

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KEVIN HUSAK CARVALHO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS
EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1
CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

CURITIBA-PR
2024

KEVIN HUSAK CARVALHO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS
EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1
CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato

CURITIBA-PR
2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Carvalho, Kevin Husak

Avaliação da produção e análise estrutural dos
exopolissacarídeos obtidos de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1
cultivados em diferentes fontes de carbono / Kevin Husak
Carvalho. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato.

1. Relação hospedeiro-parasito. 2. Herbaspirillum. 3.
Fitopatogenicidade. 4. Exopolissacarídeos. I. Serrato, Rodrigo
Vassoler, 1979-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Bioquímica). III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



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 CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **KEVIN HUSAK CARVALHO** intitulada: **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO**, 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 APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 09 de Agosto de 2024.

Assinatura Eletrônica

14/08/2024 19:54:09.0

RODRIGO VASSOLER SERRATO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

14/08/2024 14:51:56.0

ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

14/08/2024 14:54:07.0

ROSE ADELE MONTEIRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico essa vitória à minha família, aos meus orientadores de graduação e mestrado, e aos meus amigos de bancada que contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família (Erick, Bruno, Susi, Dirlô e Fernanda), em especial minha mãe, Susi Husak Gomes, que me ajudou na correção textual e sempre me incentivou no caminho dos estudos (você é demais, mãe!).

Ao meu orientador de mestrado, Prof. Dr. Rodrigo Vassoler Serrato, que além de me auxiliar no meio acadêmico, me ensinou a ter um pensamento mais crítico na pesquisa científica e na vida profissional.

Ao meu orientador da graduação, Prof. Dr. José Roberto Caetano da Rocha, por me incentivar no caminho da química e da biologia, mesmo não participando diretamente da minha pesquisa atual. Seus ensinamentos estarão comigo pela eternidade!!!! Visto que ele morreu no ano de 2024, agradeço pelas palavras de conhecimento, alegria, bondade e resiliência ao longo dos anos, onde quer que você esteja nesse momento.

À Roseli Prado (Dona rô), pela ajuda incondicional no preparo de litros de meio de cultura para mim e outros pesquisadores do departamento de bioquímica, você me inspirou muito!!!

Aos meus amigos de laboratório da Microbiologia, Caio e Yara, que realizaram pesquisas relacionadas ao meu tema (cada experiência conta, você nunca estará sozinho).

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Carboidratos, que tiveram paciência comigo para me explicar os experimentos e me deram apoio na minha pesquisa (ninguém consegue nada sozinho).

À minha namorada Isabel Ribeiro, que teve paciência comigo durante essa trajetória, além de ter me ajudado também na correção textual (Freud explica!).

Ao meu psicólogo Douglas, por me ajudar durante minhas crises de ansiedade ao longo deste período.

Ao sistema único de saúde (SUS), por fornecer consultas e remédios para minha ansiedade de **graça**.

Aos prestadores de serviço público da UFPR, que trabalham nas suas rotinas para que todos na instituição tenham uma boa qualidade de vida (educação, estrutura, limpeza e saúde mental).

À CAPES por fornecer a bolsa de estudos.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, com certeza o conhecimento que adquiri nessa universidade irá me auxiliar na minha vida profissional.

“Educação nunca foi despesa. Sempre foi investimento com retorno garantido”

Sir Arthur Lewis

RESUMO

A estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* se caracteriza por ser uma β -proteobactéria endofítica e diazotrófica, que possui uma relação associativa patogênica com alguns vegetais de grande importância econômica como cana-de-açúcar e sorgo. Sabe-se que alguns polímeros localizados no biofilme produzidos por *H. rubrisubalbicans* estão relacionados com a sua fitopatogenicidade, dentre os quais, os principais são os exopolissacarídeos (EPS). Com isso, essa dissertação teve como objetivo analisar e caracterizar os EPS produzidos e excretados pela bactéria Gram-negativa *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 em meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono. Para isso, o cultivo deste microrganismo foi realizado na presença de dois poliálcoois: glicerol (4,58 g/L) e manitol (4,53 g/L). Após o cultivo e a remoção das células por centrifugação, o material de alta massa molecular (>14 kDa), encontrado nos meios de cultura, foi submetido aos processos de purificação e caracterização química para determinar a presença de EPS. A caracterização estrutural das amostras também foi realizada. Dada a baixa produção do material, a caracterização foi realizada apenas para o material insolúvel, sendo realizadas hidrólises parciais dos EPS para a obtenção de oligossacarídeos. Posteriormente, foram feitas análises de CCD, GC-MS, RMN e MALDI-TOF das frações obtidas. De frente, observou-se que a composição monossacarídica dos EPS produzidos é heterogênea em ambas as fontes de carbono, visto que os principais monossacarídeos presentes foram Man (16,9%), Glc (25,5%) e Gal (50,0%) em glicerol, enquanto em manitol apresentou Gal (81,5%), Man (7,8%) e Rha (9,7%). Com relação às outras análises, verificou-se a necessidade de outras metodologias devido à natureza do EPS.

Palavras-Chaves: fitopatogenicidade; exopolissacarídeos; interação planta-bactéria.

ABSTRACT

The M1 strain of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* is characterized by being a β -proteobacterium, endophytic and diazotrophic that has an associative pathogenic relationship with some plants of great economic importance, such as sugarcane and sorghum. It is known that some polymers located in the biofilm produced by *H. rubrisubalbicans* are related to its phytopathogenicity. Among the main polymers are exopolysaccharides (EPS). With this in mind, the aim of this dissertation was to analyze and characterize the EPS produced and excreted by the Gram-negative bacterium *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 in culture media containing different carbon sources. To this end, this microorganism was cultivated in the presence of two polyalcohols, glycerol (4.58 g/L) and mannitol (4.53 g/L). After cultivation and removal of the cells by centrifugation, the high molecular mass material (>14 kDa) found in the culture medium was subjected to purification and chemical characterization processes to determine the presence of EPS. Structural characterization of the sample was then also carried out. Given the low production of the material, characterization was only carried out on the insoluble material, and partial hydrolysis of the EPS was carried out to obtain oligosaccharides. Subsequently, CCD, GC-MS, NMR and MALDI-TOF analyses were carried out on the fractions obtained. The monosaccharide composition of the EPS produced was heterogeneous in both carbon sources, since the main monosaccharides present were Man (16.9%), Glc (25.5%) and Gal (50.0%) in glycerol, while in mannitol they were Gal (81.5%), Man (7.8%) and Rha (9.7%). With regard to the other analyses, there was a need for other methodologies due to the insoluble nature of the EPS.

Key-words: phytopathogenicity; exopolysaccharides; plant-bacteria interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia eletrônica (12.000x) de <i>H. rubrisubalbicans</i>	24
Figura 2: Sintomas típicos da doença da estria mosqueada em cana de açúcar e sorgo.....	26
Figura 3: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> (A) colonizando feixes vasculares de folha de sorgo.....	27
Figura 4: Exemplos de estruturas químicas de EPS produzidas por bactérias.....	28
Figura 5: Fórmula da relação C/N utilizados nos meios de cultura.....	36
Figura 6: Fluxograma demonstrando o método de extração e purificação do material bruto (EBM e EBG), solúvel (EMS e EGS) e insolúvel (EMI e EGI).	38
Figura 7: Cromatografia de camada delgada em sílica das amostras do sobrenadante insolúvel manitol (EMI) e glicerol (EGI) hidrolisadas com TFA 2 mol/L por 8h.	44
Figura 8: Cromatografia de camada delgada em sílica nas amostras do sobrenadante insolúvel manitol (EMI) hidrolisadas com TFA 1 mol/L por 1h.	45
Figura 9: Espectrometria de massas da amostra insolúvel (EMI) hidrolisadas em TFA 1 mol/L realizadas no MALDI-TOF no modo linear negativo.	45
Figura 10: Espectrometria de massas das amostras insolúveis (EMI e EGI) hidrolisadas em pelo método FIT-DOG e realizadas no MALDI-TOF no modo linear negativo.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação taxonômica do <i>H. rubrisubalbicans</i>	25
Quadro 2: Visão geral dos exopolissacarídeos bacterianos e suas aplicações. Composição dos monômeros, substituintes e aplicações.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração final obtida da produção do biofilme de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 crescidos em meio NFb com manitol e glicerol.	42
Tabela 2: Composição monossacarídica dos EPS produzidos por <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 por GLC-MS do derivados alditol acetato.	43
Tabela 3: Análise da composição dos derivados PMAA (Alditol Acetato Parcialmente Metilados) por GC-MS das amostras EMI e EGI.	49

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

α – Alfa

AA – Alditol Acetato

AcO₂ - Ácido Acético

β – Beta

CCD - Cromatografia de camada delgada

C/N – Relação Carbono/Nitrogênio

CPS - Polissacarídeos capsular

δ – Delta (p.p.m.)

D.O.₆₀₀ – Densidade óptica em 600 nm

D₂O – Óxido de Deutério (Água Deuterada)

DMSO – Dimetilsulfóxido

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS – Exopolissacarídeo

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

FIT-DOG - Fenton's Initiation Towards Defined Oligosaccharides Groups (Iniciação de Fenton para Grupos de Oligossacarídeos Definidos)

Fuc – Fucose

Gal – Galactose

GalA – Ácido galacturônico

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

GLC – Cromatografia Gás-Líquido

Glc – Glucose

GlcA- Ácido glucurônico

GlcNAc - N-acetil-glucosamina

HSQC – *“Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy”*

LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF - Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo

Mn – Manose

ManA - Ácido manurônico

MeOH - Metanol

MWCO – *Molecular Weight Cut-Off*

NFN - Núcleo de Fixação de Nitrogênio

PMAA – Alditol Acetato Parcialmente Metilado

Rf – Fator de Retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

r.p.m. – Rotações por Minuto

Rha – Rhamnose

rpm – Rotações por minuto

SST3 – Sistema de Secreção do tipo III

TFA – Ácido Trifluoracético

UV – Ultra Violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
4.1. Bactérias diazotróficas	22
4.2. Gênero Herbaspirillum.....	23
4.3. Exopolissacarídeos bacterianos	28
4.4. Interação Planta-microrganismos	33
5. METODOLOGIA	35
5.1. Material Biológico	36
5.2. Meio de cultura	36
5.3. Condições de Cultivo	37
5.4. Obtenção dos EPS	37
5.5. Determinação da Composição Monossacarídica	38
5.6. Derivados Alditol acetato parcialmente metilados (PMAA).....	39
5.7. Obtenção de oligossacarídeos por hidrólise parcial e FIT-DOG	39
5.8. Análises de CCD (Cromatografia de Camada Delgada)	40
5.9. Análises de MALDI-TOF-MS	40
5.10. Análises de RMN.....	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1. Caracterização estrutural	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	52

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, as plantas compartilharam seu ambiente com diversos organismos unicelulares, incluindo os fitopatógenos. No entanto, na atualidade agrícola, muitas plantas não conseguiram adaptar-se às condições distintas do seu habitat natural, tornando-se suscetíveis a danos econômicos causados por: agrotóxicos, fertilizantes utilizados de forma errônea e fitopatógenos, incluindo fungos, insetos, nematoides e bactérias. Os últimos mencionados emergem como desafios significativos em fitossanidade, sendo capazes de causar destruição parcial ou total das culturas comerciais ao ponto de reduzir drasticamente seu valor econômico. Portanto, é imperativo continuar compreendendo as interações dos microrganismos com vegetais, a fim de entender seus ciclos de vida e estabelecer estratégias eficazes de controle integrado ou preventivo na agricultura (DALMOLIN *et al.*, 2020).

Dentro desse contexto, existem bactérias que possuem a capacidade de fixar nitrogênio e associar-se internamente às espécies vegetais hospedeiras, essas denominadas diazotróficas endofíticas (PANKIEVICZ *et al.*, 2021). Embora a maioria dessas bactérias sejam conhecidas por serem promotoras de crescimento vegetal, algumas estabelecem relações patogênicas, como as amplamente reconhecidas pela Embrapa (Empresa brasileira de Agropecuária e Agricultura), que são: *Agrobacterium tumefaciens* (THOMPSON *et al.*, 2020), *Pantoea agglomerans* (SULJA *et al.*, 2022) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996).

A espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é caracterizada por ser uma β -proteobacteria Gram-negativa que tem relações associativas inter-específicas com alguns vegetais hospedeiros, alguns exemplos são: milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Embora essa espécie consiga realizar interações benéficas em algumas espécies vegetais, a estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* possui relações patogênicas com algumas variantes de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) e *Sorghum bicolor* (sorgo), podendo causar doenças leves como estria mosqueada ou estria vermelha, respectivamente (BALDANI *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1996). Olivares e colaboradores (1997) conseguiram demonstrar a doença estria mosqueada por microscopia, o qual demonstraram o xilema localizado nas folhas de *S. officinarum* B-4362 completamente colonizados pela espécie *H. rubrisubalbicans* M1. James e colaboradores (1997) também obtiveram dados semelhantes em folhas de sorgo.

Tuleski e colaboradores (2019) observaram que as mutações nos *operons bcs ABCZ* de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 diminuíam a produção da celulose, um exopolissacarídeo (EPS) produzido comumente no biofilme dessa espécie. Como consequência, a diminuição da formação de celulose acabava reduzindo a virulência desta bactéria na espécie vegetal *S. bicolor*, demonstrando, então, que a produção da celulose da estirpe M1 pode ser um possível fator envolvido diretamente na patogenia. Além disso, a estirpe M1 acabou sendo discernida, pelo mesmo grupo, como um modelo de estudo no sistema imune vegetal de *S. officinarum* B-4362 e algumas estirpes de *S. bicolor* (TULESKI, *et al.*, 2020).

Os EPS, de forma geral, são polissacarídeos produzidos por uma grande variedade de microrganismos, no qual desempenham diversos papéis importantes, incluindo a proteção física das células microbianas contra lesões mecânicas, *stress* iônico, dessecação, e, principalmente, na participação dos mecanismos de sinalização molecular durante as interações microrganismo-hospedeiro.

Há poucos relatos sobre a produção e caracterização dos EPS de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Freitag (2019) analisou a produção de EPS em meios de cultivo em larga escala com 7 fontes de carbono distintas, com um aumento da relação da fonte de carbono (*high C:N ratio*), sendo esses: citrato de sódio, frutose, galactose, glucose, malato, glicerol e manitol, sendo as duas últimas fontes de carbono mencionadas (glicerol e manitol), as que obtiveram maiores rendimentos de EPS nessa estirpe. Já na caracterização parcial dos EPS produzidos dessas duas fontes de carbono, verificou-se a presença de glucanas em ambas as fontes. Antunes e colaboradores (2021) observaram, em cultivos de larga escala, que a composição monossacarídica dos exopolissacarídeos (EPS) e a relação C:N variaram com o aumento da concentração da fonte de carbono no meio de cultura (*high C:N ratio*) em várias estirpes de *Herbaspirillum spp.*

Ainda não se compreende muito sobre a composição dos EPS produzidos pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* em diferentes condições ambientais, havendo, portanto, necessidade de mais pesquisas sobre a estrutura dessas biomoléculas, com o propósito de elucidar seu possível papel no processo de patogenicidade e na interação entre planta e bactéria a nível molecular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Analisar a produção e a estrutura química fina do EPS produzido por *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, estirpe M1, crescido na presença de diferentes fontes de carbono.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar cultivos de *H. rubrisubalbicans*, estirpe M1, em meios de cultura NFb líquido contendo glicerol e manitol como únicas fontes de carbono;
- Obter os exopolissacarídeos dos meios de culturas após a remoção das células por centrifugação;
- Purificar os exopolissacarídeos por diálise e métodos cromatográficos;
- Realizar a caracterização química e estrutural dos EPS através de métodos químicos, espectrométricos e espectroscópicos.

3. JUSTIFICATIVA

Esta dissertação é justificada pela necessidade de aprofundar a compreensão da produção e estrutura dos exopolissacarídeos (EPS), produzidos pela estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* quando cultivada com fontes de carbono divergentes (FREITAG, 2019), bem como compreender a patogenia em algumas estirpes de sorgo e cana de açúcar envolvidos na formação de biofilme em diferentes concentrações de C (TULESKI *et al.*, 2019; ANTUNES *et al.*, 2019).

Segundo Serrato (2008), conhecer a estrutura de um polissacarídeo é fundamental para entender suas propriedades, funções e aplicações, sendo vital para compreender as interações planta-microrganismo. Com base nisso, ainda não se compreende com precisão a composição química dos EPS produzidos por *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Portanto, esta dissertação visa preencher essa lacuna, oferecendo *insights* valiosos que podem orientar futuras estratégias no manejo de patógenos associados a vegetais no contexto agrícola. Além disso, esse conhecimento contribuirá para a elaboração de modelos fisiológicos da bactéria e impulsionará avanços nas pesquisas agrícolas globais.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescimento acelerado da população mundial tem gerado uma demanda crescente por alimentos (BROWN, 1995; MALTHUS, 1798). De acordo com a ONU (Organização das Nações Unidas) (2022), a expectativa é de que a projeção do crescimento da população global possa atingir 9,7 bilhões de pessoas até 2050, verificando-se a necessidade de aumentar a produção de alimentos como uma questão prioritária.

Desde a revolução verde, os setores agrícolas têm sido amplamente pressionados no uso de fertilizantes químicos para aumentar a produtividade das culturas com o objetivo de uma agricultura intensiva em larga escala (PINGALI, 2012). No entanto, o uso contínuo e excessivo dos fertilizantes químicos agravou em ameaças ambientais, como: o aumento da salinidade e da toxicidade do solo, o endurecimento do solo e a diminuição da capacidade de transporte de nutrientes para os vegetais. Além disso, a emissão de gases de efeito estufa resultante das práticas agrícolas intensivas contribui para as mudanças climáticas (BABIN *et al.*, 2019).

O setor agrícola tem desenvolvido alternativas com o objetivo de um modelo de agricultura mais sustentável. Dentre essas alternativas, os microrganismos foram reconhecidos pelo seu vasto potencial na agricultura sustentável, visto que as plantas abrigam diversas comunidades microbianas, como archaea, fungos, protistas e bactérias que são coletivamente designadas como microbioma vegetal (BROWN *et al.*, 2020). Os avanços tecnológicos permitiram o estudo das biomoléculas do microbioma vegetal e da sua interação com o hospedeiro (SONG *et al.*, 2020); AGRAHARI *et al.*, 2020). Embora as interações entre os microrganismos-vegetais estejam sendo exploradas como soluções agrícolas sustentáveis para melhorar a gestão das culturas (PANDEY *et al.*, 2019), o sucesso na aplicação de inoculações microbianas em culturas de larga escala ainda tem um longo percurso para ser alcançado.

No Brasil, muitas pesquisas têm sido feitas sobre o uso desses microrganismos em culturas de larga escala, juntamente da Embrapa (Empresa Brasileira de Agricultura e Agropecuária), cuja missão é viabilizar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação para a sustentabilidade da agricultura, em benefício da sociedade brasileira. Essa evolução tecnológica ocorre devido aos estudos constantes das complexas interações dos microrganismos com seus respectivos

hospedeiros vegetais como soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e outras espécies de extrema importância econômica no país (BALDANI *et al.*, 1997; DEGRASSI; CARPENTIERI-PIPOLO, 2020).

4.1. Bactérias diazotróficas

As bactérias diazotróficas são um grupo específico de microrganismos capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN), podendo atuar de forma livre no ambiente ou em interação com plantas hospedeiras (MADIGAN *et al.*, 2015). A FBN é um processo caracterizado pela capacidade de alguns microrganismos converterem o nitrogênio atmosférico, ou dinitrogênio (N_2), em um composto assimilável pelas plantas, como a amônia (NH_3). A NH_3 , por sua vez, é assimilada pelas plantas através de uma série de reações metabólicas, sendo convertida em formas orgânicas como aminoácidos, nucleotídeos e outros compostos. Esses compostos são posteriormente transformados em proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes essenciais para o desenvolvimento vegetal (SIMPSON; BURRIS, 1984; MADIGAN *et al.*, 2015).

Além da FBN, esses organismos desempenham outros papéis importantes no crescimento vegetal, sendo: na solubilização de nutrientes do solo como fosfato e ferro, tornando-os mais disponíveis para os vegetais. Conseguem produzir fitormônios, como ácido indol-3-acético (IAA), ácidos giberélicos, citocininas, auxinas e outros compostos orgânicos voláteis que auxiliam no crescimento vegetal, auxiliando na resistência das plantas a estresses abióticos e bióticos. E, também, estimulam a imunidade vegetal, proporcionando a defesa contra fitopatógenos (GLICK, 2012; GOURION *et al.*, 2015).

Com base na interação com as plantas, as bactérias diazotróficas podem ser divididas em: simbióticas e associativas. As simbióticas, como as da família *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*), estabelecem relações mutualísticas com plantas hospedeiras, especialmente leguminosas. Essas bactérias formam órgãos especializados nas raízes, denominados nódulos, possuindo um papel importante na FBN no vegetal hospedeiro. Já as diazotróficas associativas não realizam a sua interação pela formação dos nódulos nas raízes, e sim, pela colonização da superfície das raízes (epifíticas) ou do interior dos vasos das plantas (endofíticas). Alguns representantes conhecidos como *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pantoea*,

Herbaspirillum, e outros de extrema importância, são também estudados para melhorar a produção de culturas em um sistema de manejo agrônomo sustentável (PANKIEVICZ *et al.*, 2021; DEGRASSI; CARPENTIERI-PIPOLO, 2020).

4.2. Gênero *Herbaspirillum*

Historicamente, Baldani e colaboradores (1984) investigaram a presença de *Azospirillum spp.* nas raízes de cereais, observando um grupo de bactérias com características similares ao *Azospirillum*, incluindo a fixação de nitrogênio e a morfologia. Devido às similaridades, com algumas diferenças de tamanho, suspeitaram tratar-se de uma nova espécie, sendo inicialmente descritas como "*A. seropedicae*". No entanto, acabou-se descobrindo que esses isolados apresentavam um baixo nível de hibridização RNA-RNA em comparação com todas as cepas tipo de *Azospirillum spp.* (FALK *et al.*, 1986). Essa constatação levou os autores a proporem o novo gênero *Herbaspirillum* para esses isolados, sendo a primeira espécie desse gênero denominada *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986).

Após a criação de um novo gênero, foi aberta oportunidade para explorar as relações taxonômicas de bactérias estreitamente relacionadas com *H. seropedicae*, principalmente com os avanços dos métodos moleculares. Dentre essas mudanças, ocorreu a reclassificação do gênero da espécie *Pseudomonas rubrisubalbicans* (CHRISTOPHER; EDGERTON, 1932) para *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), devido ao fato de haver altas semelhanças bioquímicas com o *H. seropedicae*, que inclui a capacidade de fixação de nitrogênio e as altas taxas de semelhanças por hibridização de rRNA-DNA e DNA-DNA (GILLIS *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1996).

O gênero *Herbaspirillum* pertence ao filo Proteobacteria, classe β -proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Oxalobacteraceae. Suas características morfológicas são: Gram-negativas, com forma curvilínea ou espiralada, possuem de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos e podem apresentar um diâmetro de 0.6-0.7 μm (BRENNER *et al.*, 2005; SCHIMID *et al.*, 2006).

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. seropedicae* AU14040 (MARQUES *et al.*, 2015), *H. robiniae* (FAN *et al.*, 2018), *H. piri* (XU *et al.*, 2018) e *H. camelliae* (LIU *et al.*, 2020).

Dentre a estirpes de *Herbaspirillum spp.*, apenas algumas são capazes de realizar o processo de fixação de nitrogênio, possuindo também, como característica, interação endofítica diazotrófica com alguns vegetais como arroz (*Oryza sativa*), arroz selvagem (*Oryza officinalis*), milho (*Zea mays*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e outras espécies de gramíneas. As principais espécies diazotróficas representantes desse gênero são: *H. seropedicae*, *H. frisingense* e *H. rubrisubalbicans* (BRENNER *et al.*, 2005; SCHIMID *et al.*, 2006 MATTEOLI *et al.*, 2020).

A espécie *H. rubrisubalbicans* caracteriza-se como diazotrófico endofítico associativo com uma morfologia de um bastonete curvilíneo e flagelos em ambos os pólos, como apresentado na Figura 1. O organismo é conhecido por causar fitopatogenia leve em variantes de *Saccharum officinarum* e *Sorghum bicolor*, causando as doenças estria mosqueada (OLIVARES *et al.*, 1997) e estria vermelha (JAMES *et al.*, 1997), respectivamente.

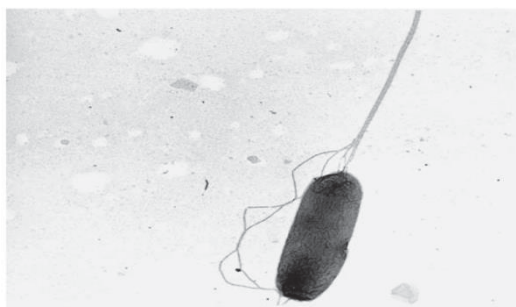


Figura 1: Microscopia eletrônica (12.000x) de *H. rubrisubalbicans*. Célula demonstra a morfologia de um bastonete com flagelos em ambos os pólos. Fonte: *BERGEY'S Manual of Systematic of Bacteriology* (2005).

Esses organismos podem ser estocados para crescimento em meio de cultura dentro de um pH ótimo de 5.8 em meio semi-sólido JNFb ou NFB (PEDROSA; YATES, 1984) num tempo de incubação de 48h em 30 °C, tendo como resultado a formação de uma fina película abaixo da superfície do meio. Suas únicas fontes de carbono e energia para o crescimento são malato, succinato, citrato, alfa-cetoglutarato, fumarato, piruvato, trans-aconitato, manitol, glicerol, sorbitol, glucose, galactose e L-arabinose (BRENNER *et al.*, 2005).

A classificação taxonômica da espécie teve algumas modificações ao longo do tempo, visto que esse organismo era nomeado erroneamente como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (CHRISTOPHER; EDGERTON, 1932), sendo sua taxonomia redefinida para *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), como consta no Quadro 1.

Quadro 1: Classificação taxonômica do *H. rubrisubalbicans*. Fonte: BERGEY 'S Manual of Systematic of Bacteriology (2005).

Domínio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	β -proteobacteria
Ordem	Burkholderiales
Família	Oxalobacteraceae
Gênero	<i>Herbaspirillum</i>
Espécie	<i>H. rubrisubalbicans</i>

A espécie foi originalmente descrita como o agente causador da doença da estria mosqueada em cana de açúcar na Louisiana (CHRISTOPHER; EDGERTON, 1932) e, posteriormente, encontrada como agente patogênico em cultivares de sorgo localizados em Queensland (HALE; WILKIE, 1972a; 1972b). No Brasil, apenas uma variante de *Saccharum officinarum* foi descrito em Barbados, B-4362, sendo relatado como suscetível à patologia estria mosqueada (GALLI *et al.*, 1980), enquanto outros cultivares de importância agrônômica eram resistentes, mesmo após inoculação artificial (PIMENTEL *et al.*, 1991).

Olivares e companhia (1997) confirmaram, por microscopia eletrônica, a infecção e a colonização bacteriana nos espaços intercelulares, entre o xilema e as cavidades sub-estomatais das folhas de *Saccharum officinarum* B-4362, confirmando que essa variante era suscetível à doença estria mosqueada. James e companhia (1997) verificaram que essa espécie também era capaz de colonizar os vasos condutores das raízes, caules e, predominantemente, as folhas de algumas variantes de *Sorghum bicolor* suscetíveis à doença estria vermelha (Figura 2).

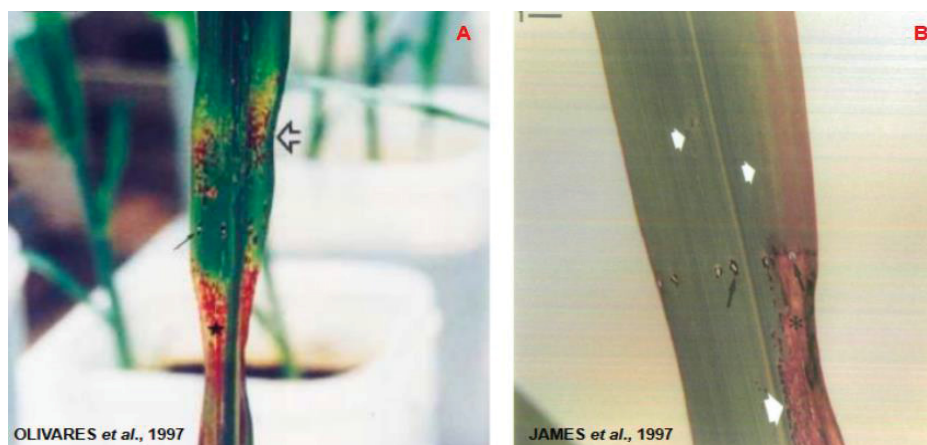


Figura 2: Sintomas típicos da doença da estria mosqueada em cana de açúcar e sorgo. (A) Doença da estria mosqueada causada por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 em folhas de cana-de-açúcar. (B) Doença da estria vermelha causada pelo mesmo patógeno. A estrela indica o ponto de inoculação da bactéria, nota-se o desenvolvimento de estrias vermelhas e necrose do tecido. As flechas indicam os sintomas da doença se manifestando em regiões acima do ponto de inoculação, indicando o avanço das bactérias no interior dos vasos da folha. Fonte editado: OLIVARES *et al.* e JAMES *et al.* (1997).

James e colaboradores (1997) também observaram a colonização por microscopia, a nível tecidual, e sugeriram que o organismo possui a capacidade de colonizar profundamente os tecidos de condução dos vegetais através da produção de biofilme e de bloquear os vasos condutores meta e proto-xilemáticos, como demonstrado na Figura 3. Essa descoberta trouxe implicações significativas para a compreensão das interações planta-microrganismo da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*, especialmente no contexto de doenças de plantas, sugerindo que a formação de biofilmes é um fator crítico na virulência de certos patógenos vegetais e no desenvolvimento de estratégias de manejo agrícola.

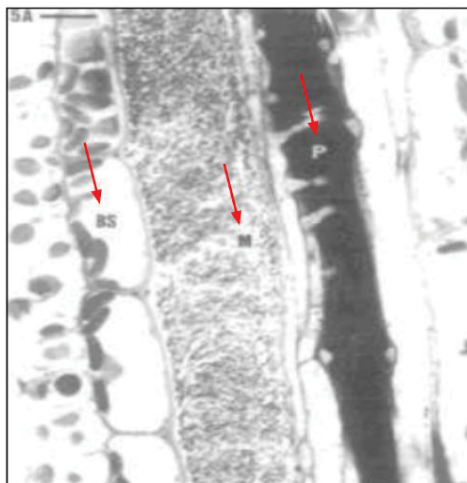


Figura 3: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (A) colonizando feixes vasculares de folha de sorgo. Foto da microscopia retirada da área de folha de sorgo mostrando sintomas da doença após 14 dias de inoculação com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A - seção longitudinal mostrando o protoxilema (P) fortemente colonizados por bactérias, onde M = metaxilema e BS = bainha de células. As flechas vermelhas estão apontando para melhor visualização das letras da legenda. Fonte editado: JAMES *et al.* (1997).

Em 2019, Tuleski e colaboradores verificaram os efeitos da produção de celulose no biofilme produzidos pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* relacionados com a patogenia com algumas variantes de *Sorghum bicolor*, no qual descobriram que o aumento da sua produção tinha efeitos patogênicos no vegetal, indicando um fator de patogenia no vegetal. Logo depois, em 2020, o mesmo grupo analisou a estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* como modelo de estudo no sistema imune de *Sorghum bicolor*. Esse estudo forneceu *insights* valiosos para a compreensão das respostas imunes das plantas contra fitopatógenos e contribuiu, valiosamente, para o desenvolvimento de novas abordagens para o controle de doenças em culturas agrícolas.

Apesar do efeito fitopatogênico, a estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* promove o crescimento e expressão da dinitrogenase redutase (proteína *NifH*) em outros cultivares, indicando que há necessidade de condições específicas para a patogenia. Como consequência, *H. rubrisubalbicans* é incluída em inoculantes comerciais para cana-de-açúcar desenvolvida pela Embrapa (OLIVEIRA, 2006; VALDAMERI *et al.*, 2017).

4.3. Exopolissacarídeos bacterianos

Por definição, os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos de alto peso molecular, produzidos intracelularmente e excretados por diversos microrganismos, como fungos, microalgas e bactérias (SUTHERLAND, 2001a; XIAO *et al.*, 2021). Os EPS bacterianos, por sua vez, possuem estruturas diversificadas, podendo ser secretados por uma ampla gama de bactérias (YURIY; MARIE-ROSE, 2020). Conforme sua localização, podem ser secretados na forma de polissacarídeos capsulares (CPS), que estão fortemente associados na superfície celular, formando uma cápsula, ou como polissacarídeos extracelulares (EPS), que ficam frouxamente aderidos na parede celular ou completamente liberados no ambiente extracelular (BARCELOS *et al.*, 2019; NETRUSOV *et al.*, 2023).

Essas biomoléculas são classificadas com base no tipo de monossacarídeos que as compõem, podendo ser homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos (SUTHERLAND, 2001a; YURIY; MARIE-ROSE, 2020). Os homopolissacarídeos são formados por um único tipo de monossacarídeo, como glucose (Glc), frutose (Fru) ou galactose (Gal) (XIAO *et al.*, 2021), os quais podem ser categorizados em α -D-glucanas (ex: dextrana), β -D-glucanas (ex: celulose), frutanas (ex: levana) ou poligalactanas. Por outro lado, heteropolissacarídeos são compostos formados por mais de um tipo de monossacarídeo, incluindo Glc, Fru, Gal, Man (manose), ramnose (Ram), fucose (Fuc), e ocasionalmente, N-acetilglicosamina (GlcNAce) e ácidos urônicos (GlcA, GalA, ManA, GulA). Alguns exemplos de heteropolissacarídeos são bem elucidados na literatura como a goma xantana ou alginato (Figura 4) (NETRUSOV *et al.*, 2023; YURIY; MARIE-ROSE, 2020).

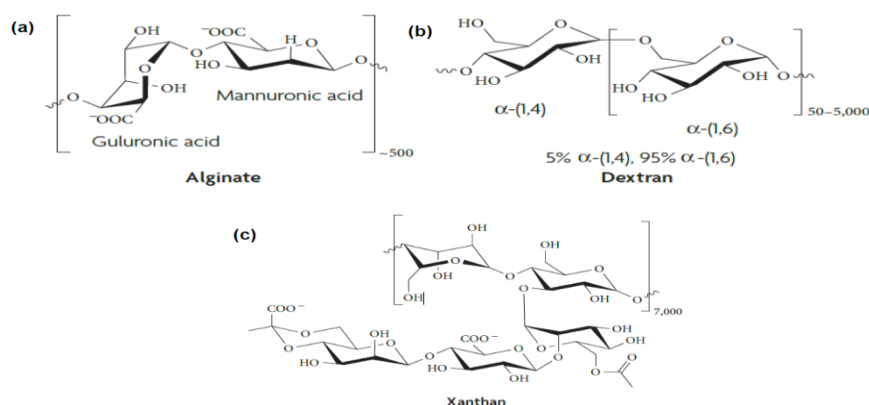


Figura 4: Exemplos de estruturas químicas de EPS produzidas por bactérias (a) Alginato, (b) Dextrana e (c) Xantana (Fonte editado: REHM, 2010).

Os EPS bacterianos desempenham um papel fundamental na adesão, agregação e formação de biofilmes, sendo a principal fração da matriz extracelular (BALDUCCI *et al.*, 2023). Porém, os EPS podem desempenhar outras funções, de acordo com a espécie bacteriana, como: controle às variações de temperatura (WANG *et al.* 2019), salinidade (ISFAHANI *et al.*, 2018), aridez (ILYAS *et al.*, 2020), raios UV, valores de pH desfavoráveis, estresse osmótico, fagocitose, agentes químicos (antibióticos, metais pesados e oxidantes), além de outros papéis necessários para a adaptação celular (KAUR; DEYS, 2022).

Os polissacarídeos bacterianos também são caracterizados pela presença de alguns grupos funcionais como hidroxil, carbonila, carboxila, succinil, fosfoglicerato, acetil, entre outros que conferem propriedades únicas para cada polissacarídeo (NETRUSOV *et al.*, 2023). As propriedades físico-químicas e as aplicações de uso dos EPS têm chamado muita atenção em vários campos industriais (RANA, S.; UPADHYAY, 2020), medicina (NADZIR *et al.*, 2021) e tecnologia (REHM, 2010; RANA, S.; UPADHYAY, 2020). Alguns exemplos de EPS com estruturas já bem elucidadas como xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2020), dextrana (TINTORÉ *et al.*, 2024), alginato (URTUVIA *et al.*, 2017), celulose (MISHRA *et al.*, 2022) e outros polissacarídeos marcantes na literatura (NETRUSOV *et al.*, 2023) são biomoléculas fortemente estudadas e aplicadas em uma variedade de campos de estudo, podendo ser melhor visualizados no Quadro 2.

Quadro 2: Visão geral dos exopolissacarídeos bacterianos e suas aplicações. Composição dos monômeros, substituintes e aplicações.

EPS	Componentes	Substituintes	Aplicações	Referência
Alginato	GulA, ManA	Ace	Alimentos, medicina e pesquisa	URTUVIA et al. (2017)
Celulose	Glc	-	Alimentos, medicina e acústicos	MISHRA et al., 2022
Ácido colânico*	Glc, Fuc, GlcA, Gal	Ace, Pyr	N.a.	QIAO et al. (2021)
Curdiana	Glc	-	Alimentos, cosméticos e Construção química	YUAN et al. (2021)
Dextrana	Glc	-	Medicina e Cromatografia	TINTORÉ et al. (2024)
Diutana	Glc, Rha, GlcA	Ace	Recuperação de petróleo	HUANG et al. (2022)
Ácido Hialurônico	GlcA, GlcNAc	-	Medicina e cosméticos	JUNCAN et al. (2021), JABBARI et al. (2023)
Levana	Fru	-	Alimentos (pré-bióticos), medicina, cosméticos, indústria e cola	SRIKANTH et al. (2015), DOMŻAŁ-KĘDZIA et al. (2023)
Succinoglicanas	Glc, Gal	Ace, Pyr, Suc	Indústria de óleos e cosméticos	JEONG et al. (2022)
Xantana	Glc, Man, GluA	Ace, Pyr	Alimentos, Construção química	GARCÍA-OCHOA et al. (2020)

*O ácido colânico representa um EPS sem aplicação comercial, mas é de grande interesse devido a estudos de patogenicidade.

Legenda: Glc, glucose; Rha, ramnose; Fuc, fucose; Fru, frutose; Gal, galactose; Man, manose; GlcA, ácido glucurônico; ManA, ácido manurônico; GulA, ácido gularônico; GlcNAc, N-acetil-glucosamina; Pyr, piruvato; Ace, acetato; Gly, glicerato; Suc, succinato, N. a., não anunciado. Fonte editado: SCHMID *et al.*, 2015.

Os EPS bacterianos podem apresentar composições monossacarídicas que variam de acordo com o ecossistema do biofilme bacteriano, que incluem: microrganismos presentes, tempo de fermentação, aeração, cisalhamento, temperatura, volume do inóculo, macros e micronutrientes, presentes no ambiente, e a relação C/N (SUTHERLAND, 2001b; PRASAD; PUROHIT, 2023).

A relação C/N é um fator que exerce uma forte influência no metabolismo microbiano, incluindo a síntese de EPS (SUTHERLAND, 1972). Estudos com *Sphingomonas paucimobilis* demonstraram que a relação C/N superior a 20,7 não aumentava a produção da goma gelana devido à exaustão da fonte de nitrogênio (HUANG *et al.*, 2012; SUTHERLAND, 2001a). Outros estudos já demonstraram que existe um ponto de equilíbrio da relação C/N, no qual se ultrapassasse, o organismo *Klebsiella pneumoniae* (PREMNATH *et al.*, 2021) não produzia EPS. Por outro lado, pesquisas sugerem que uma alta relação C/N pode alterar a via de crescimento de algumas espécies, favorecendo a produção de EPS devido à limitação de nitrogênio para a síntese proteica. Indicando então, que o ajuste adequado da relação C/N pode otimizar o rendimento e a composição dos EPS, tornando esse parâmetro essencial para o sucesso de processos industriais de biopolímeros (PREMNATH *et al.*, 2021; SUTHERLAND, 1972; SUTHERLAND, 2001a).

De fato, os fatores ambientais conferem uma diversidade de estruturas sintetizadas por esses microrganismos (YURIY; MARIE-ROSE, 2020), sendo necessário um estudo contínuo das propriedades físico-químicas dessas biomoléculas produzidas, para então, conseguir realizar aplicações ecológicas, biotecnológicas, alimentícias, agrônômicas e industriais (PRASAD; PUROHIT, 2023).

Na Agronomia, as bactérias diazotróficas são conhecidas por produzirem EPS com propriedades que facilitam nas interações planta-microrganismo, fornecimento de antioxidantes, armazenamento de carbono e nutrientes, dentre outras funções que auxiliam no crescimento vegetal. Algumas espécies de diazotróficos produtoras de EPS já caracterizados incluem: *Rhizobium spp.*, (SMIT *et al.*, 1987; GHOSH *et al.*, 2016), *Azospirillum brasilense* (VALVERDE *et al.*, 2008; BURDMAN *et al.*, 2000), *Sinorhizobium meliloti* estirpe Rm1021 (MORRIS; GONZÁLEZ, 2009), *Burkholderia kururiensis* estirpe M130 (HALLACK *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011), *Bradyrhizobium sp.* estirpe MAFF211645 (FITRIYANTO *et al.*, 2011) e *Gluconacetobacter spp.* (SERRATO *et al.*, 2013).

Na família das *Rhizobiaceae*, os EPS mais elucidados são as succinoglucanas e galactoglucanas comumente produzidos pela espécie *Sinorhizobium meliloti*, visto que são polissacarídeos de extrema importância no processo de infecção e formação de nódulos em alfafa (PELLOCK *et al.*, 2020). Estudos de outras espécies de *Rhizobium spp.* também indicam capacidade de produção de succinoglicanas durante o processo de infecção e nodulação (JEONG *et al.*, 2022).

Já em espécies associativas, como *Gluconacetobacter xylinus*, são reconhecidos pela produção de celulose (RUKA *et al.*, 2012) e acetana, um polissacarídeo formado por β -glucanas (1 $\rightarrow$ 4) com ramificação tetra ou pentasacarídica de Man, Glc, Rha e GlcA (JANSSON *et al.*, 1993). Serrato e companhia (2013), observaram a presença de EPS semelhantes com acetanas, entretanto, notaram a presença de unidades de Gal, havendo uma diferença notável em relação a outros EPS do *Gluconacetobacter spp.* Estudos com *Azospirillum brasilense* já reportaram que a produção de EPS ricos em Ara pode estar relacionado com a agregação de células durante a colonização bacteriana (VALVERDE *et al.*, 2008).

Em específico, não se têm muito dados da caracterização de EPS em *Herbaspirillum spp.*, havendo a necessidade de compreender melhor a sua estrutura poli ou oligossacarídica para melhor compreensão das suas interações com os vegetais hospedeiros. Serrato (2008) relatou a presença em cepas de *H. seropediceae* SmR1 (RAM4) e *H. rubrisubalbicans* (AB7, BA10 e BA16), relatando que havia divergências e complexidades na estrutura polissacarídica. Smol'kina e companhia (2012) analisaram a composição monossacarídica de EPS produzidos pela cepa Z78 de *H. seropediceae*, visto que o polissacarídeo apresentava uma composição monossacarídica de Man, Gal e Glc.

Freitag (2019) investigou a produção e caracterização de EPS por nove estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. As estirpes foram cultivadas em meios de cultura NFb (PEDROSA; YATES, 1984) com uma relação C/N de 30 em fontes de carbono divergentes. A princípio, observou-se que as estirpes M4, BA15 e BA16 se destacaram pela maior eficiência na conversão de malato em carboidratos. Na caracterização dos EPS, a análise de composição monossacarídica identificou Glc e Gal como os principais monossacarídeos presentes em todas as estirpes. Já a estirpe M1, além de apresentar alta capacidade de produção de EPS em glicerol e manitol, foi selecionada para experimentos em larga escala para caracterização dos EPS. A

composição monossacarídica revelou Fuc (14%) e Gal (7%) no EPS produzido com glicerol, enquanto o EPS obtido a partir de manitol apresentou altos teores de Man (67%) e Rha (17%), o que indicou a produção de heteropolissacarídeos em ambas as fontes de carbono. Esses resultados demonstraram o potencial biotecnológico da estirpe M1 na produção de EPS com composições divergentes de acordo com a fonte de carbono utilizada.

Em outro estudo, Tuleski e companhia (2019) avaliaram o efeito do EPS pela estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comparando com estirpe mutante TRT1 em folhas de *Sorghum bicolor*, no qual, foi realizada a mutação nos *operons bcs ABCZ* que acabou por diminuir a produção de celulose do biofilme bacteriano. Com isso, observou-se a diminuição da patogenicidade em *Sorghum bicolor*, indicando um fator de patogenicidade associado ao EPS nessa espécie. Antunes e companhia (2021) verificaram que diferentes espécies de *Herbaspirillum spp.* mudavam a composição do EPS na presença de malato no meio de cultura, indicando que espécies diferentes do mesmo gênero são capazes de produzir EPS distintos na presença da mesma fonte de carbono.

4.4. Interação Planta-microrganismos

Na prática, todas as plantas possuem uma relação de associação com microrganismos, podendo ocorrer a colonização microbiana na superfície (epifítica) ou ocupando os espaços internos do vegetal (endofítica) (BRENCIC; WINANS, 2005). Baseado nessas interações planta-microrganismo, pode-se classificá-las como patogênica, comensal ou simbiótica (AUNG *et al.*, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2019). Os patógenos se caracterizam como organismos que se nutrem dos tecidos vivos como folhas, colmos e raízes; comensais são aqueles que vivem em tecidos mortos, auxiliando no ciclo de ciclagem de nutrientes; os simbiontes, por sua vez, são os que auxiliam no crescimento do vegetal pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) ou pelo auxílio na produção de fitohormônios (RODRIGUEZ *et al.*, 2019; BRENCIC; WINANS, 2005).

Estudos das interações entre planta e microorganismo relacionam a produção de biomoléculas em resposta às moléculas sinalizadoras de vegetais específicas. Essas biomoléculas podem incluir metabólitos determinantes de patogenicidade, simbiose ou conjugações (RODRIGUEZ *et al.*, 2019; BRENCIC; WINANS, 2005).

As bactérias fitopatogênicas, como as espécies do gênero *Xanthomonas*, são conhecidas por causar doenças em diversas culturas agrícolas, incluindo mono e dicotiledôneas (JACQUES *et al.*, 2016). A interação planta patógeno envolve, principalmente, a secreção de proteínas e polissacarídeos na sua superfície celular do hospedeiro com o biofilme bacteriano (DOWNIE, 2010). *Xanthomonas spp.*, e outras bactérias gram-negativas patogênicas, empregam alguns sistemas moleculares, como o T3SS (Sistema de secreção do Tipo 3), para injetar proteínas efetoras diretamente nas células das plantas (WHITE *et al.*, 2009). Com relação ao EPS produzidos por esses organismos, a goma xantana, um pentasacarídeo, é um dos principais fatores que causam a doença podridão negra das plantas hospedeiras pelo bloqueio dos vasos xilemáticos (BIANCO *et al.*, 2016; RUDOLPH *et al.*, 1994).

Em um estudo realizado por Chou e companhia (1997), foi demonstrado que a inativação do gene *gumD* não apenas interrompia a produção da goma xantana, mas também resultava em defeitos significativos na pigmentação bacteriana e na capacidade de causar a doença conhecida como podridão negra em plantas. Este estudo destacou a conexão entre a síntese de exopolissacarídeos e a capacidade patogênica, sugerindo que intervenções no gene *gumD* poderiam ser exploradas como uma estratégia potencial para controlar a doença da podridão negra, com implicações significativas para a agricultura e o manejo de patógenos de plantas.

Bianco e companhia (2016) investigaram a relação do processo de piruvilação em goma xantana para a virulência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Nesse estudo os autores demonstraram experimentalmente que a ausência do piruvato na composição da goma xantana comprometia severamente a capacidade de *X. campestris* em causar doenças em plantas hospedeiras, oferecendo novos *insights* sobre os mecanismos bioquímicos subjacentes à interação patógeno-hospedeiro.

Os estudos dos EPS produzidos por espécies diazotróficas também têm auxiliado na melhor compreensão das relações simbióticas (KAWAHARADA *et al.*, 2015), patogênicas ou associativas no processo de infecção de determinado hospedeiro (SUTHERLANDa, 2001; JEONG *et al.*, 2022). Em organismos simbióticos, por exemplo, Pellock e companhia (2020) relataram que succinoglicanas, um octosacarídeo produzido por *Sinorhizobium meliloti*, são essenciais para obtenção de uma simbiose mais eficaz em alfafa (*Medicago sativa*), auxiliando no crescimento de forma direcionada e eficiente na infecção através dos pelos radiculares. Além disso,

estudos com succinoglicanas alta massa molecular (HMW) produzidas por *S. meliloti* também verificaram a capacidade de modular a exposição dos rizóbios no processo de diferenciação em bacteroides e manutenção dos bacteroides, necessários para a nodulação (ARNOLD *et al.*, 2018). Outros estudos demonstram a ação das succinoglicanas de baixa massa molecular (HLW) como fatores de proteção contra alterações de pH nos simbiossomos, etapa anterior na maturação dos nódulos (HAWKINS *et al.*, 2017).

Estudos moleculares também têm auxiliado na melhor compreensão das interações planta-microrganismos, uma vez que também auxiliaram no entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à produção do biofilme e do EPS em *Herbaspirillum spp.* Pedrosa e companhia (2011) identificaram no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 genes homólogos ao SST3 e os genes relacionados à síntese de lipopolissacarídeos (LPS) e EPS. Alguns desses mecanismos foram elucidados nos estudos realizados por Schmidt e companhia (2012), que demonstraram a necessidade do SST3 durante a colonização e a formação do biofilme de *H. rubrisubalbicans* M1 em plantas hospedeiras da família *Poaceae*.

Com isso, verifica-se a necessidade de realizar mais pesquisas detalhadas sobre as interações planta-bactéria a nível molecular. Sendo necessárias para entender de forma abrangente como ocorrem as interações comensais, patogênicas ou simbióticas. Além disso, é de suma importância que os estudos relacionados à interação planta-microorganismo sejam conduzidos em condições que simulem fielmente ao ambiente nativo de crescimento bacteriano com a planta hospedeira, para que se possa obter uma visão mais precisa dos processos envolvidos e das influências ambientais que afetam essas interações em culturas agrícolas de larga escala (AUNG *et al.*, 2018).

5. METODOLOGIA

As atividades foram realizadas nos laboratórios de Química de Carboidratos e no NFN (Núcleo Fixação de Nitrogênio), localizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, no Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

5.1. Material Biológico

A bactéria diazotrófica *H. rubrisubalbicans*, estirpe M1, foi cedida gentilmente pela coleção biológica do NFN do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, localizado no Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Os estoques das células foram armazenados em temperatura - 20 °C dentro de eppendorfs (1 mL) preparados com uma solução de glicerol 50% estéril.

5.2. Meio de cultura

A bactéria *H. rubrisubalbicans* M1 foi crescida em meio NFb HP líquido (PEDROSA; YATES, 1984), contendo: MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L), NaCl (0,1 g/L), CaCl₂ (20 mg/L), FeSO₄.7H₂O (20 mg/L), biotina (100 µg/L), Na₂MoO₄.2H₂O (2,0 mg/L), MnSO₄.H₂O (2,4 mg/L), H₃BO₃ (2,8 mg/L), CuSO₄.5H₂O (8,0 mg/L), ZnSO₄.7H₂O (240 µg/L), K₂HPO₄ (17,8 g/L), KH₂PO₄ (159,5 g/L) e NH₄Cl (20 mM) como fonte de nitrogênio. Os sais de fosfatos e de cloreto de amônio foram autoclavados separadamente (120°C, 1 atm, 20 min). O pH de todos os meios de crescimento foram ajustados para 6,5 com soluções de KOH ou HCl.

As diferentes fontes de carbono utilizadas foram adicionadas em diferentes concentrações a fim de garantir a mesma relação C/N de 6,4 em todos os meios de cultura, conforme mostrado a seguir: glicerol (4,58 g/L) e manitol (4,53 g/L). Os pré inóculos foram realizados com malato de sódio (5,01 g/L). Para todas as condições de cultivo não houve variação na concentração de N utilizada. A relação C/N foi calculada segundo a equação mostrada na figura 5.

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

Onde:

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

C = peso atômico do átomo de carbono;

MMFC = massa molar da fonte de carbono utilizada;

C_{g/L}(C) = concentração da fonte de carbono utilizada em g/L;

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

N = peso atômico do átomo de nitrogênio;

MMFN = massa molar da fonte de nitrogênio utilizada;

C_{g/L}(N) = concentração da fonte de nitrogênio utilizada em g/L;

Figura 5: Fórmula da relação C/N utilizados nos meios de cultura. Fonte: FREITAG (2019)

5.3. Condições de Cultivo

Todos os materiais utilizados para inoculação foram autoclavados (120 °C, 1 atm, 20 min), incluindo: as vidrarias, os meios de cultura, e as ponteiras. As vidrarias, sem meio de cultura e com tampões, e as ponteiras foram colocadas em estufas para secagem, de forma a evitar qualquer contaminação.

Os cultivos em meio NFb HP líquido foram feitos utilizando as diferentes fontes de carbono, conforme descritos anteriormente, sendo mantidos sob agitação orbital (120 rpm) 30°C por 24h. Todos os meios de cultivo líquido em larga escala para obtenção do EPS foram realizados em oito réplicas.

Inicialmente, uma alíquota dos estoques de glicerol 50% com *H. rubrisubalbicans* M1 foi inoculada em 2,0 mL de meio NFb HP-malato líquido para recuperação da estirpe, em pré-inóculos frescos, para crescimento em 24h. Após, uma alíquota do cultivo crescido foi inoculada em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio NFb-malato líquido. Após 24h de crescimento nas condições descritas anteriormente, a densidade óptica em 600 nm (D.O.₆₀₀) deste pré-inóculo foi determinada, sendo calculado o volume necessário para ser inoculado nos cultivos de grande escala com a fonte de carbono (8 erlenmeyers com 0,5 L cada) a fim de que a D.O.₆₀₀ inicial igual a 0,01. Após o volume obtido, foi transferido para o meio de cultura final e posto para crescimento por 24h (120 rpm, 30°C), para obtenção posterior do EPS.

5.4. Obtenção dos EPS

Após o crescimento de *H. rubrisubalbicans* M1 em 4 L de meio NFb líquido na presença das diferentes fontes de carbono, foram removidas as células por centrifugação (5.000 rpm, 15 min). Em seguida, separou-se o sobrenadante para reduzir seu volume para 500 mL por rotaevaporação. O sobrenadante contendo o EPS foi submetido a uma diálise exaustiva (MWCO 13-14 kDa) em água corrente e, após, em água destilada. Após a diálise, os materiais obtidos de cada fonte de carbono foram liofilizados e submetidos a um tratamento com 3 volumes de etanol gelado, seguido de centrifugação (10.000 rpm, 15 min) para obtenção dos EPS, e gerando as amostras brutas no precipitado EBM (manitol) e EBG (manitol). Em seguida, o material bruto, de cada meio, foi pesado e ressuspendido no menor volume de água destilada possível (70 mL para EBM e 30 mL para EBG), sendo deixado sob agitação por 24h à 30°C, para ser novamente centrifugado e gerar duas frações de

cada amostra: EPS solúvel e EPS insolúvel. Por fim, as frações solúveis foram liofilizadas e identificadas como: EGS (sobrenadante glicerol solúvel) e EMS (sobrenadante manitol solúvel). Já as frações insolúveis foram identificadas como: EGI (sobrenadante glicerol insolúvel) e EMI (sobrenadante manitol insolúvel), posteriormente utilizadas nas análises estruturais do EPS.

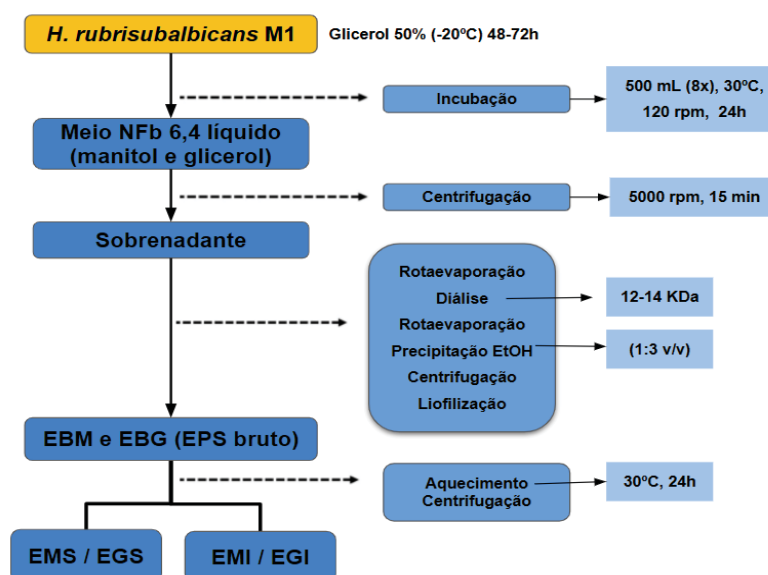


Figura 6: Fluxograma demonstrando o método de extração e purificação do material bruto (EBM e EBG), solúvel (EMS e EGS) e insolúvel (EMI e EGI).

5.5. Determinação da Composição Monossacarídica

Uma alíquota (5 mg) de cada amostra contendo os EPS brutos obtidos dos diferentes cultivos foi inicialmente submetida à hidrólise total com TFA (1M, 8h 100°C) e, após a evaporação do ácido, foi solubilizada em água ultra pura e reduzida com NaBH₄ em excesso, obtendo-se um pH alcalino em torno de 10-11 (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Após, a solução foi deixada em repouso em temperatura ambiente *overnight*.

Após, o material foi neutralizado com gotas de AcO₂, lavado 3x com MeOH seguido de evaporação a cada lavagem e submetido à acetilação com anidrido acético e piridina (1:1 v/v) em estufa à 120 °C por 1h (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os derivados alditol acetato resultantes foram recuperados da solução com a adição de 1 mL de clorofórmio, sucessivas lavagens com solução de CuSO₄ (5%) e a última com água destilada, e por fim fez-se a recuperação da fase orgânica. Após a secagem do clorofórmio em temperatura ambiente, o material foi ressolubilizado em 1 mL de

acetona e submetido à análise de GLC-MS (Cromatografia de gás-líquido acoplado à espectrometria de massas).

5.6. Derivados Alditol acetato parcialmente metilados (PMAA)

A determinação das ligações glicosídicas presentes nos EPS foi realizada a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente per-O-metilados (PMAAs), segundo o método descrito por Ciucanu e Kerek (1984).

No primeiro momento, 5 mg do material insolúvel foram solubilizados em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), deixando-o agitar por 12h (*overnight*). Após esse período, foi adicionado NaOH anidro em pó em excesso e agitado em um vórtex num período de 20 min. Em seguida, foram feitas adições de 1 mL de iodeto de metila ou iodo metano (CH_3I) realizadas a cada 5 min, agitando-se o material no agitador magnético no intervalo de cada adição. O processo a partir da adição do NaOH foi repetido até a solução obter uma aparência opalescente.

O material foi deixado por 12 h à temperatura ambiente antes de ser neutralizado com gotas de ácido acético glacial, diluído em 5 volumes de água, e submetido à diálise exaustiva (1 KDa) contra água corrente. O material retido na membrana foi liofilizado e submetido ao procedimento de metilação novamente. Os EPS per-O-metilados foram hidrolisados com TFA 2M, durante 8 h à 100 °C. O hidrolisado resultante foi liofilizado e submetido aos processos de redução e acetilação, conforme descrito, exceto pela substituição do NaBH_4 por NaBD_4 (boridreto de sódio deuterado). Os derivados PMAA foram submetidos à análise por GC-MS e identificados de acordo com o tempo de retenção e perfil de fragmentação por impacto de elétrons (SASSAKI *et al.*, 2005).

5.7. Obtenção de oligossacarídeos por hidrólise parcial e FIT-DOG

A metodologia utilizada para obtenção de oligossacarídeos foi de hidrólise ácida total e parcial para a obtenção de oligossacarídeos com as amostras insolúveis (EMI e EGI) tratadas com 1 mL de 1M, à 100 °C por 1h, respectivamente (SERRATO, 2008).

Os mesmos materiais também foram submetidos ao método com algumas modificações descritas por Amicucci e colaboradores (2020). Inicialmente, solubilizou-se 20 mg do material em um tubo com vedação comprido com 20 mL de solução de

hidrólise branda contendo 5% de Peróxido de hidrogênio (30% v/v) e 95% de Acetato de sódio 40 mmol/L com adição de 65 mmol/L Sulfato de ferro III (20 µL). Sendo incubado em estufa por 1h a 100 °C. Após a retirada da estufa, deixou-se a solução esfriar em temperatura ambiente e adicionou-se 10 mL de NaOH 2 mol/L gelado. Posteriormente, fez-se uma alíquota de ácido acético para neutralização e reduziu-se com NaBH₄ *overnight*. Em seguida, a amostra foi dialisada em água corrente seguida de água destilada em membrana de 1 KDa, sendo liofilizado a amostra e posto para análise no MALDI-TOF.

5.8. Análises de CCD (Cromatografia de Camada Delgada)

O acompanhamento da formação dos oligossacarídeos obtidos das amostras insolúveis, contendo EPS, foi realizado por cromatografia de camada delgada, utilizando placas de alumínio impregnadas com sílica (Merck TLC sílica gel 60).

Após a aplicação do material na placa, esta foi ativada na estufa à 100°C por 5 min e posteriormente eluída com a fase móvel: acetato de etila:*n*-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v/v/v) (HOUGH; JONES, 1962). Após a eluição, as placas foram mantidas na estufa (100°C) até sua secagem completa e submersas em uma solução de orcinol (2,5 mg/mL em EtOH) contendo 5 % de H₂SO₄. A revelação das bandas foi realizada após o aquecimento a 100 °C por 5 min. Soluções padrão de monossacarídeos (Glc, Gal, Rha e Man) foram utilizadas para a comparação das distâncias de migração relativa (*R_f*) de cada banda.

5.9. Análises de MALDI-TOF-MS

As amostras insolúveis parcialmente hidrolisadas em 1 mol/L de TFA foram diluídas em água ultrapura (1 mg/mL), sendo então retirado 1 µL de cada amostra e misturado com 1 µL da solução da matriz previamente preparada (1:1 v/v), sendo utilizados duas soluções matriz separadamente.

Preparou-se a primeira solução matriz com uma solução de acetonitrila (100 µL), água deionizada (92 µL), TFA 5 % (8 µL) e HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) ou DHB (ácido 2,5-di-dihidroxibenzoico) saturado. A segunda solução foi preparada com EtOH gelado 20 % (200 µL) com DHB saturado. Após a preparação da matriz, realizou-se a homogeneização em um agitador vortex por 5 min e, em seguida, a centrifugação por 5 min em 10⁴ rpm.

A mistura da amostra e da matrix (1:1 v/v) foi aplicada em placas de aço inoxidável e, após a secagem em temperatura ambiente e cristalização da matriz por um período de 5 min, foram submetidas à análise de MALDI-TOF (modos positivos linear e refletivo; negativo linear e refletivo). Os espectros de massa obtidos (m/z) foram analisados pelo software FlexAnalysis.

5.10. Análises de RMN

As amostras solúveis contendo os EPS em cada condição de cultivo foram solubilizadas em 400 μ L de D₂O 99,8% e inseridas em tubos de quartzo de 5 mm de diâmetro para serem submetidas às análises de RMN (Bruker Avance 400). As análises mono (¹H) e bidimensionais (¹H/¹³C) foram realizadas em temperatura ambiente, sendo utilizado padrão interno de acetona em δ 2,22 (¹H) e δ 30,2 (¹³C). Os Experimentos de ¹H/¹³C (HSQC) foram realizados com amplitude espectral de 2,25 e 13,9 kHz para ¹H e ¹³C respectivamente, e dataset (t1 x t2) de 128 x 512 pontos com 32 scans. Após o procedimento, os dados foram processados utilizando o software *Topspin*, versão 3.6.5.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de produção de EPS pela estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi avaliada por pesagem nas frações brutas (EBM e EBG), solúveis (EMS e EGS) e insolúveis (EMI e EGI). A quantificação do EPS presente nos sobrenadantes, produzidos com fontes de carbono divergentes, foi realizada após a liofilização e determinação do peso seco dos materiais obtidos.

Dentre as amostras brutas, verificou-se que o EBM apresentou um peso total amostral consideravelmente maior (283,6 mg) em relação ao EBG (127,3 mg). Dado que as réplicas foram produzidas em 4 L de meio no total, as concentrações das amostras geraram, respectivamente, 70,9 mg/L e 31,8 mg/L, uma diferença de aproximadamente 45% (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração final obtida da produção do EPS de *H. rubrisubalbicans* M1 crescidos em 4 L de meio NFb com manitol e glicerol.

AMOSTRAS BRUTAS	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
EBM	70,9
EBG	31,8

Legenda: EBM (Exopolissacarídeo bruto provindo de manitol) e EBG (EPS bruto provindo de glicerol)

No trabalho de Freitag (2019), realizou-se cultivos a estirpe M1 com as mesmas fontes de carbono, e observou-se que o EPS provindo de glicerol resultou numa maior produção de EPS com uma relação C/N de 30. Este resultado difere do observado no presente estudo. Essa diferença pode ser explicada pela mudança na relação C/N de 30 para 6,4, sugerindo um possível desvio no metabolismo bacteriano na produção de EPS devido à alteração das condições de cultivo.

Após a análise da amostra bruta, as mesmas foram adicionadas em *erlenmeyers* com o mínimo de água destilada para agitar *overnight* em 30 °C, sendo posteriormente centrifugado e obtido os pesos das frações solúveis e insolúveis das amostras: EMS (99,3 mg) e EGS (15,8 mg); EMI (184,3 mg) e EGI (111,5 mg).

6.1. Caracterização estrutural

Com a finalidade de caracterizar a estrutura do EPS de *H. rubrisubalbicans* M1 crescido com diferentes fontes de carbono, obteve-se a máxima quantidade de material para análise através das repetições do meio de cultivo em larga escala. Dado que a demanda pelo material solúvel era baixa, foi feita a caracterização apenas do material insolúvel (EGI e EMI). Com a obtenção do material de estudo, realizaram-se as seguintes análises metodológicas: composição monossacarídica, HPSEC-MALLS, CCD, MALDI-TOF (hidrólise parcial e FIT-DOG), GC-MS (ligações glicosídicas) e RMN (¹H e HSQC).

Inicialmente, foi realizada a análise de composição monossacarídica das amostras dos EPS brutos purificados (EBM e EBG) da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*, utilizando equipamento de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (GLC-MS).

De acordo com os resultados de composição monossacarídica das amostras EBM e EBG (Tabela 2), percebeu-se que ambas as amostras apresentaram composição monossacarídica heterogênea com algumas divergências, indicando a presença de um possível heteropolissacarídeo.

Tabela 2: Composição monossacarídica dos EPS produzidos por *H. rubrisubalbicans* M1 por GLC-MS dos derivados alditol acetato.

Amostras brutas	Derivados Alditol Acetato (%)				
	Rha	Fuc	Man	Gal	Glc
EBM	9,7	1,1	7,8	81,5	-
EBG	4,1	2,8	16,9	50	25,5

- Ausência do derivado

Legenda: EBM (EPS bruto produzido a partir de manitol) e EBG (EPS bruto produzido a partir de glicerol). Monossacarídeos: Rha (Ramnose), Fuc (Fucose), Man (Manose), Glc (Glucose)

Notou-se que a galactose (Gal) foi o principal componente monossacarídeo dos EPS produzidos (EBM e EBG). Visto isso, denota-se que a amostra do EBM manteve de forma majoritária a formação de Gal, dado que a amostra EBM (81,7 %) é maior em comparação com EBG (50 %). Com relação à glucose (Glc), observou-se sua presença apenas na amostra EBG. Houve também que a porcentagem da Man no EBM obteve uma diminuição significativa em relação ao EBG. Já para a Rha, notou-se uma diminuição percentual da massa molar no EBG comparado com EBM.

De acordo com Monteiro e companhia (2012), há relatos, ainda não publicados, que sugerem que os genes relacionados à biossíntese de EPS pela espécie *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 podem produzir EPS compostos de Man, Glc e Gal (7:3:10), havendo a possibilidade de estar relacionado com os dados desses monossacarídeos obtidos acima.

Dando sequência ao experimento, as amostras insolúveis foram selecionadas para caracterização, sendo então, realizado um processo de hidrólise ácida em TFA 2 mol/L (8h/100 °C) (Figura 7). De frente, notou-se que ambas as amostras (EMI e EGI) revelaram bandas únicas e com *Rf* similares na fase móvel. Já as amostras em

comparação aos padrões monossacarídeos, não indicaram a presença de um monossacarídeo, podendo ter ocorrido uma falha ou destruição do biopolímero durante a hidrólise. Possivelmente, podem ser resquícios dos monossacarídeos, visto que estão em *R_f* próximos dos mesmos, verificando-se a necessidade de realizar um processo de hidrólise branda.

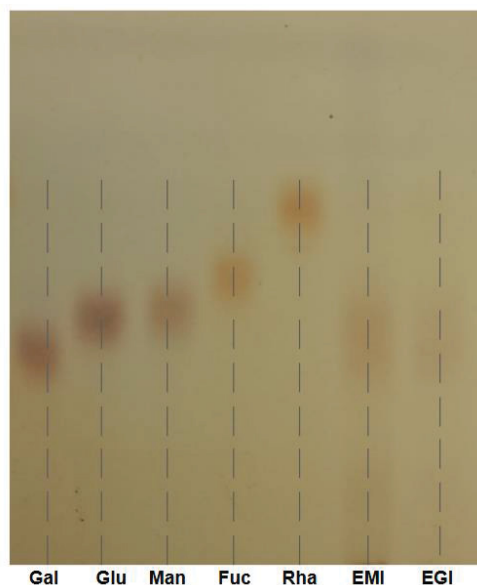


Figura 7: Cromatografia de camada delgada em sílica com padrão de manose (Man), galactose (Gal), Glucose (Glc), Fucose (Fuc) Ramnose (Rha), respectivamente, e amostras do sobrenadante insolúvel manitol (EMI) e glicerol (EGI) hidrolisadas com TFA 2 mol/L por 8h.

Dado o imprevisto, realizou-se em seguida uma hidrólise branda com apenas a amostra EMI em TFA 1 mol/L, 100 °C por 1h para avaliar a presença de oligossacarídeos. Em relação à amostra EGI, não foi feito o mesmo procedimento devido à baixa concentração de material. Notou-se na hidrólise branda (Figura 8) que houve a formação de algumas bandas características de monossacarídeos. Já na parte inferior da placa havia uma porção em grande concentração que acabou sendo arrastado pela fase móvel, havendo a possibilidade de ser um possível oligossacarídeo.



Figura 8: Cromatografia de camada delgada em sílica nas amostras do sobrenadante insolúvel manitol (EMI) hidrolisadas com TFA 1 mol/L por 1h. Composição da fase móvel: acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água ultra pura (4:2:2:1 v/v/v/v)

Dado o resultado anterior, realizou-se a análise da mesma amostra EMI feita em hidrólise parcial (TFA 1 mol/L / 1h) no MALDI-TOF para verificar o peso molecular (m/z) aproximado do oligossacarídeo. Nessa metodologia, utilizou-se inicialmente EtOH 20% como solvente da matriz.

De acordo com o espectro de massas (figura 9), observou-se, de frente, que o peso molecular total do EPS seria teoricamente 1423 Da. Sendo realizado uma análise das diferenças das razões massa/carga (m/z) para identificar o máximo de fragmentos possíveis nos EPS. De acordo com Ding *et al.* (2016) os padrões mais comuns para unidades sacarídicas são de unidades residuais de hexose (162 m/z), deoxihexose (146 m/z) ou pentose (132 m/z).

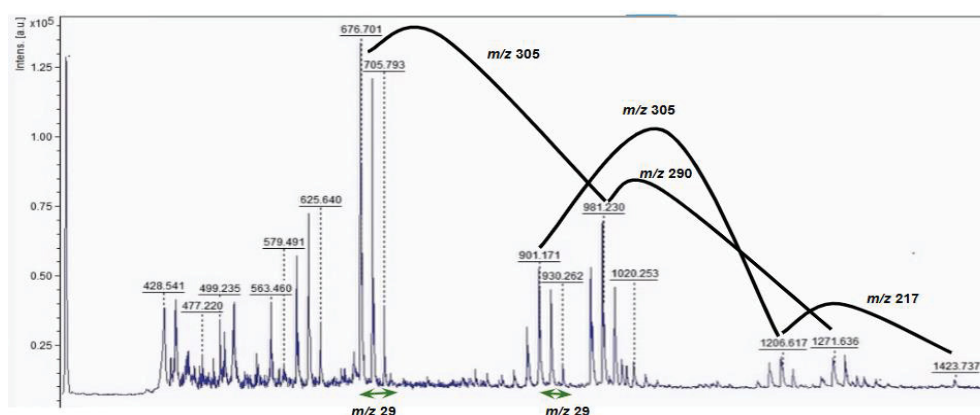


Figura 9: Espectrometria de massas da amostra insolúvel (EMI) hidrolisadas em TFA 1 mol/L realizadas no MALDI-TOF no modo linear negativo. Solução matriz: Etanol (20 %) e DHB.

Observou-se, então, a presença de uma série de m/z , sendo analisados m/z 676, 705, 901, 930, 981, 1020, 1206, 1271 e 1423. A diferença de m/z entre os quatro primeiros (m/z 676-705; 930-901) resultaram na presença de resquícios de grupamentos aldeído (m/z 29), no qual pode indicar a presença de monossacarídeos na amostra EMI. Em relação aos picos de *clusters* mais intensos (m/z 981, 1020, 1206, 1271), acabou-se não encontrando diferenças de m/z padrões de monossacarídeos, podendo ter ocorrido devido a uma hidrólise ineficaz. Além disso, acabou demonstrando um padrão de repetição de m/z 305 (m/z 1206-901; 981-676) em *clusters* separados, no qual, pode indicar a presença de mais de um oligossacarídeo. Nos últimos picos, entre m/z 1423 e 1206, demonstrou um fragmento de m/z 217, correspondendo, aproximadamente, com a massa de um fragmento de hexose (m/z 180) com a adição de um potássio (m/z 39) (GAURI *et al.*, 2009; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015).

Após a análise dos *clusters* dessa amostra, constatou-se que a natureza dessa molécula, possivelmente, é complexa para estudá-lo com apenas um tipo de método de hidrólise, sendo necessário a aplicação de outro método que consiga obter uma precisão maior na análise de MALDI-TOF.

Verificou-se, então, a necessidade de aplicar outra metodologia de hidrólise para melhor obtenção de oligossacarídeos, optando-se pelo método FIT-DOG (AMICCUCCI *et al.*, 2020) em ambas as amostras. Após o procedimento, constatou-se que nas duas amostras haviam similaridades de m/z na espectrometria de massas. Esse resultado se justifica, uma vez que a metodologia de Amicucci e colaboradores (2020) possui o objetivo de hidrolisar em direção às ligações glicosídicas de forma linear, o qual, acabou demonstrando a presença de um mesmo oligossacarídeo em ambas as amostras, podendo ser melhor visualizado na espectrometria de massas obtido (Figura 10).

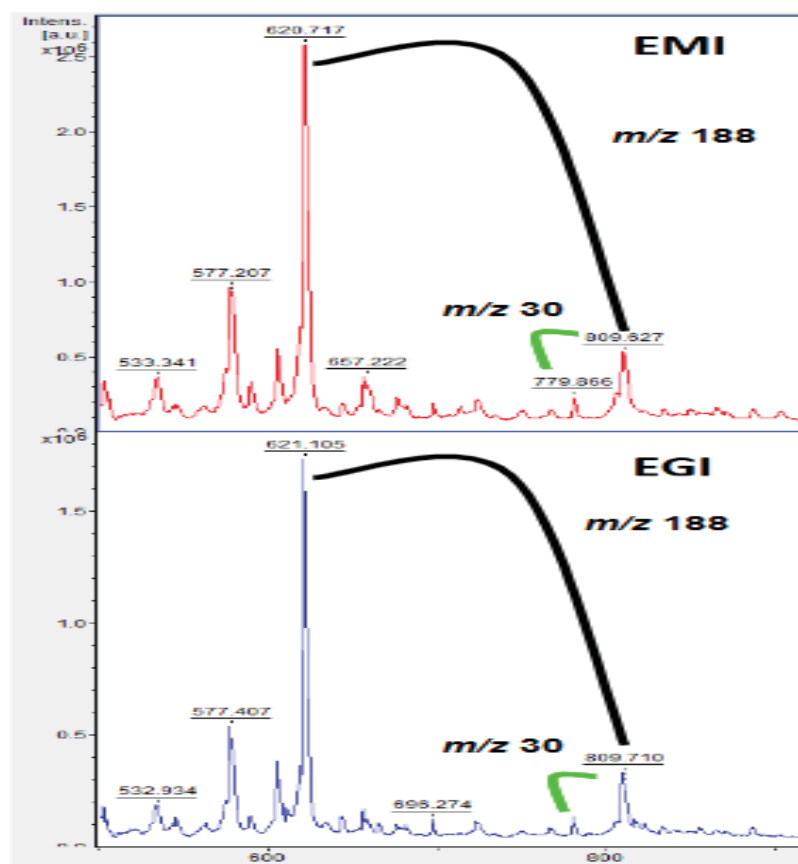


Figura 10: Espectrometria de massas das amostras insolúveis (EMI e EGI) hidrolisadas em pelo método FIT-DOG e realizadas no MALDI-TOF no modo linear negativo. Solução matriz: HCCA, TFA 8 % e acetonitrila P.A.

Notoriamente, percebeu-se que a massa molecular de ambas as amostras (EMI e EGI), da figura anterior, apresentou um peso molecular em torno de 809 Da, sendo uma massa menor que o encontrado na hidrólise anterior. Essa diminuição de massa pode ter ocorrido devido ao processo de hidrólise branda, tendo, possivelmente, perdido uma parte das massas menores durante o processo de diálise. Porém, percebeu-se na espectrometria de massas a obtenção de uma purificação mais adequada, em relação à anterior, e, além disso, semelhanças de m/z em ambas as amostras. De fato, a espectrometria de massas acabou sendo mais padronizada nessa hidrólise, demonstrando que a hidrólise é um fator crucial para melhor visualização na espectrometria de massas, podendo divergir dependendo da natureza da amostra.

Na análise dos picos de *clusters*, sugere-se nos EPS (EMI e EGI) que o íon m/z 809 pode tratar-se de um pentasacarídeo (m/z 828) com uma unidade de água

faltante (18 m/z), totalizando, aproximadamente, m/z 810. A diferença de m/z entre os picos dos *clusters* 779 e 809 resultou em grupos aldeídos, dando sinais de uma possível hexose. Os íons mais intensos, m/z 620 e 809, apresentaram um *cluster* de m/z 188, podendo estar relacionados com a unidade de fragmento de hexose (m/z 180).

Posteriormente, realizou-se a análise das ligações glicosídicas dos EPS insolúveis (EMI e EGI), sendo obtidas a partir da formação dos derivados alditol acetato parcialmente metilados (PMAA). Os resultados da metilação do EPS obtido do EMI apresentaram uma quantidade majoritária de derivados PMAA comparado com EGI, indicando um maior número de possíveis ligações glicosídicas em relação ao EPS produzido a partir de glicerol insolúvel (EGI). Nota-se que a porcentagem molar das unidades monossacarídicas PMAA com os alditóis acetatos, obtidos na composição monossacarídica (Tabela 3), foram divergentes, havendo a possibilidade de ter ocorrido uma metilação parcial em alguma das etapas da metodologia.

Tabela 3: Análise da composição dos derivados PMAA (Alditol Acetato Parcialmente Metilados) por GC-MS das amostras EMI e EGI.

Amostra	TR (min) ^a	Derivados PMAA	Ligação glicosídica deduzida	M % ^b
EMI	23,61	2,3-Me ₂ -Rha	→4)-Rhap-(1→	2,7
	24,41	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	t-Galp-(1→	13,7
	24,96	2,3,4,6-Me ₄ -Man	t-Manp-(1→	23,7
	26,31	2,5,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galf-(1→	11,6
	26,56	2,3,6-Me ₃ -Gal	→4)-Galp-(1→	23,2
	26,83	2,4,6-Me ₃ -Gal	→3)-Galp-(1→	3,7
	26,94	2,3,4-Me ₃ -Man	→6)-Manp-(1→	5,8
	27,82	2,6-Me ₂ -Gal	→3,4)-Galp-(1→	6,2
	28,70	2,3-Me ₂ -Man	→4,6)-Manp-(1→	9,4
EGI	24,93	2,3,4,6-Me ₃ -Gal	t-Galp-(1→	18,9
	26,17	3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glcp-(1→	10,6
	26,39	2,3,6-Me ₃ -Man	→4)-Manp-(1→	13,3
	26,53	2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glcp-(1→	41,4
	27,79	2,3-Me ₃ -Gal	→4,6)-Galp-(1→	1,9
	28,92	3-Me ₃ -Man	→2,4,6)-Manp-(1→	14

^a Tempo de Retenção em minutos

^b Porcentagem molar da unidade monossacarídica

De acordo com os resultados anteriores, a composição monossacarídica de ambas as amostras (EMI e EGI) coincidem com as unidades monossacarídicas obtidas na composição monossacarídica, dado que houve a presença de *Gal*, *Man*, *Rha* e *Glc* (YURIY; MARIE-ROSE, 2020). Segundo Knirel *et al.* (2020), esses

monossacarídeos são comumente encontrados em EPS bacterianos, sendo frequentemente encontrados na forma piranosídica. Monossacarídeos como *Gal* ou *Fuc* também podem ser encontrados na forma furanosídica (YURIY; MARIE-ROSE, 2020), o qual justifica a presença de *Gal* em ambas as formas na amostra EMI.

Adiante, observou-se que as duas amostras indicaram a presença de ligações t-Galp-(1→, dado que era o monossacarídeo em maior abundância, e a presença de t-Manp-(1→ apenas na amostra EMI. Com os dados obtidos, verificou-se a necessidade de realizar mais ensaios para obter confirmação dos dados, no entanto, foi possível obter uma caracterização parcial baseado na presença majoritária da composição e ligações de Man, Glc e Gal nas amostras. Dado essas informações, podem estar relacionadas com estruturas de mananas, galactanas, ou então, glucanas.

Com isso, as amostras foram parcialmente caracterizadas, sendo a amostra EMI, possivelmente poligalactanas com ligações na cadeia principal de t-Galp-(1→ (13,7 %), →4)-Galp-(1→ (23,1 %), →3)-Galp-(1→ (11,3 %), →3,4)-Galp-(1→ (6,2 %) e →3)-Galp-(1→ (3,7 %), resultando em uma porcentagem molar total de 57,95 %, nos quais entram em concordância com a concentração da Gal como monossacarídeo preponderante. Já nas unidades restantes de Man e Rha, podem tratar-se de dissacarídeos ou ramificações na estrutura do EPS. Sendo então, determinado ligações de t-Manp-(→ (23,7 %), →6)-Manp-(1→ (5,8 %), →4,6)-Manp-(1→ (9,4 %) e →4)-Rhap-(1→ (2,7 %).

Quanto à amostra EGI, podem tratar-se de EPS formados por glucanas devido à alta concentração molar de unidades de →2)-GlcP-(1→ (10,6 %) e →4)-GlcP-(1→ (41,4 %), o qual se apresentaram como o monossacarídeo com concentração majoritária. Estudos relacionados à produção de β-(1,2)glucanas cíclicas indicam alguns papéis com a interação com vegetais, tanto no crescimento vegetal quanto, até mesmo, na patogenicidade (CHO *et al.*, 2016; GUIDOLIN *et al.*, 2018). Alguns gêneros como *Burkholderia*, *Mesorhizobium* (KAWAHARADA *et al.*, 2010), *Rhizobium meliloti* MTCC 3402 (VENKATACHALAM *et al.*, 2013), *Agrobacterium tumefaciens* (MATTHYSSE, 2018) e *Xanthomonas* (VOJNOV *et al.*, 2001) são conhecidos por produzirem β-(1,2) glucanas cíclicas na interação planta-microrganismo durante a simbiose ou na patogenicidade.

Contudo, as amostras EGI também podem tratar-se também de galactoglucanas, dado que há a presença de t-Galp-(1→ (18,9 %), →2)-Glc-(1→ (10,6 %), →4)-Glc-(1→ (41,4 %) e →4,6)-Galp-(1→ (1,9 %). Houve também a presença de ligações →4)-Manp-(1→ (13,3 %), →2,4,6)-Manp-(1→ (14 %).

Por fim, foram feitas análises de HSQC e ^1H nas amostras solúveis (EMI e EGI) insolúveis (EMI e EGI). Entretanto, não houve resultados satisfatórios nas análises de RMN, visto que no HSQC não mostrou nenhum sinal na região anomérica. Com isso, não foi possível obter a análise devido, possivelmente, à natureza da amostra, podendo tratar-se de um material que requer outros procedimentos metodológicos de hidrólise para uma análise eficaz.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* obteve rendimentos de peso divergentes quando cultivadas em diferentes fontes de carbono, indicando que a alteração da fonte de carbono é um importante fator de influência no processo de biossíntese de EPS nessa estirpe;
- A amostra produzida a partir de manitol (70,90 mg/L) foi a que obteve maior concentração em relação ao glicerol (31,82 mg/L), mesmo sendo exposta nas mesmas condições de crescimento;
- O monossacarídeo Gal foi o que obteve a maior porcentagem molar na composição dos EPS (EBM e EBG), tanto no crescimento realizado com manitol (81,7 %) quanto em glicerol (50 %);
- O monossacarídeo Glc (25,5 %) apareceu apenas no EPS bruto produzido a partir de glicerol como fonte de carbono (EBG);
- A composição monossacarídica dos EPS insolúveis provindos de manitol (EBM) apresentaram Gal, Rha, Man e Fuc, apresentando um padrão de 8,5 : 1 : 0,8 : 0,1, respectivamente.
- A composição monossacarídica dos EPS insolúveis provindos de glicerol (EGI) apresentaram Gal, Glc, Man, Rha e Fuc, apresentando um padrão de 5 : 2,6 : 1,7 : 0,4 : 1, respectivamente.

- A técnica FIT-DOG apresentou ser uma metodologia eficaz na quebra de oligossacarídeos de forma linear, no entanto, devido à natureza das amostras (EMI e EGI), é necessário a repetição da hidrólise para uma análise mais assertiva.
- A amostra EMI e EGI apresentaram semelhança na análise de *clusters* no MALDI-TOF-MS, sendo oligossacarídeos com pesos moleculares semelhantes de 810 Da, sugerindo-se ser um pentasacarídeo na estrutura de ambos os EPS.
- Os cromatogramas dos derivados PMAA obtidos dos EPS insolúveis providas de manitol (EMI), como fonte de carbono, apresentaram majoritariamente a presença de Gal, t-Galp-(1→, →4)-Galp-(1→ e →3,4)-Galp-(1→, havendo a presença de →3)-Galf-(1→ norma furanosídica (11,63 %) e piranosídica (3,73 %). Obtendo-se também derivados de Man, t-Man-(1→ (23,7 %), →6)-Manp-(1→ (5,8 %), →4,6)-Manp-(1→ (9,4 %); e Rha, →4)-Rhap-(1→ (2,7 %).
- Os cromatogramas dos derivados PMAA obtidos dos EPS insolúveis providas de glicerol (EGI), como fonte de carbono, apresentaram majoritariamente os principais derivados de Glc, →4)-Glcp-(1→ (41,4 %) e →2)-Glc-(1→ (10,6 %) em ambas as amostras. Obtendo-se também derivados de Gal, t-Galp-(1→ (18,9 %) e →4,6)-Glc-(1→ (1,9 %); e Man, →4)-Manp-(1→ (13,3 %), →2,4,6)-Man-(1→ (14 %).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAHARI, R. K., *et al.* "Plant-microbe Interactions for Sustainable Agriculture in the Post-genomic Era". *Current genomics*. vol. 21. n.3. p. 168-178. 2020.

AMICUCCI, M. J., *et al.* A nonenzymatic method for cleaving polysaccharides to yield oligosaccharides for structural analysis. *Nature Communications*. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17778-1>. 11:3963. 2020.

ANTUNES, V. D. C., *et al.* Differential exopolysaccharide production and composition by *Herbaspirillum* strains from diverse ecological environments. v. 203. p. 3883-3892. 2021.

ARNOLD, M. F. F., *et al.* Important late-stage symbiotic role of the *Sinorhizobium meliloti* exopolysaccharide succinoglycan. *Journal of bacteriology*. v. 200. n. 13. 2018.

AUNG, K., *et al.* The role of water in plant–microbe interactions. *The Plant Journal*. v. 93. p. 771–780. 2018.

BABIN, D., *et al.* Impact of long-term agricultural management practices on soil prokaryotic communities. *Soil Biol. Biochem.* v. 129. p. 17–28. 2019.

BALDANI, J. I., *et al.* "A 4TH AZOSPIRILLUM SPECIES FROM CEREAL ROOTS." *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. BRASIL: ACAD. BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. Vol. 56. n. 3. 1984.

BALDANI, J. I., *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 36. p. 86-93. 1986.

BALDANI, J. I., *et al.* Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 46. p.802-810. 1996.

BALDANI, V. L. D., *et al.* BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS FIXADORAS DE N₂ EM ASSOCIAÇÃO COM PLANTAS. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). CNPAB (Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia). Seropédica/RJ. ISSN: 0104-6187. 1997.

BALDUCCI, E., *et al.* Polysaccharides' structures and functions in biofilm architecture of antimicrobial-resistant (AMR) pathogens. *International journal of molecular sciences*. v. 24. n. 4. p. 4030. 2023.

BARCELOS, M. C. S., *et al.* Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical reviews in food science and nutrition*. v. 60. n. 9. p. 1475–1495. 2019.

BIANCO, M. I., *et al.* Xanthan Pyruvilation Is Essential for the Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. 29:9. p. 688-699. 2016.

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

BRENNER, D. J., *et al.* *BERGEY 'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. Second Edition. V. 2: The Proteobacteria. Part C. The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2005.

BROWN, L. Who will feed China?: Wake-up call for a small planet. Routledge. 1995.

BROWN, S. P., *et al.* Soil origin and plant genotype structure distinct microbiome compartments in the model legume *Medicago truncatula*. *Microbiome*. v. 8. n. 139. 2020.

BURDMAN, S. *et al.* Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS microbiology letters*. v. 189. n. 2. p. 259–264. 2000.

CHO, E., *et al.* Properties and current applications of bacterial cyclic β -glucans and their derivatives. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. v. 85. n. 3–4. p. 175–185. 2016.

CHOU, F. L., *et al.* The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 233. p. 265-269. 1997.

CHRISTOPHER, W. N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. *Journal of Agricultural Research. Queensland*. v. 41. p. 259. 1932.

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

DALMOLIN, Diego A.; SILVA, Kelly Justin da; LIMA, Rejayne B.; *et al.* Fitopatologia. Porto Alegre: SAGAH. Grupo A. E-book. ISBN 9786556900056. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786556900056/>. Acesso em: 04 ago. 2023. 2020.

DEGRASSI G.; CARPENTIERI-PIPOLO, V. Bacterial Endophytes Associated to Crops: Novel Practices for Sustainable Agriculture. *Adv Biochem Biotechnol* v. 5. n. 1099. 2020.

DING, H. H., *et al.* Xyloglucans from flaxseed kernel cell wall: Structural and conformational characterization. *Carbohydrate Polymers*. v. 151. p. 538–545. 2016.

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

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

DOMŻAŁ-KĘDZIA, M., *et al.* Recent developments and applications of microbial Levan, A versatile polysaccharide-based biopolymer. *Molecules*. Basel, Switzerland. v. 28. n. 14. p. 5407. 2023.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. Federation of European Microbiological Societies John Innes Centre. Norwick. UK. 2010.

FALK, E. C.; JOHNSON, V. L. D.; BALDANI, J.; DOBEREINER, N. R. KRIEG. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 36. p. 80–85. 1986.

FAN, M. C., *et al.* *Herbaspirillum robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a lead-zinc mine. *Int J Syst Evol Microbiol.* v. 68. 1300-1306. 2018.

FERREIRA, A. S., *et al.* Insights into the role of extracellular polysaccharides in Burkholderia adaptation to different environments. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. REVIEW ARTICLE. v. 1. n. 16. December. 2011.

FITRIYANTO, N. A., *et al.* Ce³⁺-induced exopolysaccharide production by *Bradyrhizobium* sp. MAFF211645. *Journal of bioscience and bioengineering.* v. 111. n. 2. p. 146–152. 2011.

FREITAG, D. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* CULTIVADOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO. Universidade Federal do Paraná. 2019.

GARCÍA-OCHOA, F., *et al.* Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances.* v. 18. n. 7. p. 549–579. 2000.

GAURI, S. S. *et al.* Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter* sp. SSB81. *Bioresource technology.* v. 100. n. 18. p. 4240–4243. 2009.

GHOSH, P. K.; MAITI, T. K. Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume–bacteria symbiosis: — A review. *Achievements in the Life Sciences*. v. 10. n. 2. p. 136–143, 2016.

GILLIS, M., *et al.* Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum*. *Nitrogen Fixat.* 1991.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* (Cairo). 2012.

GONZALEZ-GIL, G., *et al.* NMR and MALDI-TOF MS based characterization of exopolysaccharides in anaerobic microbial aggregates from full-scale reactors. *Scientific reports*. v. 5. n. 1. 2015.

GOURION, B., *et al.* 2015. Rhizobium-legume symbioses: The crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* v. 20. p. 186-194. 2015.

GUIDOLIN, L. S., *et al.* Cyclic β -glucans at the bacteria-host cells interphase: One sugar ring to rule them all. *Cellular microbiology*. v. 20. n. 6. 2018.

HALE C. N.; WILKIE J. P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. v. 15. p. 448-456. 1972a.

HALE C. N, WILKIE J. P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. v. 15. p. 457-460. 1972b.

HALLACK, L. F., *et al.* Structural elucidation of the repeat unit in highly branched acidic exopolysaccharides produced by nitrogen fixing Burkholderia. *Glycobiology*. v. 20. n. 3. p. 338–347. 2010.

HAWKINS, J.P., *et al.* Succinoglycan production contributes to acidic pH tolerance in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Mol Plant Microbe Interact.* p. 30. p. 1009–1019. 2017.

HOUGH, L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. Methods Carbohydr. Chem. v. 1. p. 21-31. 1962.

HUANG, J., *et al.* Effects of carbon/nitrogen ratio, dissolved oxygen and impeller type on gellan gum production in *Sphingomonas paucimobilis*. Ann. Microbiol. v. 62. P. 299-305. 2012.

HUANG, H., *et al.* Biopolymers produced by *Sphingomonas* strains and their potential applications in petroleum production. Polymers. v. 14. n. 9. p. 1920. 2022.

ILYAS, N., *et al.* Exopolysaccharides producing bacteria for the amelioration of drought stress in wheat. Sustainability. v. 12. n. 21. p. 8876. 2020.

IM, W. T., *et al.* *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., 4-chlorophenol-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 54. p. 851–855. 2004.

ISFAHANI, F. M., *et al.* Characterizing the new bacterial isolates of high yielding exopolysaccharides under hypersaline conditions. Journal of cleaner production. v. 185. p. 922–928. 2018.

JACQUES, M. A., *et al.* Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. Annual review of phytopathology. v. 54. n. 1. p. 163–187. 2016.

JAMES, E. K., *et al.* *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J. Exp. Bot. v. 48. pág. 785–797. 1997.

JANSSON, P.-E. *et al.* Structural studies of acetan, an exopolysaccharide elaborated by *Acetobacter xylinum*. Carbohydrate research. v. 245. n. 2. p. 303–310. 1993.

JABBARI, F., *et al.* Comprehensive review on biosynthesis of hyaluronic acid with different molecular weights and its biomedical applications. International journal of biological macromolecules. v. 240, n. 124484. 2023.

JEONG, J. P., *et al.* Bacterial Succinoglycans: Structure, Physical Properties, and Applications. *Polymers*. cap. 14 v. 2. p. 276. 2022.

JUNCAN, A. M., *et al.* Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules*. Basel, Switzerland. v. 26. n. 15. p. 4429. 2021.

JUNG, S. Y., *et al.* *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.

KAUR, N.; DEY, P. Bacterial Exopolysaccharides as Emerging Bioactive Macromolecules: From Fundamentals to Applications. *Res. Microbiol.* v. 29. n. 104024. 2022.

KAWAHARADA, Y., *et al.* Identification of the *Mesorhizobium loti* gene responsible for glycerophosphorylation of periplasmic cyclic β -1,2-glucans: A gene for glycerophosphorylation of cyclic β -glucans. *FEMS microbiology letters*. v. 302. n. 2. p. 131–137. 2010.

KAWAHARADA, Y., *et al.* Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*. v. 523. p. 308–312. 2015.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* c. 64. 25–50. 1980.

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

KNIREL, Y. A.; CALSTEREN, M. R. V. Bacterial Exopolysaccharides. Zelinsky Institute of Organic Chemistry. Moscow. Russia. Saint-Hyacinthe Research and Development Centre. Agriculture and Agri-Food Canada. Saint-Hyacinthe, QC, Canada. 2020.

KONONENKO, O. K.; HERSTEIN, K. M. Non aqueous solvents for sucrose. Industrial & Engineering Chemistry Chemical & Engineering Data Series, Washington. DC. v. 1. n. 1. p. 87-92. 1956.

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

LIU, X., *et al.* *Herbaspirillum camelliae* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from *Camellia sinensis* L. *Arch Microbiol.* v. 202. p.1801-1807. 2020.

MADIGAN, M. T., *et al.* BROOK: Biology of Microorganisms. 14^a ed. 2015.

MALTHUS, T. R. An essay on the principle of population. St. Paul's Church-Yard. London. 1798.

MARQUES, A. C., *et al.* Biochemical characteristics, adhesion, and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum*. *Journal Clinical Microbiology.* v. 5. n. 1. p. 302-308. 2015.

MATTEOLI, F. P., *et al.* *Herbaspirillum*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology. p. 493–508. 2020.

MATTHYSSE, A.G., *et al.* Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol* 145:583-595. 1981.

MATTHYSSE, A. G. Exopolysaccharides of *Agrobacterium tumefaciens*. Em: Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, . p. 111–141. 2018.

MISHRA, S., *et al.* Biochemistry, synthesis, and applications of bacterial cellulose: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* v.10. 2022.

MONTEIRO, R. A., *et al.* Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and soil*, v. 356. n. 1–2. p. 175–196. 2012.

MORRIS, J.; GONZÁLEZ, J. E. The novel genes *emmABC* are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*. v. 191. n. 19. p. 5890–5900. 2009.

NADZIR, M. M., *et al.* Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review. *Polymers*. v. 13. n. 4. p. 530. 2021.

NETRUSOV, A. I., *et al.* Exopolysaccharides producing bacteria: A review. *Microorganisms*. v. 11. n. 6. p. 1541. 2023.

OLIVARES, F. L., *et al.*; 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., *et al.* Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph. *Herbaspirillum*. *New Phytol.* v. 135. p. 723–737. 1997.

OLIVEIRA, A. L. M., *et al.* Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and soil*. v. 284. n. 1–2. p. 23–32. 2006.

ONU. DAES (Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais). Population Division. *World Population Prospects*. 2022.

PANDEY, A., *et al.* Plant growth promoting microorganisms in sustainable agriculture. In: *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*. Elsevier. p. 1–19. 2019.

PANKIEVICZ, V. C. S. *et al.* Diazotrophic Bacteria and Their Mechanisms to Interact and Benefit Cereals. *Molecular Plant-Microbe Interactions:MPMI*. v. 34. n. 5. p. 491-498. 2021.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntnC* (*glnG*) type genes. *FEMS Microbiology Letters*. v. 23. p. 95-101.1984.

PEDROSA, F. O.; *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*. v. 7. 2011.

PELLOCK, B. J., *et al.* Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of bacteriology*. v. 182. n. 15. p. 4310–4318. 2000.

PIMENTEL, J. P., *et al.* Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*. v. 137. p. 61-65. 1991.

PINGALI, P. L. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, p. 12302–12308. 2012.

PRASAD, S., PUROHIT, S. R. Microbial exopolysaccharide: Sources, stress conditions, properties and application in food and environment: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*. v. 242. n. 124925. 2023.

PREMNATH, N., *et al.* Effect of C/ N substrates for enhanced extracellular polymeric substances (EPS) production and poly cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. *Environ. Pollut.* p. 275. 2021.

QIAO, J., *et al.* Colanic acid: Biosynthetic overproduction by engineering *Escherichia coli* and physical property characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 69. n. 46. p. 13881–13894. 2021.

RANA, S.; UPADHYAY, L. S. B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. International journal of biological macromolecules. v. 157. p. 577–583. 2020.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature. August. Vol. 8. pg. 578-592. Disponível em: www.nature.com/reviews/micro. 2010.

RODRIGUEZ, P. A., *et al.* Systems biology of plant-microbiome interactions. Molecular plant. v. 12. n. 6. p. 804–821. 2019.

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

RUDOLPH, K. W. E., *et al.* The role of extracellular polysaccharides as virulence factors for phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads. Em: Developments in Plant Pathology. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 357–378. 1994.

RUKA, D. R., *et al.* Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. Carbohydrate polymers. v. 89. n. 2. p. 613–622. 2012.

RÜTERING, M. *et al.* Controlled production of polysaccharides—exploiting nutrient supply for levan and heteropolysaccharide formation in *Paenibacillus* sp. Carbohydrate polymers. v. 148. p. 326–334. 2016.

SASSAKI, G.L., *et al.* Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. Carbohydrate Research. v. 340. p.731-739. 2005.

SCHMID, M., *et al.* The Genus *Herbaspirillum*. A. prokaryotes. Chapter 3.1.6. p.141-150. 2006.

SCHMIDT, M. A. *et al.* The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Poaceae*. BMC Microbiology. 2012.

SCHMID, J.; *et al.* Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. Front Microbiol. v. 6. 2015.

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

SERRATO, R. V. *et al.* Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. Carbohydrate polymers. v. 98. n. 1. p. 1153–1159. 2013.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. Science. Washington. v. 224. p.1095-1097. 1984.

SMIT, G., *et al.* Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. Bacteriol. 169:4294-430. 1987.

SMOL'KINA, O. N., *et al.* Capsular and extracellular polysaccharides of the diazotrophic rhizobacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z78. Microbiology. v. 81. n. 3. p. 317–323. 2012.

SONG, C., *et al.* Beyond plant microbiome composition: exploiting microbial functions and plant traits via integrated approaches. Front. Bioeng. Biotechnol. v.8. n. 896. 2020.

SULJA, A., *et al.* Comparative genomics to examine the endophytic potential of *Pantoea agglomerans* DAPP-PG 734. BMC Genomics 23. n. 742. 2022.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. In: Rose AH, Tempest DW (eds) *Advances in microbial physiology*. Academic Press. London. 1972.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky Framework. MINI-REVIEW. *Microbiology*. 147. 3-9. 2001a.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*. 11. 663–674. 2001b.

SRIKANTH, R. *et al.* Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr. Polym.* v. 120. p. 102–114. 2015.

THOMPSON, M. G., *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*: A Bacterium Primed for Synthetic Biology. Review article. *Biodesign research*. v. 2020. ID: 8189219. 2020.

TINTORÉ, M., *et al.* A long-chain dextran produced by *Weissella cibaria* boosts the diversity of health-related gut microbes ex vivo. *Biology*. v. 13. n. 1. p. 51. 2024.

TULESKI, T. R., *et al.* Cellulose production increases sorghum colonization and the pathogenic potential of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. *Nature. Scientific Reports*. v.9. p. 4041. 2019.

TULESKI, T. R., *et al.* *Herbaspirillum rubrisubalbicans* as a phytopathogenic model to study the immune system of *Sorghum bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, n.33. v.2. p. 235-246. 2020.

URTUVIA, V., *et al.* Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 33. n. 11. 2017.

VALDAMERI, G., *et al.* *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, a mild pathogen impairs growth of rice by augmenting ethylene levels. *Plant Molecular Biology*. V. 94. p. 625–640. 2017.

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

VALVERDE, A., *et al.* Exopolysaccharide Production and Cell Aggregation in *Azospirillum brasilense*. Em: *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 319–320. 2008.

VENKATACHALAM, G., *et al.* Cyclic β -(1, 2)-glucan production by *Rhizobium meliloti* MTCC 3402. *Process Biochemistry*. v. 48. n. 12. p. 1848-1854. 2013.

VOJNOV, A., *et al.* Regulation of the synthesis of cyclic glucan in *Xanthomonas campestris* by a diffusible signal molecule. *Archives of microbiology*. v. 176. n. 6. p. 415–420. 2001.

WANG, J., *et al.* Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate polymers*, v. 205, p. 8–26. 2019.

WHITE, F. F., *et al.* The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular plant pathology*. v. 10. n. 6. p. 749–766. 2009.

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

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. *Methods in carbohydrate chemistry 2*. New York: Academic Press. p. 65-68. 1963b.

XIAO, M. *et al.* Fucose-containing bacterial exopolysaccharides: Sources, biological activities, and food applications. *Food chemistry: X*. v. 13. n. 100233. 2021.

XU, G., *et al.* *Herbaspirillum piri* sp. nov., isolated from bark of a pear tree. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 68. p. 3652–3656. 2018.

YUAN, M., *et al.* Biosynthesis and applications of curdlan. Carbohydrate polymers. v. 273. n. 118597. 2021.

YURIY, A. K.; MARIE-ROSE, V. C. Bacterial Exopolysaccharides. Zelinsky Institute of Organic Chemistry. Moscow. Russia. Saint-Hyacinthe. Research and Development Centre. Agriculture and Agri-Food Canada. Saint-Hyacinthe. QC. Canada. 2020