforme visto anteriormente. As bactérias podem ser classificadas como do tipo rugosa, quando a porção *O*-antígeno do LPS está ausente ou truncada na estrutura, influenciando na solubilidade da molécula, pois sem a porção polissacarídica hidrofílica, a porção lipídica, hidrofóbica, fará com que a molécula seja extraída na fração orgânica (fração fenólica). O inverso ocorre para as bactérias classificadas como do tipo lisa, que apresentam a estrutura completa do LPS, os quais, por apresentarem a porção polissacarídica *O*-antigênica completa, são mais hidrofílicos, favorecendo a extração na fração aquosa. Além disso, o grau de polimerização também influencia a solubilidade, visto que quanto maior a porção hidrofílica (*O*-antígeno) maior será a presença do LPS na fração aquosa após a extração.

TABELA 3 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DOS LPS DE *Herbaspirillum* spp. EXTRAÍDOS NA FRAÇÃO AQUOSA.

Espécie	Estirpe	Monossacarídeos*							
		Rha	Rib	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
<i>H. rubrisubalbicans</i>	AB7	9,20	15,78	3,05	0,72	-	8,05	33,55	29,65
	BA10	8,26	24,56	0,49	0,79	-	10,78	28,44	26,68
	BA11	6,26	34,10	-	0,70	-	13,18	21,00	24,76
	BA12	5,56	16,52	1,01	0,94	-	19,52	27,39	28,97
	BA14	6,49	20,25	1,85	1,05	-	15,68	33,10	21,58
	BA149	6,98	16,46	0,35	0,52	-	9,32	32,33	34,04
	BA15	12,23	16,45	0,54	0,90	-	8,05	36,40	25,43
	BA16	7,98	17,24	0,67	1,45	-	13,23	25,95	33,48
	HCC103	6,78	16,87	1,60	1,70	-	10,61	45,11	17,33
	M1	54,08	13,00	-	0,43	-	21,75	7,19	3,55
M4	2,19	7,41	50,92	-	-	4,27	6,61	28,60	
<i>H. seropedicae</i>	M2	12,26	19,11	-	-	-	15,29	30,02	23,32
	SmR1	5,75	21,00	2,96	0,96	-	16,46	32,61	20,26
	X8	14,59	19,53	-	1,74	-	19,02	27,41	17,71
	Z67	13,02	17,54	9,84	0,66	-	13,21	32,25	13,48
<i>Herbaspirillum</i> spp.	BA13	19,45	17,57	1,20	1,31	-	11,88	32,32	16,27
	BA143	9,12	17,16	0,71	1,16	-	11,89	39,16	20,80
	ZA45	13,73	12,63	0,53	1,33	-	15,39	32,47	23,92
<i>H. autotrophicum</i>	DSM732	12,16	25,87	3,57	0,96	-	10,92	39,98	7,14
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	9,73	14,18	2,91	8,91	1,50	21,17	34,66	6,94

* Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise total (TFA 1 M, 8 h, 100 °C), redução (NaBH₄) e acetilação. NOTA: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

TABELA 4 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DOS LPS DE *Herbaspirillum* spp. EXTRAÍDOS NA FRAÇÃO FENÓLICA.

Espécie	Estirpe	Monossacarídeos*						
		Rha	Rib	Fuc	Ara	Man	Glc	Gal
<i>H. rubrisubalbicans</i>	AB7	3,55	14,25	-	1,05	3,95	21,46	55,74
	BA10	-	100	-	-	-	-	-
	BA11	-	100	-	-	-	-	-
	BA12	1,75	22,28	-	-	3,84	13,04	59,09
	BA14	4,48	18,32	-	-	4,32	14,21	58,67
	BA149	1,65	24,66	-	-	5,04	11,25	57,40
	BA15	2,11	14,54	-	-	5,50	14,29	63,56
	BA16	-	68,58	-	-	-	-	31,42
	HCC103	-	100	-	-	-	-	-
	M1	16,75	36,25	-	1,01	20,92	13,82	11,25
M4	2,30	38,34	32,24	-	6,18	10,54	10,40	
<i>H. seropedicae</i>	M2	-	85,93	-	-	-	1,01	13,06
	SmR1	3,57	12,52	-	-	2,38	10,01	71,52
	X8	-	77,35	-	-	1,82	1,89	18,94
	Z67	2,24	13,50	-	-	2,68	11,02	70,56
<i>Herbaspirillum</i> spp.	BA13	-	56,10	-	-	3,60	4,61	35,69
	BA143	-	61,12	-	-	-	6,73	32,15
	ZA45	-	100	-	-	-	-	-
<i>H. autotrophicum</i>	DSM732	-	72,32	3,69	-	-	2,26	21,73
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	-	32,94	6,44	-	-	14,33	46,29

* Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise total (TFA 1 M, 8 h, 100 °C), redução (NaBH₄) e acetilação. NOTA: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

Na TABELA 3 é possível notar que não há semelhança exata entre nenhuma estirpe, no entanto as hexoses, Man, Glu e Gal, estão presentes em todas, sendo o monossacarídeo predominante uma Glc ou Gal, exceto para as estirpes M1 e M4 de *H. rubrisubalbicans*, onde Rha e Fuc são, respectivamente, predominantes. Além disso, Fuc está ausente nas estirpes BA11 e M1 de *H. rubrisubalbicans* e também na M2 e X8 de *H. seropedicae*, assim como a Ara que está ausente na M1 e M4. Xyl (xilose) destaca-se por estar presente somente na estirpe *H. lusitanum* (P6-12). Como descrito anteriormente, essas bactérias são capazes de colonizar hospedeiros diferentes e algumas até mesmo são consideradas patogênicas para hospedeiros susceptíveis, sendo assim as composições monossacarídicas divergentes estão de acordo com o pressuposto da especificidade na capacidade de adesão e colonização das bactérias de acordo com a porção polissacarídica da molécula de LPS.

Como observado na TABELA 4, em quatro estirpes, três de *H. rubrisubalbicans* (BA10, BA11 e HCC103) e uma de *Herbaspirillum* spp. (ZA45), a fração fenólica mostrou somente a presença de ribose (Rib), característica comum de contaminação por RNA, não apresentando, portanto, lipopolissacarídeos. Presumivelmente, portanto, os LPS dessas estirpes são mais hidrofílicos, sendo extraídos na fração aquosa, e supostamente possuindo uma estrutura completa, contendo o lípideo-A, o núcleo e cadeia *O*-antigênica com alto grau de polimerização. Além disso, nota-se que na fração fenólica (TABELA 4) que muitas estirpes, não apresentaram Rha em suas composições. A Rha é um monossacarídeo comumente encontrado na estrutura dos LPS, segundo Raetz (1990).

Além das quatro estirpes que tiveram exclusivamente ribose em sua composição, esse monossacarídeo foi predominante em outras oito estirpes (BA16, M1, M4, M2, X8, BA13, BA143 e DSM732), isso pode ser consequência do protocolo utilizado para a extração dos LPS, embasado no uso de fenol, substância que é similarmente empregada na extração de RNA e presente em vários kits comerciais para essa finalidade como, por exemplo, Trizol (*Invitrogen*®) e Brazol (*Lab Trade*®) que possuem em sua composição de reagentes combinados, além do fenol, clorofórmio e isotiocianato de guanidina.

Em decorrência da abundância de ribose na composição monossacarídica, outros componentes que poderiam estar presentes em pequenas quantidades podem ser mascarados e passarem despercebidos nas análises dos cromatogramas obtidos via GC-MS, isso pode ser observado na TABELA 3, onde notamos valores de monossacarídeos menores que 1% na composição de algumas estirpes, no entanto isso não é uma afirmação absoluta, visto que, esses monossacarídeos também podem ser provenientes de extremidades de cadeias polissacarídicas ou até mesmo não serem procedentes da porção *O*-antigênica e sim do núcleo do LPS. Porém, os monossacarídeos normalmente observados nas composições efetuadas através de derivados alditol acetato são oriundos do fragmento *O*-antígeno, dado que aqueles provenientes do núcleo dos LPS estão desmedidamente em menor proporção, isso se agrava ainda para mais quando o LPS possui um alto grau de polimerização. O grau de polimerização do *O*-antígeno pode ser influenciado por diversos fatores, como condições de crescimento e tempo de incubação.

Além das composições monossacarídicas de ambas as frações resultantes da extração fenol/água foi realizada a composição de ácidos graxos (AGs), com o propósito de se identificar quais AGs integram a porção lípideo-A de cada estirpe. Normalmente essa análise é executada após ser efetuada uma hidrólise branda no LPS, já extraído e purificado. No entanto, esse método demanda uma quantidade geralmente elevada de LPS e ao se

trabalhar com um número amplo de estirpes o tempo para obtenção desses dados seria considerável. Dessa maneira, foi empregado um método denominado de “micro-extração de lipídeo-A” com o intuito de se obter um *screening* dos AGs, esse método, proposto por Wang *et al.* (2010) é realizado somente com 5 mg de células liofilizadas, que são suspensas em tampão acetato de sódio contendo PROK, sendo a mistura centrifugada e o lipídeo-A extraído do precipitado com clorofórmio:metanol (1:1 v/v). Os lipídeos-A assim obtidos foram metilesterificados e analisados via GC-MS (TABELA 5).

TABELA 5 – ÁCIDOS GRAXOS METILESTERIFICADOS DA PORÇÃO LIPÍDEO-A DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum* spp.

Espécie	Estirpe	Derivados FAME					
		16:0	16:1	17:1	18:0	18:1	19:1
<i>H. rubrisubalbicans</i>	AB7	23,19	32,93	4,54	19,22	20,12	-
	BA10	19,81	34,19	3,75	26,03	16,22	-
	BA11	23,83	32,64	4,29	18,30	20,95	-
	BA12	19,87	36,31	3,59	24,84	15,39	-
	BA14	19,34	34,94	2,58	23,33	19,81	-
	BA149	26,94	29,41	4,42	14,72	24,51	-
	BA15	21,74	33,39	4,44	19,81	20,62	-
	BA16	20,29	34,50	3,67	21,96	19,58	-
	HCC103	20,02	36,70	3,04	23,30	16,94	-
	M1	2,44	13,14	-	13,12	67,38	3,92
<i>H. seropedicae</i>	M4	12,51	40,99	-	35,39	11,11	-
	M2	18,75	35,98	7,19	19,80	18,28	-
	SmR1	20,38	38,31	-	20,94	20,37	-
	X8	27,85	28,64	4,87	15,87	22,77	-
	Z67	27,55	33,56	6,07	11,15	21,67	-
<i>Herbaspirillum</i> spp.	BA13	27,15	31,06	4,91	10,95	25,93	-
	BA143	29,37	33,39	1,76	14,64	20,84	-
	ZA45	22,75	32,98	4,09	19,25	20,93	-
<i>H. autotrophicum</i>	DSM732	10,25	43,05	11,58	26,00	9,12	-
<i>H. lusitanum</i>	P6-12	3,85	47,64	17,41	25,82	5,28	-

NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS. O perfil de fragmentação obtido foi comparado com uma biblioteca de padrões “LipidHome”. Disponível em: <<http://www.lipidhome.co.uk/ms/methesters/me-arch/index.htm>>

Na TABELA 5 é possível observar que todas as estirpes contam com os AGs C16:0 (ácido palmítico), C16:1 (ácido palmitoleico), C18:0 (ácido esteárico) e C18:1 (ácido oleico). As poucas variações se encontram em 3 estirpes, M1 e M4 de *H. rubrisubalbicans*

e SmR1 de *H. seropedicae*, onde não se nota a presença do C17:1 (ácido heptadecenóico), além disso, a estirpe M1 é a única que apresenta o C19:1 (ácido nonadecenóico). De acordo com Serrato (2008), pequenas quantidades de C12:0 e β OH-C10:0 são encontradas na porção lipídeo-A dos LPS de *Herbaspirillum* sp., sendo comuns também em outros LPS. O fato de não serem observados pode ser explicado pela grande quantidade dos outros derivados, como o C16:0 e C18:0, comumente encontrados em fosfolipídeos, podendo então serem AGs provenientes de fosfolipídeos de membrana, já que a extração realizada não atua somente sobre o LPS e sim sobre a célula bacteriana por completo. Em análises que dependam do lipídeo-A completo e não somente dos AGs dessa fração, a micro-extração realizada poderia porventura ser suficiente, como no caso de análises via MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*) comumente utilizadas para detecção da presença, ou até mesmo para a identificação, de bactérias gram-negativas em uma amostra, através da comparação dos espectros obtidos com bibliotecas de padrões.

Como relato por Erridge *et al.*, (2002) o perfil eletroforético dos LPS é capaz de nos fornecer algumas informações, como os diferentes níveis de polimerização, onde as bandas apresentam um padrão “*ladder-like*” (em forma de “escada”), bem como o tipo de LPS, já que a ausência desse padrão indica um LPS do tipo R, incompleto ou truncado, sem a presença da porção *O*-antígeno repetitiva. Foram realizadas sucessivas tentativas para a obtenção do perfil eletroforético das vinte estirpes, contudo não foi obtido êxito.

4.2 RESULTADOS DA EXTRAÇÃO EM GRANDE ESCALA

Após as caracterizações químicas gerais realizadas na etapa anterior como um *screening* das vinte estirpes avaliadas neste trabalho, e com base nos resultados obtidos, quatro estirpes foram selecionadas para esta etapa denominada “extração em grande escala”. Houve a necessidade do uso de um protocolo de purificação dos LPS extraídos pelo método fenol-água, dada a presença significativa de ribose nas frações. Segundo Caroff e Karibian (2003), a obtenção de um LPS purificado é essencial para que se possa prosseguir com as análises estruturais. Eles ainda apontam a regularidade de se encontrar contaminantes após as extrações, e indicam os ácidos nucleicos, fosfolipídeos e lipoproteínas como sendo interferentes comuns. Além do mais, esses autores também sustentam ser prudente proceder-se com análises que comprovem a presença dos LPS em uma ou ambas as fases da extração fenol-água. Desse modo, mesmo selecionando a fase aquosa para as análises que serão apresentadas nesta etapa, foi previamente realizada

composições monossacarídicas de ambas as frações (fenólica e aquosa) dos LPS extraídos das estirpes designadas para esta etapa.

As estirpes selecionadas para o cultivo em grande escala foram definidas com base nos resultados preliminares e na representatividade das espécies de *Herbaspirillum* estudadas, sendo escolhidas duas estirpes de *H. rubrisubalbicans* (AB7 e M1), uma de *H. autotrophicum* (DSM732) e uma de *H. lusitanum* (P6-12). Não foi selecionada nenhuma de *H. seropedicae* em razão de já haver trabalhos do grupo de pesquisa, principalmente com a estirpe SmR1 (Serrato, 2008; Serrato *et al.*, 2010; Serrato *et al.*, 2012).

Na TABELA 6 estão descritos os rendimentos das extrações em mg e em porcentagem relativa ao peso de células secas utilizadas. As extrações procederam-se pelo método fenol-água, foram realizados cultivos até a obtenção de aproximadamente 1 g de células secas. Dentre as estirpes utilizadas, somente a AB7 teve o rendimento da fração fenólica superior em relação à fração aquosa. Ainda, o rendimento da extração da estirpe M1 foi consideravelmente maior entre todas as estirpes, destacando também pelos produtos da extração, que foram praticamente extraídos em sua totalidade na fração aquosa.

TABELA 6 – RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES EM GRANDE ESCALA DE LPS DAS FRAÇÕES AQUOSAS (AQ) E FENÓLICAS (FE) DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum*.

Espécie / Estirpe	Rendimento (mg)		Rendimento (%) ^a	
	AQ	FE	AQ	FE
<i>H. rubrisubalbicans</i> / AB7	9,8	12,4	0,85	1,08
<i>H. autotrophicum</i> / DSM732	34,8	20,7	5,53	3,29
<i>H. rubrisubalbicans</i> / M1	98,0	1,4	12,79	0,18
<i>H. lusitanum</i> / P6-12	50,2	13,3	5,29	1,40

NOTA: ^a Rendimento em porcentagem relativa ao peso de células secas utilizadas na extração.

De acordo com Collins e Ferrier (1995), os LPS representam aproximadamente 60% do peso seco da camada externa da membrana bacteriana e cerca de 1% do peso seco total da bactéria. Sendo assim, ao utilizar 1 g de células, seria esperado obter, em média, aproximadamente 10 mg de LPS para cada extração. Valores muito acima dessa média podem indicar possíveis contaminações. Por esse motivo, e também devido aos resultados observados anteriormente em pequena escala, foi adotado um protocolo de purificação objetivando a eliminação de ácidos nucleicos e lipoproteínas, empregando três enzimas, RNase, DNase e Proteinase K (PROK) segundo protocolo proposto por Wang *et al.* (2010). Na TABELA 7 pode-se verificar a eficiência do tratamento de purificação em razão da

ausência do monossacarídeo ribose, característico de contaminações por RNA, em ambas as frações das extrações obtidas para as quatro estirpes selecionadas.

TABELA 7 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DOS LPS DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum* EXTRAÍDOS NAS FRAÇÕES AQUOSA (AQ) E FENÓLICA (FE) APÓS TRATAMENTO COM DNase, RNase E PROK.

Estirpe (Espécie)	Fração	Monossacarídeo*						
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
AB7 (<i>H. rubrisubalbicans</i>)	AQ	1,65	1,81	5,18	-	4,23	77,44	9,69
	FE	2,21	0,23	5,72	-	7,35	63,21	21,28
DSM732 (<i>H. autotrophicum</i>)	AQ	29,47	5,27	0,05	-	15,74	16,69	32,78
	FE	13,37	11,78	1,98	-	6,56	60,10	6,20
M1 (<i>H. rubrisubalbicans</i>)	AQ	64,37	0,06	1,34	0,54	15,14	4,13	14,42
	FE	-	-	-	-	-	-	-
P6-12 (<i>H. lusitanum</i>)	AQ	18,37	2,66	0,87	-	4,51	61,39	12,18
	FE	1,81	18,35	0,93	-	1,82	65,11	11,98

* Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise total (TFA 1M, 8h, 100 °C), redução (NaBH₄) e acetilação. NOTA: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GLC.

É possível observar na TABELA 7 que os monossacarídeos Rha, Fuc, Ara, Man, Gal e Glc estão presentes em ambas as frações de todas estirpes, sendo Xyl exclusiva da estirpe M1 na fração aquosa em quantidade quase insignificante, sendo a Rha a unidade predominante. Gal é o monossacarídeo mais abundante em todas as frações fenólicas, sendo também predominante nas estirpes AB7 e P6-12 na fração aquosa. No entanto essa é a única semelhança entre as frações aquosas, que apresentaram maior grau de diversidade em relação as fenólicas.

O fato de ocorrer a presença do LPS em ambas as frações para as estirpes AB7, DSM732 e P6-12, com base nos resultados obtidos, indica a heterogeneidade dos LPS na superfície bacteriana, podendo ocorrer LPS dos tipos completo, incompleto ou truncados, já que cada um desses podem ser extraídos em frações diferentes na extração fenol-água de acordo com suas características de solubilidade. Isso também pode ser constatado ao se observar a estirpe M1, na qual os LPS foram extraídos exclusivamente na fração aquosa, na FIGURA 11 nota-se que a composição monossacarídica via cromatografia de camada delgada não expressou presença de carboidratos na fração fenólica. Além disso, esta estirpe pode sintetizar LPS homogêneos, que podem apresentarem-se completos e/ou com alto grau de polimerização. Essas afirmações estão de acordo com o perfil eletroforético obtido por Serrato *et al.*, (2010) via DOC-PAGE, onde nota-se a presença de uma grande banda,

a não presença de um perfil normalmente característico de “escada”, indica a homogeneidade dos LPS na superfície bacteriana.

As diferenças observadas nos LPS das quatro estirpes também são reflexo de certa especificidade entre bactéria-hospedeiro. Mesmo pertencentes a mesma espécie, *H. rubrisubalbicans*, AB7 e M1, elas apresentaram diferenças significativas na composição monossacarídica dos LPS, no entanto, essas estirpes foram inicialmente isoladas de *Ananas* spp. (abacaxizeiro) (CRUZ *et al.*, 2001) e *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar) (BALDANI *et al.*, 1996) respectivamente, ambas plantas de regiões tropicais. Já a estirpe P6-12 foi isolada de *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro) (VALVERDE *et al.*, 2003) e a DSM732 foi isolada em vida livre, da água de um pequeno lago eutrófico perto de Neuchâtel (*Neuenburg*), na Suíça (DING e YAKOTA, 2004).

4.2.1 Caracterização Química e Estrutural do LPS da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*

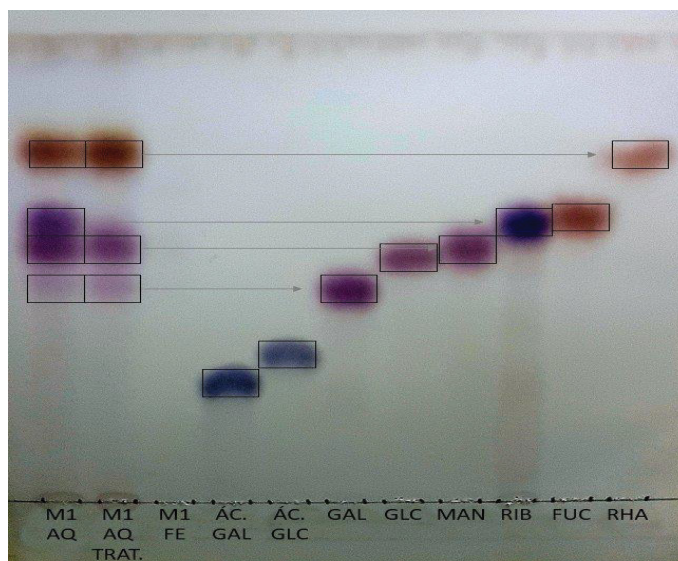
Visto que o rendimento final do LPS purificado é bastante reduzido, cerca de 1% do peso seco das células, faz-se necessário o cultivo de uma quantidade significativa de células para a obtenção de uma quantidade adequada de LPS para a realização de análises de caracterização estrutural. Desta forma, a estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* foi selecionada para dar continuidade à caracterização dos LPS, uma vez que apresentou maior rendimento na extração com relação às demais estirpes analisadas, conforme observado na TABELA 6. Por terem sido extraídos majoritariamente na fração aquosa, esta foi utilizada para dar prosseguimento às análises estruturais, desconsiderando a fração fenólica.

Cultivos sucessivos em grande escala foram realizados para a obtenção de 2 g de células secas de *H. rubrisubalbicans* M1, que foram posteriormente submetidos à extração com fenol:água. Foram obtidos aproximadamente 150 mg de material na fração aquosa, que, após o tratamento enzimático, renderam 100 mg do LPS purificado, um rendimento de 5% relativo ao peso seco de células utilizado inicialmente.

Dado o elevado rendimento obtido, para verificar de forma rápida se o tratamento enzimático havia sido eficaz na remoção de ácidos contaminantes da amostra, 1 mg do material foi totalmente hidrolisado (TFA 1 M, 100 °C, 8 h) e submetido à análise por cromatografia de camada delgada. Para efeitos comparativos, também foram analisadas a fração aquosa bruta do LPS (antes do tratamento enzimático) e a fração fenólica que apresentou um rendimento desconsiderável na extração.

Após o desenvolvimento e revelação da cromatoplaça (FIGURA 11), não foi possível observar a presença de carboidratos na fração fenólica, o que indica a ausência de LPS que contenham a porção *O*-antígeno nesta fração. Na comparação das frações aquosas (bruta e tratada), fica evidente a eficiência do tratamento enzimático na remoção dos ácidos nucléicos contaminantes da amostra devido ao desaparecimento da banda compatível com o monossacarídeo ribose. Ainda, para ambas as frações aquosas, foi possível observar a presença dos monossacarídeos Gal, Glc, Man e Rha.

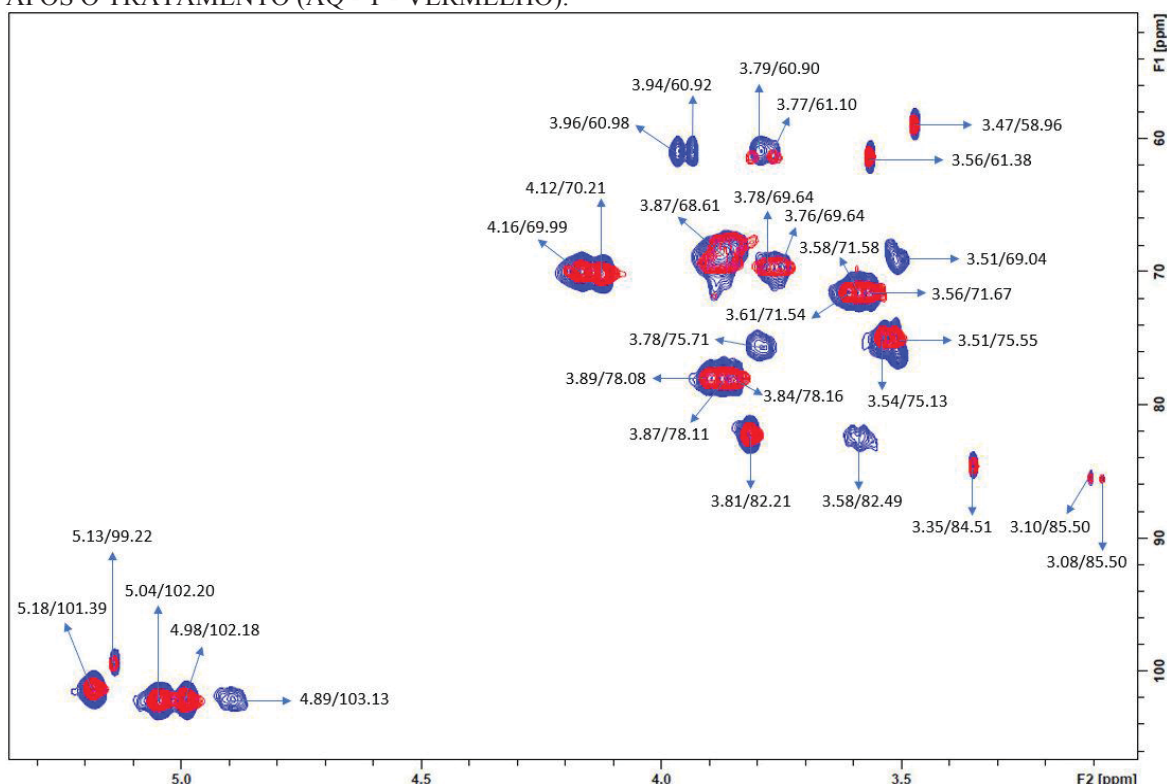
FIGURA 11 – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NOS LPS EXTRAÍDOS DE *H. rubrisubalbicans* M1



NOTAS: M1 AQ: Fração aquosa; M1 AQ TRAT: Fração aquosa após tratamento enzimático; M1 FE: Fração fenólica. Fase estacionária: sílica (SiO₂). Fase móvel: acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v) (HOUGH e JONES, 1962). Revelador: orcinol - ácido sulfúrico 5% em etanol a 100 °C.

Com a intenção de verificar se a amostra apresentou outras alterações além da remoção da ribose, as amostras da fração aquosa antes e depois do tratamento enzimático foram submetidas à análise de RMN. A FIGURA 12 mostra os espectros sobrepostos de correlação heteronuclear (HSQC) da fração aquosa bruta (azul) e após o tratamento enzimático (vermelho). Observando os espectros obtidos, nota-se que a sobreposição dos sinais mostra diferenças em apenas cinco sinais principais, sugerindo serem relativos à presença de um monossacarídeo do tipo pentose. O sinal na região anomérica em 103,13/4,89 (C1/H1), que desaparece na amostra tratada enzimaticamente, sugere uma configuração anomérica do tipo β , tal qual é encontrada nas unidades de ribose que formam as cadeias de RNA. Os demais sinais de correlação atribuídos às unidades de ribose removidas da amostra purificada foram: 75,71/3,78 (C2/H2), 69,04/3,51 (C3/H3), 82,49/3,58 (C4/H4) e o duplete 60,92/3,94 e 60,98/3,96 (C5/H5).

FIGURA 12 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) DOS LPS EXTRAÍDOS DE *H. rubrisubalbicans* M1, ANTES DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO (AQ - AZUL) E APÓS O TRATAMENTO (AQ - T - VERMELHO).



NOTAS: Tratamento com DNase, RNase e PROK. Calibração do espectro com padrão interno de acetona em 2,22 ppm (^1H) e 30,20 ppm (^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm.

As correlações de sinais de RMN observados sobrepostos para a fração aquosa, antes (AQ) e após o tratamento (AQ – T), mostram quatro sinais na região anomérica em 99,22/5,13, 101,34/5,18, 102,18/4,98 e 102,20/5,04, consistentes com unidades monossacarídicas em configuração anomérica β (FIGURA 12). Também é possível observar os demais sinais sobrepostos presentes na região de C6/H6 (60,90/3,79 e 61,10/3,77), bem como as correlações intra-anel dos monossacarídeos (C2/H2 a C5/H5), em 58,96/3,47, 61,38/3,56, 68,61/3,87, 71,54/3,61, 71,58/3,58, 71,67/3,56, 78,08/3,89, 78,11/3,87, 78,16/3,84, 82,21/3,81, 84,51/3,35, 69,64/3,78, 69,64/3,76, 75,13/3,54, 75,55/3,51, 85,50/3,08 e 85,50/3,10.

Dado o perfil observado no espectro de RMN, além da presença dos LPS na fração aquosa, é possível que outros polissacarídeos possam estar presentes, em especial exopolissacarídeos. James *et al.* (1997) relatam o fato da espécie *H. rubrisubalbicans* gerar colônias mucosas em meio sólido, o que indica a produção de EPS em uma quantidade visivelmente superior àquelas encontradas no cultivo de *H. seropedicae*.

A fim de verificar esta hipótese e na tentativa de separar polissacarídeos de tamanhos diferentes eventualmente encontrados na fração, a saber, LPS e EPS, o material

(70 mg) foi submetido à diálise fechada, utilizando uma membrana com limite de exclusão de 6000 – 8000 Da, contra água destilada, por 72 h, e trocas sucessivas de água. Após a liofilização do material retido e eluído (50,5 mg e 12,5 mg, respectivamente), foram realizadas análises de composição monossacarídica nas duas novas frações obtidas (TABELA 8). A fração retida apresentou Rha em maior proporção (60%) seguida de Man (31,2%), Gal (7,3%) e Glc (1,3%) em sua composição. No material eluído da diálise foi possível observar uma composição monossacarídica bastante diferente, sendo está formada principalmente por Gal (37,3%), Glc (24,0%) e Man (16,5%), além de apresentar também Xyl, Rha, Ara e Fuc em menores quantidades.

TABELA 8 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DAS FRAÇÕES RETIDA E ELUÍDA APÓS DIÁLISE DA FRAÇÃO AQUOSA TRATADA (AQ – T) DOS LPS DE *H. rubrisubalbicans* M1.

Monossacarídeo**	Rt (min)	Amostra		
		Fração AQ Bruta	Fração AQ-T Retida*	Fração AQ-T Eluída*
Rha	14,655	39,42	60,06	9,16
Rib	14,695	38,76	-	-
Fuc	14,810	0,04	-	0,64
Ara	14,870	0,82	-	2,43
Xyl	15,080	0,33	-	9,93
Man	18,010	9,27	31,26	16,48
Glc	18,065	8,83	1,35	24,05
Gal	18,235	2,53	7,33	37,31

NOTA: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

* Após tratamento enzimático e diálise em MWCO 6-8 kDa.

** Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise total (TFA 1 M, 8 h, 100 °C), redução (NaBH₄) e acetilação.

Em geral, as moléculas de EPS são geralmente maiores e mais polidispersas do que as moléculas de LPS, que, de acordo com a literatura, possuem massa média variando entre 3,5 e 20 kDa. Desta forma, é esperado que o LPS de *H. rubrisubalbicans* M1, extraído na fração aquosa após a extração, fosse recuperado na fração eluída após a diálise. No entanto, durante o processo de extração fenol-água do LPS, sobre temperatura e agitação, algum resíduo de EPS pode ter sido extraído conjuntamente, já que, segundo Stacey e Barker (1960) após a biossíntese, estas moléculas podem permanecer em contato com as células, na forma de polissacarídeos capsulares, mesmo após a lavagem das células com salina. Dessa forma, fragmentos de EPS que estejam eventualmente associados às células bacterianas podem ter sido eluídos simultaneamente com o LPS, mascarando a análise de composição monossacarídica do mesmo.

A análise dos derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados da fração aquosa tratada retida (TABELA 9) e aquosa tratada eluída (TABELA 10) confirmam o pressuposto de que as frações não são compostas exclusivamente de uma única molécula, pois os resultados obtidos são desconexos, já que a soma dos terminais redutores é incompatível com as ramificações.

TABELA 9 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO RETIDA EM DIÁLISE (AQ-T Retida) OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LPS DE *H. rubrisubalbicans* M1

PMAA ^a	Rt (min)	Ligação Glicosídica	%
2,3,4-Me ₃ -Rha	10,825	t-Rhap-(1→	3,15
3,4-Me ₂ -Rha	12,271	→2)-Rhap-(1→	21,74
2,4-Me ₂ -Rha	12,517	→3)-Rhap-(1→	30,10
2,3,4,6-Me ₄ -Man	12,975	t-Manp-(1→	19,56
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	13,282	t-Galp-(1→	16,29
2,3,6-Me ₃ -Glc	14,414	→4)-GlcP-(1→	3,74
2,4,6-Me ₃ -Man	14,494	→3)-Manp-(1→	2,13
2,4-Me ₂ -Man	16,250	→3,6)-Manp-(1→	3,29

NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.
^a Derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados.

TABELA 10 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO ELUÍDA EM DIÁLISE (AQ-T Eluída) OBTIDA APÓS EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LPS DE *H. rubrisubalbicans* M1

PMAA ^a	Rt (min)	Ligação Glicosídica	%
2,3,4-Me ₃ -Rha	10,821	t-Rhap-(1→	1,43
2,3,4-Me ₃ -Fuc	11,315	t-Fucp-(1→	0,84
3,4-Me ₂ -Rha	12,258	→2)-Rhap-(1→	6,10
2,3-Me ₂ -Ara	12,358	→4)-Arap-(1→	3,25
2,4-Me ₂ -Rha	12,503	→3)-Rhap-(1→	2,35
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	12,906	t-GlcP-(1→	14,44
2,3,4,6-Me ₄ -Man	12,962	t-Manp-(1→	3,50
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	13,051	→4)-Galp-(1→	1,47
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	13,267	t-Galp-(1→	2,01
3,5-Me ₂ -Ara	14,174	→2)-Araf-(1→	1,85
3,5-Me ₂ -Xyl	14,234	→2)-Xylf-(1→	2,96
3,4,6-Me ₃ -Man	14,255	→2)-Manp-(1→	1,04
2,3,4-Me ₃ -Glc	14,326	→6)-GlcP-(1→	3,16
2,3,6-Me ₃ -Gal	14,405	→4)-Galp-(1→	44,46
2,3,4-Me ₃ -Man	14,750	→6)-Manp-(1→	2,72
2,3,5-Me ₃ -Man	15,086	→6)-Galf-(1→	6,05
2,3,4-Me ₃ -Gal	15,183	→6)-Galp-(1→	2,37

NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.
^a Derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados.

Após a hidrólise branda (HB) das frações aquosas eluída e retida (AQ-T Retido e AQ-T Eluído) com ácido acético 1% durante 40 min a 100 °C, o material foi resfriado e centrifugado para separação do lipídeo-A, presente como precipitado insolúvel em água, e da porção *O*-polissacarídica do LPS, no sobrenadante. Para ambas as frações, o material solúvel apresentou rendimento mais expressivo em relação ao precipitado. Ambas as frações solúveis da HB foram posteriormente submetidas à precipitação etanólica a fim de separar os polissacarídeos de eventuais contaminantes de baixa massa.

A TABELA 11 mostra que as amostras precipitadas com etanol (PptEt-Sbn-HB) são claramente diferentes das amostras solúveis em álcool (SbnEt-Sbn-HB) tanto para a fração AQ-T Retida quanto para AQ-T Eluída. Para a amostra AQ-T Eluído, observa-se a presença principalmente de Rha (22%), Man (21%), Glc (28%) e Gal (25%) na fração PptEt-Sbn-HB, enquanto que a fração SbnEt-Sbn-HB mostra apenas Rha (28%) e Gal (67%). Já as frações PptEt-Sbn-HB e SbnEt-Sbn-HB da amostra AQ-T Retido mostraram a presença de Rha, Man, Glc e Gal em diferentes proporções, sendo ambas formadas principalmente por Rha (55% e 57%, respectivamente). A semelhança encontrada nestas duas amostras pode indicar que se trata de uma mesma molécula, no entanto, supostamente fragmentada em tamanhos diferentes, pois uma porção está precipitada e outra solúvel, indicando que possuem massas diferentes.

TABELA 11 – COMPOSIÇÕES MONOSSACARÍDICAS DAS PORÇÕES O-ANTÍGENO OBTIDOS APÓS HIDRÓLISE BRANDA DOS LPS EXTRAÍDOS DE *H. rubrisubalbicans* M1, SEGUIDAS DE PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA.

Monossacarídeos**	AQ-T Eluído		AQ-T Retido	
	PptEt Sbn-HB	SbnEt Sbn-HB	PptEt Sbn-HB	SbnEt Sbn-HB
Rha	22,27	28,29	55,13	57,39
Fuc	2,64	-	-	-
Ara	-	4,52	-	-
Man	21,01	-	30,82	5,30
Glc	28,43	-	4,53	33,83
Gal	25,65	67,19	9,52	3,48

NOTA: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

** Derivados alditol acetato obtidos após hidrólise total (TFA 1M, 8h, 100 °C), redução (NaBH₄) e acetilação.

A fim de compreender melhor a natureza dos polissacarídeos existentes nas quatro frações descritas anteriormente, estas foram submetidas à análise de metilação para verificação das ligações glicosídicas presentes. Os derivados PMAA obtidos para cada fração são mostrados a seguir (TABELAS 12 – 15).

Os derivados PMAA encontrados para a fração PptEt-Sbn-HB da amostra AQ-T Eluída (TABELA 12) mostraram-se compatíveis com a composição monossacarídica para esta fração, exceto pela quantidade de Man que foi significativamente menor (~11%) do que os 21% observados anteriormente. Destacam-se nesta fração os derivados 2-*O*-Rhap (15,8%) e 4-*O*-Glc_p (13,1%), além dos terminais de Rha (10,8%) e Gal (23,8%). Os derivados 4,6-*O*-Man_p e 4,6-*O*-Glc_p também foram encontrados (1,8 e 5,8%, respectivamente), indicando possíveis ramificações no polissacarídeo desta fração.

TABELA 12 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T ELUÍDA PRECIPITADA APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T ELUÍDA PptEt Sbn-HB).

PMAA ^a	Rt (min)	Ligação Glicosídica	%
2,3,4-Me ₃ -Rha	12,750	t-Rhap-(1→	10,80
3,4-Me ₂ -Rha	14,214	→2)-Rhap-(1→	15,76
2,3-Me ₂ -Fuc	14,276	→4)-Fuc _p -(1→	1,14
2,4-Me ₂ -Fuc	14,459	→3)-Fuc _p -(1→	1,79
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	14,876	t-Galp-(1→	23,84
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	14,929	t-Glc _p -(1→	2,78
2,3,4,6-Me ₄ -Man	15,235	t-Man _p -(1→	4,92
3,4,6-Me ₃ -Glc	16,157	→2)-Glc _p -(1→	1,07
3,4,6-Me ₃ -Man	16,211	→2)-Man _p -(1→	2,78
2,3,6-Me ₃ -Gal	16,299	→4)-Gal _p -(1→	2,69
2,3,6-Me ₃ -Glc	16,387	→4)-Glc _p -(1→	13,06
2,3,4-Me ₃ -Glc	16,702	→6)-Glc _p -(1→	4,79
2,3,4-Me ₃ -Man	16,746	→6)-Man _p -(1→	2,03
2,3,5-Me ₃ -Gal	17,079	→6)-Gal _f -(1→	1,55
2,3,4-Me ₃ -Gal	17,175	→6)-Gal _p -(1→	3,36
2,3-Me ₂ -Man	17,868	→4,6)-Man _p -(1→	1,84
2,3-Me ₂ -Glc	17,929	→4,6)-Glc _p -(1→	5,80

NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

^a Derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados.

A TABELA 13 mostra os resultados de derivados PMAA obtidos para a fração SbnEt-Sbn-HB, derivada da amostra AQ-T Eluída. Conforme esperado, foi a única das quatro frações a apresentar derivados per-*O*-metilados de arabinose (t-Araf – 6,6%), uma vez que mostrou conter este monossacarídeo em sua composição. O derivado mais abundante observado nesta amostra foi 2-*O*-Rhap (31,2%), seguido por t-Galp (21,5%).

Interessantemente, esta fração apresentou unidades de Gal 6-*O*-substituídas tanto na configuração *p* (6,4%) quanto na configuração *f* (18,4%).

TABELA 13 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T ELUÍDA SOBRENADANTE APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T ELUÍDA SbnEt Sbn-HB).

PMAA ^a	Rt (min)	Ligação Glicosídica	%
2,3,4-Me ₃ -Rha	12,751	t-Rhap-(1→	10,34
3,4-Me ₂ -Rha	14,213	→2)-Rhap-(1→	31,20
2,3,5-Me ₃ -Ara	14,324	t-Araf-(1→	6,59
2,4-Me ₂ -Rha	14,465	→3)-Rhap-(1→	5,46
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	14,878	t-Galp-(1→	21,54
2,3,4-Me ₃ -Gal	16,693	→6)-Galp-(1→	6,42
2,3,5-Me ₃ -Gal	17,076	→6)-Gal f -(1→	18,45

NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

^a Derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados.

Nos derivados PMAA observados para a fração PptEt-Sbn-HB da amostra AQ-T Retida (TABELA 14) nota-se a presença principalmente de 4-*O*-Man p (34,7%), 2-*O*-Rhap (22.1%), 3-*O*-Rhap (18,6%) e 2-*O*-Gal p (11.7%). Estes resultados não são compatíveis com as proporções observadas anteriormente para a composição monossacarídica desta amostra. Isso pode ser devido à pequena quantidade de material disponível que foi utilizado no processo de metilação.

TABELA 14 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T RETIDA PRECIPITADA APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T RETIDA PptEt Sbn-HB).

PMAA ^a	Rt (min)	Ligação Glicosídica	%
3,4-Me ₂ -Rha	14,221	→2)-Rhap-(1→	22,06
2,4-Me ₂ -Rha	14,470	→3)-Rhap-(1→	18,64
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	14,938	t-Glcp-(1→	7,20
2,3,4,6-Me ₄ -Man	15,240	t-Man p -(1→	5,66
3,4,6-Me ₃ -Gal	16,219	→2)-Galp-(1→	11,70
2,3,6-Me ₃ -Man	16,394	→4)-Man p -(1→	34,74

NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.

^a Derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados.

Das quatro frações derivadas das amostras de AQ-T Retida e AQ-T Eluída, a fração que apresentou maior rendimento foi a SbnEt-Sbn-HB derivada de AQ-T Retida. Os resultados dos derivados PMAA obtidos para esta fração são mostrados na TABELA 15.

A presença de grande quantidade de Rha nesta fração é evidente, confirmando o que havia sido observado em sua composição monossacarídica. As unidades de Rha presentes encontram-se 2-*O*- (15,5%), 3-*O*- (51,1%) e 2,3-*O*-substituídas (1,45%). Também se observa a presença de terminais de Glcp (15,8%), além de pequenas quantidades de derivados de Manp e Galp.

TABELA 15 – ANÁLISE DOS DERIVADOS PMAA DA FRAÇÃO AQ-T RETIDA SOBRENADANTE APÓS PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DA PORÇÃO SOBRENADANTE OBTIDA POR HIDRÓLISE BRANDA (AQ-T RETIDA SbnEt Sbn-HB).

PMAA ^a	Rt (min)	Ligação Glicosídica	%
3,4-Me ₂ -Rha	14,221	→2)-Rhap-(1→	16,51
2,4-Me ₂ -Rha	14,473	→3)-Rhap-(1→	51,09
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	14,937	t-Glcp-(1→	15,81
2,3,4,6-Me ₄ -Man	15,244	t-Manp-(1→	7,29
4-Me-Rha	15,518	→2,3)-Rhap-(1→	1,45
2,3,6-Me ₃ -Man	16,395	→4)-Manp-(1→	2,08
2,4,6-Me ₃ -Glc	16,473	→3)-Glcp-(1→	2,91
2,4-Me ₂ -Gal	18,249	→3,6)-Galp-(1→	2,86

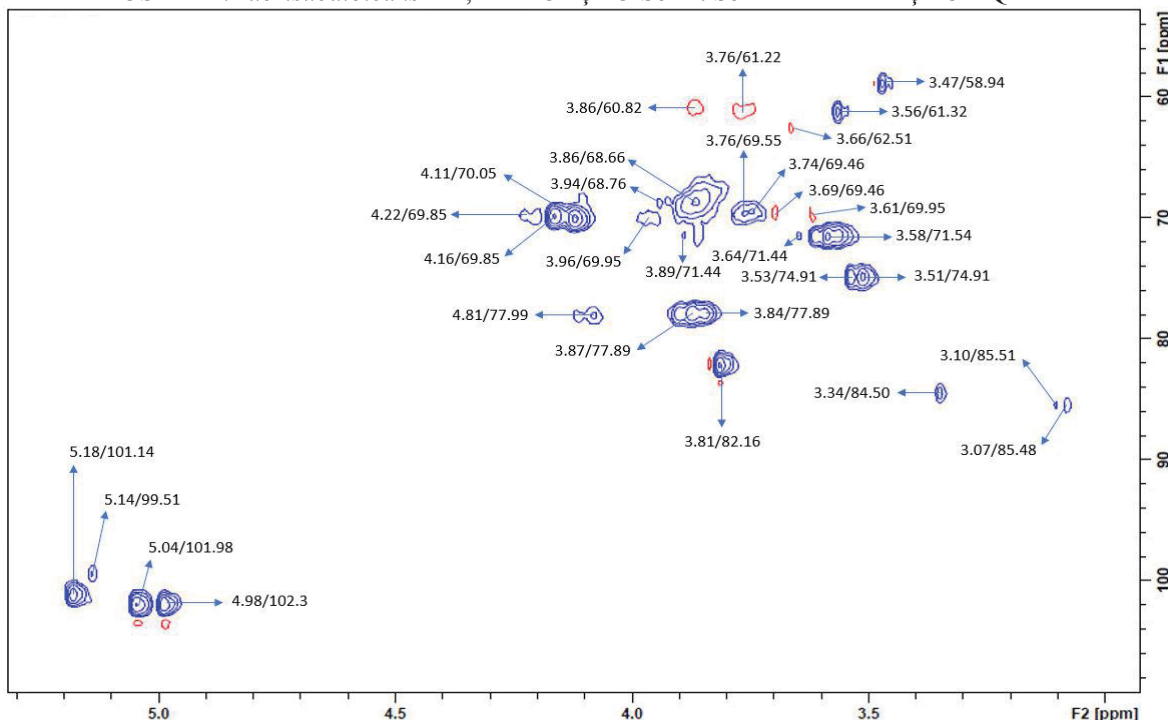
NOTAS: Valores mostrados em %, relativos à soma das áreas dos sinais encontrados em GC-MS.
^a Derivados alditol acetato parcialmente *O*-metilados.

Como observado, todas as frações apresentam diferenças entre os derivados obtidos e, em alguns casos, a elevada presença de terminais não redutores é incompatível com a quantidade de ramificações observadas. Isso pode indicar a presença de contaminantes de mesma massa que o *O*-antígeno, que podem ser derivados de EPS ou outros polissacarídeos capsulares, ou ainda indicar que o processo de per-*O*-metilação para a obtenção dos derivados PMAA não foi totalmente eficiente. Portanto, se faz necessário realizar novas análises para confirmação dos dados observados.

Devido ao baixo rendimento das amostras não foi possível realizar as análises de RMN para todas as amostras. Somente a fração SbnEt-Sbn-HB da amostra AQ-T Retida foi submetida à análise de HSQC-DEPT. No espectro de correlação heteronuclear (HSQC) da FIGURA 13 observa-se quatro sinais na região anomérica em 99,51/5,14, 101,14/5,18, 101,98/5,04 e 102,30/4,98, consistentes com unidades monossacarídicas em configuração anomérica β . Também é possível observar os demais sinais sobrepostos presentes na região de C6/H6 (60,82/3,86 e 61,22/3,76), que não foram deslocados na análise de DEPT135, indicando a presença de ligações C6/H6 livres, no entanto a presença de dois outros sinais invertidos em 69,46/3,69 e 69,95/3,61 indicam a presença

de ligação em C6/H6, Além disso, é possível observar as correlações intra-anel dos monossacarídeos (C2/H2 a C5/H5), em 58,94/3,47, 61,32/3,56, 69,55/3,76, 69,46/3,74, 71,44/3,64, 71,54/3,58, 71,91/3,53, 74,91/3,51, 68,66/3,86, 68,76/3,94, 69,95/3,96, 71,44/3,89, 70,05/4,11, 69,85/4,22, 69,85/4,16, 77,99/4,81, 77,89/3,87, 77,89/3,84, 82,16/3,81, 84,50/3,34, 85,51/3,10 e 85,48/3,07. É possível notar que o espectro da FIGURA 13 é muito semelhante ao da FIGURA 13, isso é reflexo do rendimento da porção SbnEt-Sbn-HB da fração AQ-T Retida muito superior as demais frações.

FIGURA 13 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) DOS LPS EXTRAÍDOS DE *H. rubrisubalbicans* M1, DA PORÇÃO SbnEt Sbn-HB DA FRAÇÃO AQ-T RETIDA



NOTAS: Tratamento com DNase, RNase e PROK. Calibração do espectro com padrão interno de acetona em 2,22 ppm (^1H) e 30,20 ppm (^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm. Em vermelho: DEPT135

Através dos resultados obtidos, que se mostraram inconclusivos para as caracterizações estruturais do *O*-antígeno do LPS da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*, sugere-se o emprego de técnicas de cromatografia para a separação de moléculas que compõem a amostra, como contaminantes e o LPS de interesse. Um exemplo é a cromatografia de gel filtração para o fracionamento das prováveis misturas de moléculas ou fragmentos derivados de estruturas além dos LPS. Essa técnica cromatográfica poderia ser empregada antes da hidrólise branda, a fim de isolar o LPS, que posteriormente poderia ser identificado no perfil de eluição através de análises visando detectar ácidos graxos; ou ser realizada após a hidrólise branda, a fim de isolar o *O*-antígeno.

5 CONCLUSÕES

- A utilização da metodologia clássica de extração de LPS para bactérias gram-negativas mostrou, neste trabalho, que a maior parte dos LPS extraídos das diferentes espécies de *Herbaspirillum* foi obtida na fração aquosa, indicando que se tratam de lipopolissacarídeos do tipo “smooth”, que apresentam o O-antígeno com alto grau de polimerização;
- A composição monossacarídica observada para os LPS extraídos de diferentes espécies de *Herbaspirillum* mostra uma grande variabilidade intra- e inter-espécies. A presença de derivados alditol acetato relativos às unidades de Rha, Man, Gal e Glc, entretanto, é observada em todas as espécies estudadas;
- A mesma variabilidade estrutural é observada na composição de ácidos graxos nas porções de lipídeo-A isoladas para as diferentes espécies. Estranhamente, contudo, não foi possível observar a presença de ácidos graxos hidroxilados em nenhuma das estirpes analisadas;
- Os procedimentos de purificação através de tratamento enzimático, utilizando Proteinase K, DNase e RNase, foram eficientes na remoção de contaminantes das frações aquosas contendo LPS, especialmente na remoção de ácidos nucleicos (RNA);
- Duas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, AB7 e M1, apresentaram composições monossacarídicas bastante distintas nas frações aquosas contendo LPS quando cultivadas em grande escala. A variabilidade estrutural inter-espécies também foi observada para as demais estirpes de *H. autotrophicum* e *H. lusitanum* cultivadas em grande escala;
- O processo de fracionamento e purificação das porções lipídeo-A e O-antígeno dos LPS, realizados após hidrólise branda, diálise e precipitação etanólica, podem não ter sido suficientes para eliminar contaminantes derivados de EPS ou KPS;
- As análises químicas e espectroscópicas mais aprofundadas das frações contendo o LPS extraído de *H. rubrisubalbicans* M1, mostraram que a composição monossacarídica desta molécula é formada majoritariamente por Rha, Man e Glc, corroborando resultados anteriormente descritos na literatura;
- Baseado nas análises de metilação e RMN das frações contendo o LPS extraído de *H. rubrisubalbicans* M1, sugere-se que a porção O-polissacarídica possui uma

cadeia principal formada por unidades de β -Rhap 2-*O* e 3-*O* substituídas, bem como de β -Manp 4-*O*-substituídas;

- Também se observa para este *O*-polissacarídeo a presença de outras ligações glicosídicas em menor proporção, tal como unidades de 6-*O*-Gal, e ramificações em unidades de Rha (2,3-*O*-Rhap), Gal (3,6-*O*-Galp), Glc 4,6-*O*-Glc p) e Man (4,6-*O*-Manp).

REFERÊNCIAS

- AHAGNO, M.; SCHLEGEL, H. G. *Aquaspirillum autotrophicum*, a New Species of Hydrogen-Oxidizing, Facultatively Autotrophic Bacteria. **Int. J. Of Systematic Bacteriolog.** V. 28, N. 1. p. 112-116. 1978.
- ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. **Dissertação de Mestrado** (Ciências – Agronomia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. 65p. 2007.
- ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **App. Environ. Microbiol.**, v. 19, p. 253-260, 1993.
- ASPINALL, G. O. (1970) Other carbohydrate containing macromolecules. In: **Polysaccharides**, Ed. G.O. ASPINALL, Pergamon Press, pp. 223.
- 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. **Int J Syst Evol Microbiol**, 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. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumen plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, n. 5, p. 911-922, 1997.
- 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. **Int J Syst Evol Microbiol**, 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. (1996) Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. **Tese de Doutorado**, Seropédica, RJ, UFRRJ.
- BALSANELLI, E. Caracterização de fatores moleculares envolvidos na interação de *Herbaspirillum seropedicae* com gramíneas). **Tese de doutorado** (Ciências - Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 174p., 2013.
- BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; BAURA, V. A.; SASSAKI, G. L.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ. Microbiol.** v. 12, p. 2233–2244, 2010.
- BARRAQUIO, W. L.; GUZMAN, M. R.; BARRION, M.; WATANABE, E. I. Population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland and dryland rice. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 42, p. 124-128, 1982.
- BARRAQUIO, W. L.; LADHA, J. K.; WATANABE, I. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 867-873, 1983.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can J Microbiol.** V. 50, p. 521– 577. 2004.

- BEN – Balanço Energético Nacional 2006: Ano base 2005. Relatório final / Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro: EPE, 188 p, 2006.
- BHATTACHARJEE, R. B.; MUKHOPADHYAY, S. N.; SINGH, A. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 80, p. 199-209, 2008.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 28, p. 1327-1350, 2012.
- BHAT, U. R.; CARLSON, R. W. Chemical characterization of pH-dependent structural epitopes of lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2230-2235, 1992.
- BHAT, U. R.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 14402-14410, 1994.
- BODDEY, R. M.; DE OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil.** v. 174, p. 195-209, 1995.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiol. Mol. Bio. Rev.** v. 69, p.155-194, 2005.
- BROUGHTON, W. J. *et al.* Flavonoid-Inducible Modifications to Rhamnan O Antigens Are Necessary for *Rhizobium* spp Strain NGR234-Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology.** v. 188, p. 3654-3663, 2006.
- BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 26, p. 91–110, 2000.
- CARLSON, R. W.; REUHS, B. L.; CHEN, T. B.; BHAT, U. R.; NOEL, K. D. Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 11783-11788, 1995.
- CARLSON, R. W.; REUHS, B. L.; FORSBERG, L. S.; KANNENBERG, E. L. (1999) Rhizobial cell surface carbohydrates: their structures, biosynthesis, and functions, In: **Genetics of bacterial polysaccharides**. Ed. J.B. GOLDBERG, Ann Arbor Press, Ann Arbor, p. 53-90.
- CARLSON, R. W.; SHATTERS, R.; DUH, J. L.; TURNBULL, E.; HANLEY, B.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC, M. A. The isolation and partial characterization of the lipopolysaccharide from several *Rhizobium trifolii* mutants affected in root hair infection. **Plant Physiol.**, v. 84, p., 421-427, 1987a.
- CARLSON, R. W.; KALEMBASA, S. TUROWSKI, D.; PACHORI, P.; NOEL, K. D. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 4923-4928, 1987b.
- CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research.** v. 338, p. 2431-2447, 2003.
- 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. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 62, p. 1300-1306, 2012.
- CHOUDHURY, B.; CARLSON, R. W.; GOLDBERG, J. B. The structure of the lipopolysaccharide from a *galU* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* serogroup- O11. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2761-2772, 2005.
- CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugar-cane in Louisiana. **J. Agricult. Res.**, v. 41, p. 256, 1932.

CIUCANU, J.; KEREC, F. Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209–217, 1984.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. de. Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação. 2 ed. aum. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 71, p. 1-9, set. 1995. Arquivo do Agrônomo, Piracicaba, n. 2, set. 1995.

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

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira grãos, v. 7 Safra 2019/20 - Segundo levantamento. **Comp. Nacional de Abastecimento**. Brasília, p. 1-25, novembro, 2019.

CRUZ, L. M. *et. al.* 16S ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa sp.*) and Pineapple (*Ananas Comosus* (L.) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DEL GALLO, M.; NEGI M.; NEYRA, C. A. Calcofluor-binding and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** v. 171, p. 3504–3510, 1989.

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

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H. M.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R.; LUGTENBERG, B. J. J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 15, p. 1173-1180, 2002.

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. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, p. 2223-2230, 2004.

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

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

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

DOBRIKSA, 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. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, p. 1418-1426, 2010.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T.; MITSUI, H., MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl Environ Microbiol.** v. 67, p. 5285-93, 2001.

EMBRAPA. Sistemas de produção 8. Versão Eletrônica. 2. Ed. 2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1002129/1/Adubacao.pdf>. Acessado em: 23/11/2019.

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

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

FAO. Fao statistical yearbook 2013 world food and agriculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, p. 307, 2013.

FAO. How to feed the world in 2050. High level expert forum. **Convened at FAO Headquarters in Rome on 12-13 October**, 2009.

FEDONENKO, Y. P.; ZATONSKY, G. V.; KONNOVA, S. A.; ZDOROVENKO, E. L.; IGNATOV, V. V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 869-872, 2002.

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

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

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

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

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

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

GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., REDDY P. M., LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**. v. 154, p. 131-145, 2002.

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

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

HALVERSON, L. J., STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interactions. **Microbiol Rev.** v. 50, n. 2, p. 93-225, 1986.

HELLRIEGEL, H: Unters. über d. Stickstoffnahrung. **Landw. Vers.-Stnt.**, Bd. xxxiii, 1886

HELLRIEGEL, H.; WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. **Beilageheft zu der Ztschr.** Ver. Rübenzucker-Industrie Deutschen Reichs. 1888.

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

HITCHCOCK, P. J.; BROWN, T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. **J Bacteriol.** V.154, ed. 1, p. 269-277, 1983.

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil** V. 331, p.413–425. 2010.
- HUREK, T.; HANDLEY, L. L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHÉ, Y. Azoarcus grass endophyte contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Mol. Plant Microbe Interac.** v. 15, p. 233–244, 2002.
- 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**, v. 1, p. 21–31, 1962.
- IM, W. T.; BAE, H. S.; YOKOTA, A.; LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, p. 851–855, 2004.
- INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Mol. Plant Microbe Interac.** v. 17, p. 1078–1085, 2004.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**. v. 48, n. 308, p. 785–797, 1997.
- 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.
- JANSSON, P. E.; LINDBERG, A. A.; LINDBERB, B.; WOLLIN, R. Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from Enterobacteriaceae. **Eur. J. Biochem.**, v. 115, p. 571–577, 1981.
- JOFRÉ, E.; LAGARES, A.; MORI, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol.** v. 231, p. 267–275, 2004.
- 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.
- KANNENBERG, E. L.; REUHS, B. L.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. (1998) Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: **The Rhizobiaceae**. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, pp. 154.
- KARUNARATNE, D. N.; RICHARDS, J. C.; HANCOCK, R. E. W. Characterization of lipid A from *Pseudomonas aeruginosa* O-antigenic B band lipopolysaccharide by 1D and 2D NMR and mass spectral analysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 299, p. 368–376, 1992.
- KASAI, N.; ARATA, S.; MASHIMO, J.; AKIYAMA, Y.; TANAKA, C.; EGAWA, K.; TANAKA, S. *Pseudomonas diminuta* LPS with a new endotoxic lipid A structure. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 142, p. 972–978, 1987.
- KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. W.; MARLOW, O. C.; ROBERTS, P. D. The opsX locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of liposaccharide and extracellular polysaccharide. **J. Bacterial.** v. 175, p. 5839–5580, 1993.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 157–168, 2001.
- KONNOVA, S. A.; MAKAROV, O. E.; SKVORTSOV, I. M.; IGNATOV, V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interaction. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 118, p. 93–99, 1994.

- LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 1301-1308, 1983.
- LADHA, J. K.; REDDY, P. M. Extension of nitrogen fixation to rice necessity and possibilities. **GeoJournal**, v. 35, p. 363-372, 1995.
- 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-bacterial interactions. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 46, p. 307-46, 1992.
- LE QUÉRÉ, A., DEAKIN, W. J., SCHMEISSER, C., CARLSON, R. W., STREIT, W. R., BROUGHTON, W. J., FORSBERG, L. S. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234. **J. Biolol. Chem.** v. 281, ed. 39, p. 28981-992, 2006.
- LIMPENS, E.; FRANKEN, C.; SMIT, P.; WILLEMSE, J.; GEURTS, R. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. **Science**, v. 302, p. 630-633, 2003.
- LOVE, M. J.; BHANDARI, D.; DOBSON, R. C. J.; BILLINGTON C. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production an clinical care. **Antibioticts**, v, 7, ed. 17. p. 1-25. 2018.
- LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O.; STAUBE, A. M.; NIKAIDO, H. (1971) Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolisaccharides. In: **Microbial Toxins**, Ed. G. WEINBAUM, S. KADIS, S.J. ALI, Academic Press, New York, v. 4, capitulo 4, p. 145-233.
- MAADG, R. A.; LUGTENBERG, B. J. J. (1989) Lipopolysaccharide: a signal in the establishment of the rhizobium/legume symbiosis? In: **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions**. Ed. B.J.J. LUGTENBERG. Springer- Verlag Berlin Hidelberg, p. 337-344.
- MAAGD, R. A.; WIENTIES, F. B.; LUGTENBERG, B. J. Evidence for divalent cation (Ca²⁺)-stabilized oligomeric proteins and covalently bound protein-peptidoglycan complexes in the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 3989-3995, 1989.
- MAAGD, R. A.; WIJFFELMAN, C. A. PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. (1988) Isolation and characterization of three classes of mutants of *Rhizobium leguminosarum* with altered lipopolysaccharides. In: **Nitrogen fixation: hundred years after**. Ed. H. BOTHE, F.J. DE BRUJIN, W.E. NEWTON. Stuttgart, Fischer, p. 473-492.
- MACHADO, I. M. P.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes nifHDK of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1599-1602, 1996.
- MARIE, C., DEAKIN, W. J., OJANEN-REUHS, T., DIALLO, E., REUHS, B., BROUGHTON, W. J., PERRET, X. TTSI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Mol. Plant-Microbe Interac.** v. 17, ed. 9, p. 958–966, 2004.
- 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.
- MALIK, K. A.; RAKHSHANDA, B.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MIRZA, M. S.; ALI, S. Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant Soil**, v. 194, p. 37–44, 1997.

- MATTOS, K. A.; TODESCHINI, A. R.; HEISE, N.; JONES, C.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia brasiliensis* produces a novel yersiniose A-containing O-polysaccharide. **Glycobiology**, v. 15, p. 313-321, 2005.
- McCLUNG, C. R.; PATRIQUIN, D. G. Isolation of a nitrogen fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Can. J. Microbiol.**, v. 26, p. 881-886, 1980.
- METZGER, M.; BELLEMANN, P.; BUGERT, P.; GEIDER, K. Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. **J. Bacteriol.** v. 176, p. 450-59, 1994.
- MISHKIND, M. L.; PALEVIT, B. A.; RAIKHEL, N. V.; KEEGSTRA, K. Localization of wheat-germ-agglutinin like lectins in various species of the Gramineae. **Science**, v. 220, p. 1290-1292, 1983.
- MONTEIRO, R. A.; SCHMIDT, M. A.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; RANDI, M. A. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, *Poaceae*) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genet. Mol. Biol.** v. 31, ed. 4, p. 932-937, 2008.
- MORRISON, D. C.; LEIVE, L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. **J Biol Chem.** v. 250, ed. 8, p. 2911-19, 1975.
- MUNISHWAR, S. R.; PAWAR, P. P.; JANBANDHU, S. Y.; GEDAM, R. S. Highly stable CdS quantum dots embedded in glasses and its application for inhibition of bacterial colonies. **Optical Materials.** v. 99, p. 1-8, 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. (2014). Princípios de bioquímica de Lehninger. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. p. 386-394.
- NOEL, K. D.; DUELLI, D. M. (2000) *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. In: **Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process**, Ed. E.W. TRIPLETT, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., p. 415-431.
- NOEL, K. D.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. Varying the abundance of O-antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5317-5324, 2000.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fert. Soil.**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V.M. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems and leaves predominantly of *Gramineae*. **Biol Fertil Soils.** v. 21, p.197-200, 1996.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1997.
- ONU. United nations, department of economic and social affairs. **The United Nations**. Population Division, Population Estimates and Projections Section, 2012.
- OVOD, V.; ASHOM, P.; YALROVLEVA, L.; KROHN, K. Classification of *Pseudomonas syringae* with monoclonal antibodies against the core and O-side chains of the lipopolysaccharide. **Phytopathology.** v. 85, p. 226-32, p. 1995.
- PALLERONI, N. J. (1984). Genus I *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL, p. 141-199. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics.** v. 7, e1002064, 2011.

PEDROSA, F. O.; YATES, G. M. Regulation of Nitrogen Fixation (Nif) Genes of *Azospirillum brasilienses* by NifA And NifC (GlnG) Type Genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23. p.95-101, 1984.

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

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

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

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

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

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GOTTFERT, M.; MORRISSEY, J. P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about plant-bacteria interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 7, p. 137-147, 2004.

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

QUISPEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications**. p. 471-490, 1992.

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

RAETZ, C. R. H.; REYNOLDS, C. M.; TRENT, M. S.; BISHOP, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** v. 54, p. 412-427, 2007.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 635-700, 2002.

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

RAMOS, H. J. O. et al. Endophytic *Herbaspirillum Seropedicae* Expresses Nif Gene in Gramineous Plants. **FEMS Microbiolgy Ecol.**, v.45, p.39-47, 2003.

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

REJESUS, R. M. & HORNBAKER, R. H. Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. **Agric Ecosyst Environ.** v. 75, p. 41-53, 1999.

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

RIBEIRO, R. Cotação da ureia agrícola caiu 2,4% em agosto. **Scott Consultoria**, Bebedouro, 4 de set. de 2019. Disponível em: < <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/todas-noticias/51162/cotacao-da-ureia-agricola-caiu-24-em-agosto.htm>>. Acessado em: 23/11/2019.

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

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

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

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 1341–1348, 2006.

SAATH, K. C. O; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Rev. Econ. Sociol. Rural.** Vol. 56 nº.2, p.195-212, 2018.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Ann Bot.** v. 111, p. 743-67, 2013.

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

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

SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. The genus *Herbaspirillum*. **Prokaryotes**. v. 5, p. 141-150, 2006.

SEQUEIRA L. Surface components involved in bacterial pathogen-plant host recognition. **J. Cell. Sci. Suppl.** v. 2, p. 301-16, 1985.

SERRATO, R. V.; BALSANELLI, E.; SASSAKI, G. L.; CARLSON, R. W.; MUSZYNSKIC, A.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; IACOMINI, M. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid-A and of two mutants defective to colonize maize roots. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 51. p. 384– 391, 2012.

SERRATO, R. V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. **Tese de Doutorado** (Ciências-Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, 143 p., 2008.

SERRATO, R. V. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 4:119, 2014.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; CARLSON, R. W.; MUSZYNSKI, A.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; IACOMINI, M. Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum*. **Can. J. Microbiol.** V. 56. p. 342–347, 2010.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Crit. Rev. Plant Sci.** v. 21, p. 323-378, 2002.

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

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

- SKVORTSOV, I. M.; IGNATOV, V. V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 165, p. 223-229, 1998.
- SMITH, A. R. W.; MUNRO, S. M.; WAIT, R.; HIGNETT, R. C. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolated of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, v. 140, p. 1585-1593, 1994.
- SPRENT, J. I.; SPRENT, P. (1990) **Nitrogen fixing organisms**. London. Chapman and Hall, 2ed., 256p.
- STACEY, F. R. S.; BARKER, S. A. (1960) **Polysaccharides of micro-organisms**, p. 75-113, Oxford Press.
- STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (1992) **Biological Nitrogen Fixation**. New York, Chapman and Hall, 943p.
- STINISSEN, H. M.; CHRISPEELS, M. J.; PEUMANS, W. J. Biosynthesis of lectin in roots of germinating and adult cereal plants. **Planta**, v. 164, p. 278-286. 1985.
- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Crit. Rev. Plant Sci.** v. 19, p. 1-30, 2000.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 39, p. 243-270, 1985.
- 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.
- TAO, H.; BREWIN, N. J.; NOEL, K. D. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. **J. Bacteriol.**, v. 174 p. 2222-2229, 1992.
- TEGTMEYER, B.; WECKESSER, J.; MAYER, H.; IMHOFF, J. F. Chemical composition of the lipopolysaccharides of *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas acidophila*, and *Rhodopseudomonas blastica*. **Arch. Microbiol.**, v. 143, p. 32-36, 1985.
- TULESKI, T. R. Envolvimento dos genes de biossíntese de celulose na formação de biofilme pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. **Dissertação de mestrado** (Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 99f. 2013.
- VALVANO, M. A. Export of O-specific lipopolysaccharide. **Front. Biosci.** v. 8, p. 452-471, 2003.
- 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*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.
- VINOGRADOV, E.; MÜLLER-LOENNIES, S.; PETERSEN, B. O.; MESHKOV, S.; THOMAS-OATES, J. E.; HOLST, O.; BRADE, H. Structural investigation of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter Haemolyticus* Strain NCTC 10305 (ATCC 17906, DNA Group 4). **Eur. J. Biochem.**, v. 247, p. 82-90, 1997.
- VINOGRADOV, E.; NOSSOVA, L.; SWIERZKO, A.; CEDZYNSKI, M. The structure of the O-specific polysaccharide from *Ralstonia pickettii*. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2045-2047, 2004.
- WANG, Y.; HOLLINGSWORTH, R. I. The structure of the O-antigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s, **Carbohydr. Res.**, v. 260, p. 305-317, 1994.
- WANG, X., ZHANG, C., SHI, F., HU, X. Purification and Characterization of Lipopolysaccharides. In: Endotoxins: Structure, Function and Recognition. Subcellular Biochemistry 53. p. 27-5, 2010.

- WEBER, O.B. et al. *Herbaspirillum*-like Bacteria in Banana Plants. **Brazilian J. of Micro.**, v.32, p.201-205, 2001.
- WEIBGEN, U.; RUSSA, R.; YOKODA, A.; MAYER, H. Taxonomic significance of the lipopolysaccharide composition of the three biovars of *Agrobacterium tumefaciens*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 166-182, 1993.
- WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Meth. Carbo. Chem.**, v.5, p. 83–91, 1965.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbo. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbo. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963a.
- WU, P.; ZHANG, G.; LADHA, J. K.; MCCOUCH, S. R.; HUANG, E. N. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants. **Theo. Appl. Gen.** v.91, p.1171-1183, 1995.
- XU, G.; CHANG, J.; XUE, H.; GUO, M.; CHUN-GEN, P.; LI, Y. *Herbaspirillum piri* sp. nov., isolated from bark of a pear tree. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 68, p. 3652–3656, 2018.
- YOUNG, J. P. W. (1992) Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**, Ed. G. STACEY, R.M. BURRIS, H.S. EVANS, New York, London Chapman & Hall, p. 43-86
- ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHEL, E. T. (1999) Endotoxin in Health and Disease In: **Endotoxins**. Ed. H. BRADE; S.M. OPAL; S.N. VOGEL; D.C. MORRISON. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 93-114.
- ZHOU, Z.; RIBEIRO, A. A.; LIN, S.; COTTER, R. J.; MILLER, S. I., RAETZ, C. R. H. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 43111-43121, 2001.