

**Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Potencial biotecnológico de bactérias associadas a
plantas do Quadrilátero Ferrífero**

Érica Barbosa Felestrino

**Ouro Preto
2017**

Érica Barbosa Felestrino

Potencial biotecnológico de bactérias associadas a plantas do Quadrilátero Ferrífero

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.
Área de concentração: Genômica e Proteômica.

Linha de pesquisa: Bioprospecção de microrganismos associados a plantas.

Orientador: Dr. Leandro Marcio Moreira

Ouro Preto, Minas Gerais.

2017

F312p

Felestrino, Érica Barbosa .

Potencial biotecnológico de bactérias associadas a plantas do Quadrilátero Ferrífero [manuscrito] / Érica Barbosa Felestrino. - 2017.

123f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Bactéria promotoras de crescimento vegetal. 2. Biocontrole. 3. Biorremediação. 4. Biofertilizantes. I. Moreira, Leandro Marcio. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 602


[Catalogação: www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

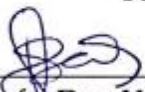
"Potencial biotecnológico de bactérias associadas a plantas do Quadrilátero Ferrífero"

Aos oito dias do mês de março de 2017, às 09h00min, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Érica Barbosa Felestrino**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por Aprovar a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

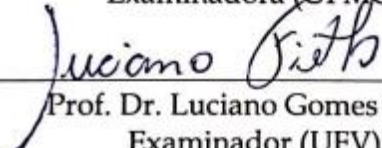
Membros da Banca Examinadora:




Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira
Presidente



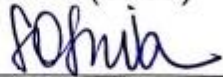
Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos
Examinadora (UFMG)



Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto
Examinador (UFV)



Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota
Examinadora (UFOP)



Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 08/03/2017



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto – Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil Tel: 55 (31) 3559 1680
E-mail: biotec@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/biotec

AGRADECIMENTOS

É um importante ciclo que se encerra.

Agradeço a Deus por me capacitar, pois, “tudo posso Naquele que me fortalece”.

À toda minha família, em especial minha mãe pelo constante apoio e amor imensurável,

Ao meu irmão pela amizade e sempre levantar minha estima,

Ao meu pai por se fazer presente em meu coração e me acalmar nos momentos difíceis,

À minha avó Geralda por não me deixar desistir e sempre me estimular com uma
comida gostosa,

Ao meu padrasto, por estar sempre disposto a ajudar,

Ao meu marido pela paciência e compreensão especialmente nos meus dias de mau humor, por cuidar de mim e da casa quando nessa rotina louca o tempo me faltava.

Agradeço ao meu orientador Leandro, o melhor “chefe” que eu poderia ter. Por acreditar em mim e dividir todo seu conhecimento. Obrigada pela paciência nesses 10 anos de orientação e pela responsabilidade na minha formação profissional.

A todos do LabGiba pela companhia e ajuda, em especial as minhas meninas Camila, Renatinha, Natasha, Izadora, Morghana e Izabela, vocês tornaram a rotina no laboratório muito mais divertida.

A todas do LabDNArepair.

Ao Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia, que dessa vez, não me deixou sem bolsa.

A todos os laboratórios que abriram suas portas para que pudesse realizar experimentos.

À CAPES pelo financiamento.

RESUMO

A ciclagem de nutrientes, a promoção do crescimento de plantas, a biorremediação de ambientes poluídos e o controle biológico de pragas e doenças vegetais são algumas das funções que residem em meio à diversidade genética e metabólica dos microrganismos do solo e associados a plantas. O crescimento vegetal muitas vezes está relacionado à capacidade de alguns microrganismos solubilizarem fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzir ou aumentar a concentração de hormônios vegetais como ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno ou ainda fixar nitrogênio associativamente. Alguns desses microrganismos controlam organismos fitopatogênicos provenientes do solo ou das sementes através da produção de sideróforos, 1,3-glucanase, quitinases, ácido cianídrico e antimicrobianos. Outros são responsáveis pela remediação de solos contaminados e assim permitem o crescimento de plantas em ambientes antes inóspitos. Sob tal perspectiva, o objetivo do trabalho foi isolar bactérias associadas a plantas do Quadrilátero Ferrífero (QF) e analisar o potencial biotecnológico relacionado à biofertilização, biocontrole e biorremediação. Dentre todas as plantas analisadas, um total de 307 bactérias foram isoladas, sendo muitas dessas capazes de produzir compostos classificados como promotores de crescimento vegetal. Algumas bactérias foram capazes de inibir patógenos humanos e de plantas. Do total, oito bactérias foram capazes de resistir e remediar ambientes contaminados com arsênio. *Alcaligenes faecalis* Mc250 foi um dos isolados que apresentou destacado potencial biorremediador, resistindo a 5 e 800mM de arsenito e arsenato, respectivamente, além de remover mais de 50% desse metal do meio. Análises genômicas desse isolado comprovaram suas adaptações ao ambiente hostil de origem. Os resultados demonstram a importância biológica de plantas brasileiras do QF como reservatórios de microrganismos com potencial biotecnológico.

ABSTRACT

Nutrient cycling, plant growth promotion, bioremediation of polluted environments and the biological control of pests and plant diseases are some of the functions that reside in the genetic and metabolic diversity of soil microorganisms and associated with plants. Plant growth is often related to the ability of some microorganisms to solubilize mineral phosphates or other nutrients in the soil and to produce or increase the concentration of plant hormones such as indole acetic acid, gibberellic acid, cytokinins and ethylene, or to fix nitrogen associatively. Some of these microorganisms control phytopathogenic organisms from soil or seeds through the production of siderophores, 1,3-glucanase, chitinases, hydrocyanic acid and antimicrobials. Others are responsible for the remediation of contaminated soils and thus allow the growth of plants in previously inhospitable environments. From this perspective, the objective of this work was to isolate bacteria associated with plants from Iron Quadrangle (IQ) and analyze the biotechnological potential related to biofertilization, biocontrol and bioremediation. Of all the analyzed plants, a total of 307 bacteria were isolated, many of them capable of producing compounds classified as plant growth promoters. Some bacteria were able to inhibit human and plant pathogens. Of the total, eight bacteria were able to resist and remediate environments contaminated with arsenic. *Alcaligenes faecalis* Mc250 was one of the isolates that presented a remarkable bioremediation potential, resisting 5 and 800mM of arsenite and arsenate, respectively, besides removing more than 50% of this metal from the medium. Genomic analyzes of this isolate proved their adaptations to the hostile environment of origin. The results demonstrate the biological importance of Brazilian plants of IQ as reservoirs of microorganisms with biotechnological potential.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Visão geral dos mecanismos de controle de especificidade de hospedeiros em interações parasitárias (A), mutualistas (B) e cooperativas (C). Extraído de: Combes-Meynet *et al.* 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulation rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* 163, 500-510 (2012)..... 3
- Figura 2:** Fitoestimulação e nutrição das bactérias promotoras de crescimento vegetal na raiz de planta. Extraído de Vacheron *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4, (2013). 6
- Figura 3:** Formas de antagonismo por bactérias promotoras de crescimento vegetal contra patógenos de plantas. Extraído de Pérez-Montañó, F.*et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbial Res* 169, 325-336 (2014) 10
- Figura 4:** Interação bacteriana com o metal pesado arsênio. As é absorvido através de transportadores de glicerol ou fosfato. O arsenato é reduzido a arsenito que pode então ser extrudido da célula por ArsAB ou metilado por ArsM em intermediário voláteis: arsenito monometílico (MMAs), dimetil arsenito (DMA) ou em trimetil arsina (TMA). A presença do metal controla a expressão de Ars. Arsênio fora do citoplasma pode ser usado para ganho de energia por oxidação de arsenito ou respiração anaeróbia por redução de arsenato. Extraído de Kruger, *et al* Bacterial metabolism of environmental arsenic—mechanisms and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97: 3827. doi:10.1007/s00253-013-4838-5..... 14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado dos ensaios bioquímicos de todos os isolados bacterianos coletados.	116
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHLs- homoseril lactonas
AIA- ácido indol acético
As (III)- arsenito
As (V)- arsenato
CRF- Campos Rupestres Ferruginosos
DHB- 2,3-di-hidroxibenzoato
DMA- dimetil arsenito
FeEnt- enterobactina ligada ao Fe
FRG- *Ferruginous Rupestrian Grasslands*
HCN- ácido cianídrico
IAM- indol-3-acetamida
IPyA- indol-3-piruvato
IQ- *Iron Quadrangle*
ISR- resistência sistêmica induzida
KEGG- *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LB- Luria- Bertani
Mc250- *Alcaligenes faecalis* strain Mc250
MIC- *minimum inhibitory concentration*
MMA- arsenito monometílico
NBRIP- *National Botanical Research Institute's phosphate growth*
NRPSs- *non-ribosomal peptide synthases*
OCBILs- *Old Climatelly-Buffered Infertile Landscapes*
PGPB ou PGPR- *Plant Growth Promoting Bacteria/Rhizobacteria*
QF- Quadrilátero Ferrífero
QS- *quorum sensing*
SAR- resistência sistêmica adquirida
TMAs- trimetil arsina
TXRF- *Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy*

O verdadeiro homem mede a sua força quando se defronta com o obstáculo.
Antoine de Saint-Exupéry

Sumário

1-Introdução	1
1.1-Quadrilátero Ferrífero e Campos ferruginosos	1
1.2- Interação entre plantas e microrganismos.....	2
1.3- Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	4
1.4- Mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal	5
1.5-Bactérias biocontroladoras: mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal	10
1.6- Bactérias biorremediadoras.....	12
2- Objetivos.....	17
Objetivo geral:.....	17
Objetivos específicos:	17
3-Capítulo I: Potencial biotecnológico de bactérias isoladas da planta holoparasita <i>Langsdorffia hypongaea</i> , sua hospedeira e rizosfera correspondente no Quadrilátero Ferrífero.	19
4- Capítulo II: Potencial biotecnológico associado a bactérias isoladas de nove plantas endêmicas e solo do Quadrilátero Ferrífero.....	35
5- Capítulo III: <i>Alcaligenes faecalis</i> isolada de <i>Mimosa calodrendum</i> e seu destacado potencial biorremediador	58
6- Capítulo IV: Genômica funcional e comparativa de <i>Alcaligenes faecalis</i> strain Mc250	78
8- Considerações finais	105
9- Atividades desenvolvidas	106
10- Perspectivas	109
11- Referências	110
12- Anexo	116

1-Introdução

1.1-Quadrilátero Ferrífero e Campos ferruginosos

O Quadrilátero Ferrífero é uma região localizada no Centro-Sul de Minas Gerais e seu embasamento e áreas circunvizinhas são compostos de gnaisses tonalítico-graníticos de idade arqueana (> 2.7 bilhões de anos) (Roeser e Roeser, 2010). Sua estrutura geológica, cuja forma se assemelha a um quadrado, perfaz uma área de aproximadamente 7200 km² ocupando um conjunto de serras dispostas quase ortogonalmente. Possui altitudes médias que giram em torno de 1.000 metros, sendo que as quotas mais elevadas são superiores a 2.000 metros (Serra do Caraça, a leste) e as mais baixas alcançam 600 metros (noroeste de Ouro Preto, arredores do distrito de Amarantina e município de Sabará) (Crespo, 2016).

Muitos tipos de vegetação ocorrem no Quadrilátero Ferrífero, variando de floresta decídua semi-tropical a campos rupestres, isso decorrente de sua alta geodiversidade, diferentes tipos de solo, altitudes e gradientes de clima (Jacobi e Carmo, 2012). Dentre as paisagens encontradas no Quadrilátero Ferrífero, os campos rupestres se destacam, pois correspondem um mosaico vegetacional que determina uma ampla variedade de micro-habitats. Essa heterogeneidade passa por afloramentos rochosos, cavernas, pastos, dentre outros (Jacobi e Carmo, 2012).

Estes campos rupestres ferruginosos correspondem a um ecossistema associado à crosta de ferro superficial e seu afloramento surgiu há milhões de anos, resultado do intemperismo de rochas ferríferas subjacentes e posterior enriquecimento de ferro, resultando em couraças que podem atingir dezenas de metros de espessura e se estender por milhares de hectares (Dorr II, 1969). A moldagem desse ecossistema ao longo dos anos originou comunidades extremamente adaptadas a condições únicas e severas. Por ser um afloramento de topo de montanha, todo seu bioma deve adaptar-se a altas exposições à radiação ultravioleta, altas temperaturas diárias, perda rápida de água, ventos fortes e cobertura de solo pouco desenvolvida (Jacobi *et al.*, 2007). Além dos

solos superficiais e ácidos (pH ~ 4,0), ocorrem níveis tóxicos de alumínio e metais pesados, como arsênio. Vale ressaltar que a toxicidade dos metais é agravada pelo baixo pH, o que aumenta a mobilidade do metal e assim a acessibilidade para sua absorção pelas plantas (Siqueira *et al.*, 2014).

Outro fato modulador de comunidades em campos rupestres ferruginosos é a carência nutricional resultante dos baixos teores de fósforo, nitrogênio, magnésio e cálcio contrapondo-se à abundância em ferro, manganês, cobre, níquel, zinco, cromo e chumbo (Siqueira *et al.*, 2014). Todas essas características geomorfológicas fazem com que os campos rupestres ferruginosos abriguem várias espécies raras (Giulietti *et al.*, 2009). Jacobi e Carmo (2012) catalogaram dezenas de espécies de plantas endêmicas restritas a estes geossistemas, o que reforça a ideia de adaptação a um ambiente peculiar. Apesar deste destaque, estas áreas possuem representatividade insignificante dentro do sistema nacional de unidades de conservação de proteção integral (Jacobi *et al.*, 2011), perspectiva esta que necessita ser reavaliada com o propósito de descontinuar esse negligenciamento.

1.2- Interação entre plantas e microrganismos

A sobrevivência das plantas e dos microrganismos a ela associados é fortemente influenciada por estratégia de adaptação e de especificidade, o que torna a relação de interação um conceito fundamental para a compreensão dos processos de coevolução e interações íntimas complexas (Kirzinger e Stavrínides, 2012). Combes-Meynet e colaboradores (2012) explicam que as interações entre plantas e microrganismos podem ser parasitárias, mutualistas ou cooperativas e o controle de especificidade dessas relações é dado pelo hospedeiro. Dentre os microrganismos associados a plantas, serão focadas as relações estabelecidas exclusivamente entre bactérias e vegetais, embora possam ocorrer também na presença de fungos, vírus e nematóides.

Nas relações parasitárias, as diferenças entre os genótipos bacterianos definem se a interação se dará de forma virulenta ou não. No caso de bactérias fitopatogênicas, o não reconhecimento de moléculas denominadas de avirulência (proteínas específicas) pelas proteínas de resistência da planta desencadeia a doença (Skamnioti e Ridout,

2005) (Figura 1-A). Em contrapartida, em relações mutualísticas estabelecidas, por exemplo, entre a simbiose de plantas leguminosas e rizóbios, tem sua especificidade decorrente de uma sinalização específica que se inicia com a percepção de compostos flavonóides liberados pela planta e o consequente desencadeamento da síntese de fatores Nod bacterianas (Provorov e Andronov, 2016). A percepção destes factores Nod por quinases receptoras específicas da planta leva à desdiferenciação de células localizadas na zona do córtex e, finalmente, a formação de nódulos fixadores de N₂ (Masson-Boivin *et al.*, 2009) (Figura 1 –B). Finalmente, em relações de cooperação, há propensão das bactérias em colonizar e estimular o crescimento da planta e isso se dá por meio de complexos mecanismos de reconhecimento que culminam na colonização da raiz, estabelecendo a partir daí uma troca de benefícios entre as espécies associadas (Combes-Meynet *et al.* 2012) (Figura 1-C).

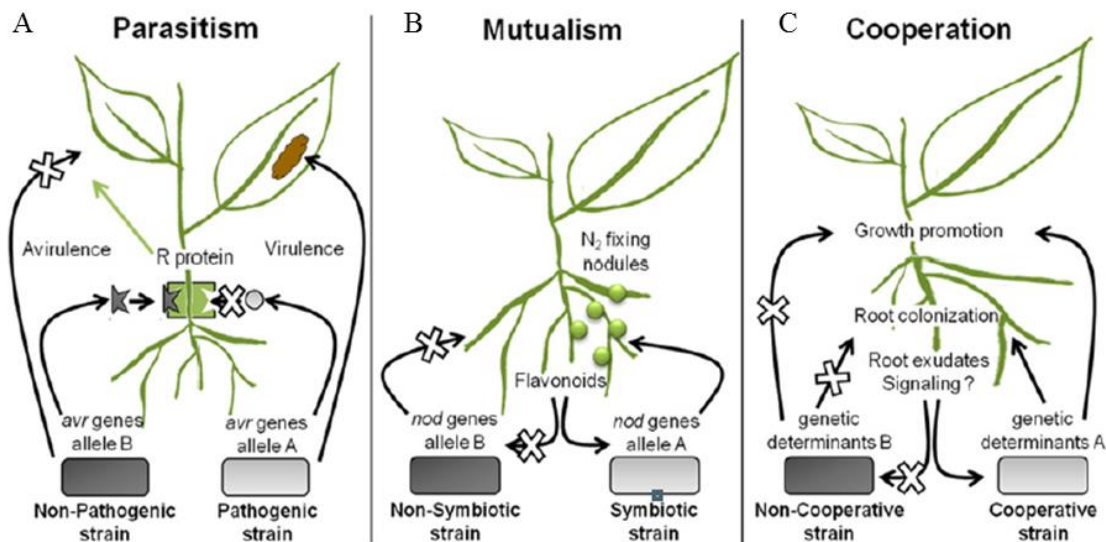


Figura 1: Visão geral dos mecanismos de controle de especificidade de hospedeiros em interações parasitárias (A), mutualistas (B) e cooperativas (C). Extraído de: Combes-Meynet *et al.* 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulation rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* 163, 500-510 (2012).

Nas relações mutualísticas e cooperativas a comunicação entre a planta e as bactérias do solo se dá por meio de rizodeposição, ou seja, compostos liberados pelas raízes da planta orientam um deslocamento de comunidades microbianas. Essa comunicação converge com a relação genética entre eles, aperfeiçoando o perfil de diferenciação da microbiota, seja ela endofítica ou rizosférica (Bulgarelli, 2013). Células rizodérmicas secretam uma vasta gama de compostos, incluindo os íons de

ácidos orgânicos, íons inorgânicos, fitormônios, açúcares, vitaminas, aminoácidos, purinas, nucleósidos e polissacarídeo responsáveis por esta migração bacteriana (Dakora e Phillips 2002). Este fenômeno quimiotático de bactérias em direção aos exsudatos radiculares é importante para a colonização das raízes e seleção orientada pelas plantas (Hartmann *et al.*, 2009), embora a capacidade do microrganismo de metabolizar o atrativo ainda pareça ser variável. Neste contexto biológico, a co-evolução das plantas frente a presença de microrganismos pode ter levado a modificações na composição dos exsudatos radiculares, permitindo uma seleção específica da microbiota por um dado genótipo da planta, promovendo assim seu crescimento e manutenção (Combes-Meynet *et al.*, 2012).

É importante destacar que este efeito quimiotático está frequentemente relacionado com adaptação nutricional, uma vez que esses atrativos são potencialmente utilizados por bactérias como fontes de carbono (Combes-Meynet *et al.*, 2012). Desta forma, no momento em que estes exsudatos são liberados, entre os microrganismos presentes na rizosfera se estabelece outras interações, onde se destaca especialmente a competição por esta rica fonte de carbono.

Em suma, o sucesso da simbiose depende da expressão das propriedades promotoras de crescimento vegetal pelas bactérias e da resposta favorável pelas plantas. Isso quer dizer que ela é dependente de um conjunto de mecanismos de adaptação bacteriana (propriedades quimiotáticas, habilidades metabólicas, capacidade de colonização radicular e regulação dos determinantes genéticos envolvidos nas propriedades promotoras de crescimento de plantas) e adaptações da planta (padrão de compostos exsudatos, propriedades da superfície radicular e sensibilidade à fitormônios bacterianos) (Combes-Meynet *et al.*, 2012).

1.3- Bactérias promotoras de crescimento vegetal

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB ou PGPR do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria/Rhizobacteria*) podem ser classificadas de acordo com as suas atividades benéficas para as plantas, como biofertilizantes, biocontroladoras ou biorremediadoras. As bactérias biofertilizantes aumentam o crescimento das plantas

diretamente, fornecendo nutrientes e fitormônios (Combes-Meynet *et al.*, 2012). As biocontroladoras protegem as plantas de patógenos por meio da produção de compostos incluindo antimicrobianos, ou estimulando a resistência das plantas (Combes-Meynet *et al.*, 2012). Já as biorremediadoras retiram componentes tóxicos do ambiente possibilitando o crescimento das plantas (Liu *et al.*, 2016). As bactérias biofertilizantes são consideradas promotoras diretas de crescimento vegetal enquanto as biocontroladoras e as biorremediadoras são promotoras indiretas, uma vez que não fornece nenhum composto utilizado diretamente no crescimento, mas interferem na saúde da planta (Bulgarelli, 2013).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser endofíticas, do solo e, em especial, derivados de rizosfera que são capazes de colonizar as raízes das plantas, sob certas condições ambientais e de solo (Caporaso *et al.*, 2010). O estabelecimento da simbiose associativa entre bactérias e plantas hospedeiras se dá em três passos: bactérias do solo se envolvem na rizosfera, se fixam à superfície radicular e, por fim, tornam a simbiose associativa efetiva (Combes-Meynet *et al.*, 2012). Uma vez atraídas para o rizoplano, estas bactérias têm de estabelecer e aderir ao sistema radicular para exercer suas propriedades benéficas. A colonização das raízes é um processo competitivo, que, como já dito, é afetada por características tanto das bactérias como das plantas hospedeiras (Kloepper, 1996).

1.4- Mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal

Uma vez estabelecidas sobre ou dentro da planta (rizosfera, rizoplano ou endosfera), as bactérias podem influenciar o crescimento destas por meio de diferentes mecanismos moleculares. Mecanismos bioquímicos são empregados por bactérias a fim de mobilizar e fornecer nutrientes para as plantas como, por exemplo, através da fixação de N₂, solubilização de fosfato e produção de sideróforo (Grady *et al.*, 2016). Também são importantes os mecanismos de interferência nos níveis de hormônio vegetal para promoção de crescimento da planta como produção de AIA (Santoyo *et al.*, 2016). A figura 2 ilustra algumas das relações envolvendo a biofertilização das bactérias promotoras de crescimento vegetal na raiz de planta.

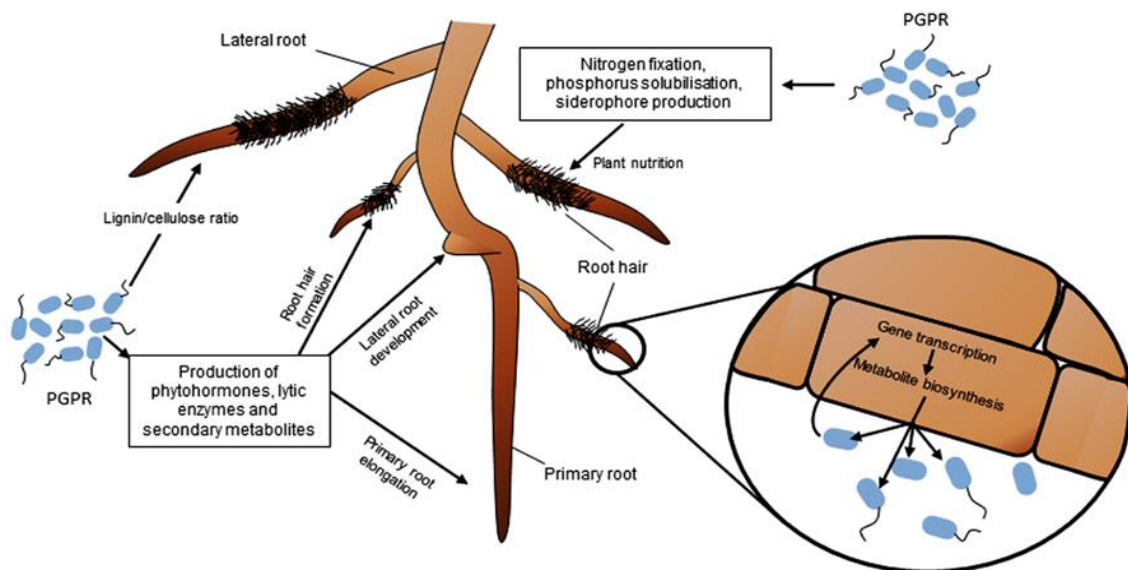


Figura 2: Fitoestimulação e nutrição das bactérias promotoras de crescimento vegetal na raiz de planta. Extraído de Vacheron *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* 4, (2013).

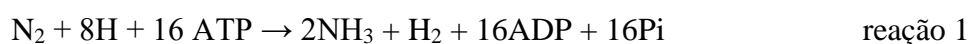
1.4.1-Produção de auxina

A família de moléculas com atividade de auxina está envolvida em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas, sendo a molécula mais importante o ácido indol acético (AIA) e o principal precursor para sua biossíntese o triptofano (Vernoux e Robert, 2016). Auxinas estimulam o crescimento de caule e raiz através do alongamento celular, sendo também responsáveis pela iniciação de raízes laterais (Teale *et al.*, 2008). Apesar de ser um hormônio produzido pelas próprias plantas, muitas bactérias associadas ao solo e plantas apresentam vias metabólicas de biossíntese deste hormônio, que uma vez secretado ao meio desencadeiam os mesmos mecanismos moleculares do fitormônio. Duas destas vias são bem caracterizadas em bactérias, a via do indol-3-acetamida (IAM) e a via do indol-3-piruvato (IPyA) (Bulgarelli, 2013). Na primeira via, o triptofano é convertido por uma monooxigenase de triptofano (IAM) e, num segundo passo, AIA é formado por uma hidrolase de IAM. Na segunda via, encontrada principalmente em bactérias benéficas, triptofano é transaminado para IPyA, que em seguida é descarboxilado a indol-3-acetaldeído, que é finalmente oxidado a AIA (espontaneamente ou por um aldeído oxidase/desidrogenase) (Bulgarelli, 2013).

A observação de que muitas PGPRs poderiam produzir AIA, em combinação com as experiências de inoculação com estirpes mutantes na produção de auxina, levou à conclusão de que a produção de auxina bacteriana é uma importante característica de promoção do crescimento de plantas (Spaepen *et. al.*, 2007). O que as colocam em interesse explícito na aplicação agrícola, uma vez que ao estimular crescimento de sistema radicular, permitem melhor fixação e maior captação de nutrientes, mesmo em solos carentes destes recursos.

1.4.2-Fixação de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial a todos os organismos, uma vez que faz parte da estrutura de proteínas e ácidos nucleicos. Ele se apresenta em vários estados de oxidação e formas químicas e as transformações dessas diversas formas são geralmente catalisadas por microorganismos (Hayatsu *et al.*, 2008). Desta forma, os microbiomas do solo constituem uma porção importante da biodiversidade que desempenham um papel central nos processos do ciclo do nitrogênio e contribuem para o funcionamento dos ecossistemas terrestres (Pajares e Bohannan, 2016). A fixação biológica de nitrogênio é o processo bioquímico em que nitrogênio gasoso é reduzido a amônia pela enzima nitrogenase, como demonstra a reação 1 abaixo:



Trata-se de uma reação amplamente estabelecida na simbiose rizóbio-leguminosa, e alguns estudos demonstram que até 460 kg de N pode ser fixado por hectare durante um ano (Bulgarelli, 2013). No entanto, este processo não é restrito a microrganismos simbiotes, podendo estar associado a bactérias de vida livre, presentes no solo, rizosfera e endosfera (Bulgarelli, 2013). Enquanto a maior parte do nitrogênio fixado por PGPR parece ser liberada na rizosfera, sendo a seguir utilizada pelas plantas, no caso das bactérias diazotróficas endofíticas a fixação de N₂ se dá de forma direta com transferência imediata do nitrogênio fixado para as células da planta (Combes-Meynet *et al.*, 2012).

Sequências de genes específicos disponíveis no genoma de bactérias endofíticas e da rizosfera revelam, na maioria dos casos, versatilidade no metabolismo do nitrogênio (Pajares e Bohannan, 2016). Uma conversão específica no ciclo de nitrogênio tem sido intensivamente estudada e consiste na redução dissimilatória de nitrato ou desnitrificação, em que o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-), como uma via respiratória alternativa (Pajares e Bohannan, 2016). Nitrito pode ainda ser convertido em óxidos de nitrogênio (N_2O e NO) ou amônia (NH_3). O papel destas vias é o de promover o crescimento vegetal e está relacionado, principalmente, aos últimos compostos. É importante ressaltar que NO é uma molécula de sinalização potente em plantas, alterando o crescimento da raiz e proliferação de uma forma dependente da auxina (Lamattina *et al.*, 2003).

1.4.3- Solubilização de fosfato

O fósforo é o segundo elemento mais importante para os vegetais após o nitrogênio, isso porque desempenha papel fundamental em praticamente todos os processos metabólicos das plantas como fotossíntese, transferência de energia, transdução de sinal, biossíntese de macromoléculas e respiração (Khan *et al.*, 2010). Embora seja abundante no solo, ele se encontra indisponível para a absorção das plantas em suas formas orgânica e inorgânica, pois ocorrem principalmente insolúveis (Sharma *et al.*, 2013).

Algumas PGPR do gênero *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* são capazes de disponibilizar o fosfato por meio de sua solubilização no solo. Dois mecanismos principais são fundamentais a esta solubilização: redução do pH do solo, mediado pela secreção de ácidos orgânicos, e mineralização em fosfato orgânico por fosfatases ácidas e fitases (Richardson *et al.*, 2009). A quantidade de fósforo solúvel liberado depende dos tipos de ácidos orgânicos produzidos por PGPR. Enquanto ácidos alifáticos, como o ácido glucônico ou 2-cetoglucônico, são mais eficientes na solubilização de fosfato (Ahmed e Shahab, 2011), na mineralização/solubilização a produção de ácidos orgânicos (tais como acético, succínico, cítrico e glucônico) ou fosfatases, são eficientes na liberação de ortofosfato de fósforos inorgânicos e orgânicos (Bulgarelli, 2013). Estratégias para melhorar a disponibilidade e absorção de fósforo podem contribuir

significativamente para o crescimento das plantas, porque menos que 5% do teor de fósforo de solos é biodisponível para as plantas (Bulgarelli, 2013).

1.4.4- Produção de sideróforo

Ferro é um micronutriente essencial para o crescimento das plantas (Kobayashi e Nishizawa, 2012) e dos microrganismos (Saha *et al.*, 2013). Ele participa de vários processos metabólicos, incluindo o ciclo do ácido tricarboxílico, a cadeia de transporte de elétrons, a fosforilação oxidativa e a fotossíntese (Fardeau *et al.*, 2011), além de regular a biossíntese de porfirinas, vitaminas, antibióticos, toxinas, citocromos, sideróforos, pigmentos e compostos aromáticos e síntese de ácidos nucleicos (Messenger e Barclay, 1983). Semelhante ao fósforo, o ferro é abundante no solo, mas apenas uma pequena fração está disponível para as plantas, devido à baixa solubilidade de óxidos de Fe^{3+} .

Para suprir a necessidade, mesmo diante destas condições, as plantas desenvolveram diferentes estratégias. A estratégia mais marcante é a de quelação e internalização deste íon do meio, através da liberação de moléculas quelantes de ferro de baixo peso molecular denominadas sideróforos (Ahmed e Holmströ, 2014). Essas moléculas podem eficientemente quelar ferro, e o complexo formado passa então a ser absorvido pelas raízes (Jeong e Guerinot, 2009). São sintetizados principalmente por NRPSs (*non-ribosomal peptide synthases*) e são classificados com base em seus grupos funcionais, sendo catecolatos, hidroxamatos e α -hidroxi carbolatos (Hertlein *et al.*, 2014).

Como as plantas, os microrganismos podem produzir uma ampla gama de sideróforos sob condições limitantes de ferro (Saha *et al.*, 2016). Desta forma, ocorre uma competição pela complexação de ferro na rizosfera entre diferentes microrganismos, e entre os microrganismos e plantas. Como os sideróforos de bactérias têm maior afinidade pelo ferro do que os sideróforos de plantas, as bactérias saem em vantagem (Ahmed e Holmströ, 2014). Em associação com as plantas, microrganismos produtores de sideróforos podem favorecer o crescimento das plantas, funcionando como bactérias promotoras de crescimento vegetal (Saha *et al.*, 2016).

Em um caso específico, os sideróforos bacterianos podem contribuir indiretamente para a promoção do crescimento das plantas, impossibilitando que o ferro fique disponível para agentes patogênicos como, por exemplo, o fungo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, limitando assim o seu crescimento na rizosfera (Duijff *et al.*, 1999).

1.5-Bactérias biocontroladoras: mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal

A promoção de crescimento vegetal por microrganismos pode se dar de maneira indireta através da atividade de controle biológico a agentes patogênicos de plantas. Algumas formas de controle de PGPR contra fitopatógenos estão sumarizadas na figura 3.

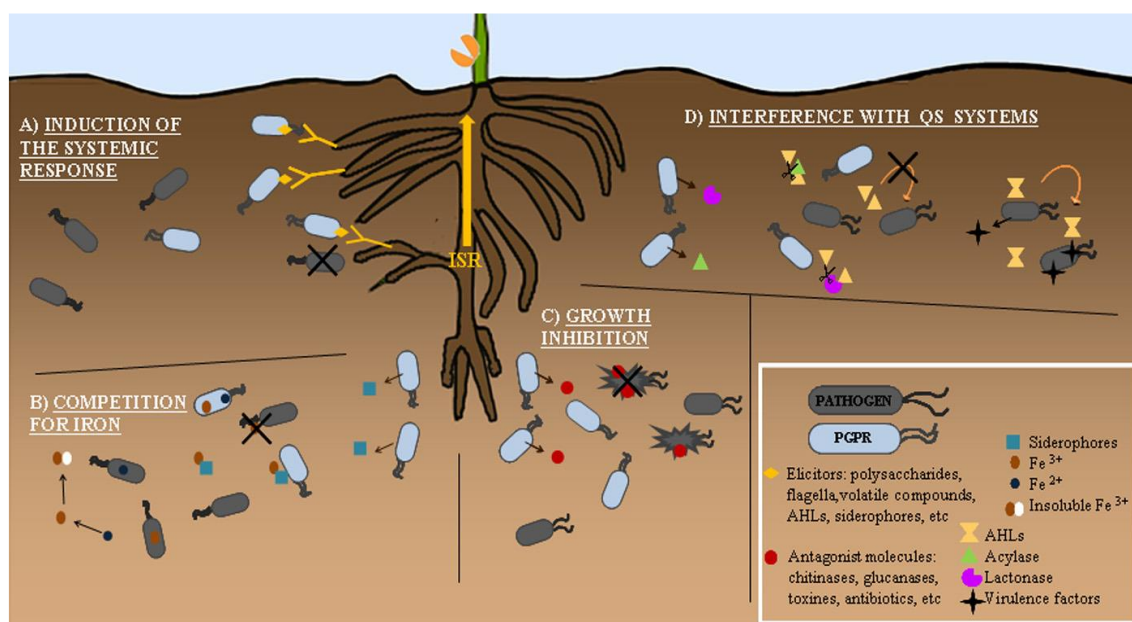


Figura 3: Formas de biocontrole por bactérias promotoras de crescimento vegetal contra patógenos de plantas. Extraído de Pérez-Montaña, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbial Res* 169, 325-336 (2014)

1.5.1- Indução de resposta sistêmica

A resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) são respostas fisiológicas das plantas ativadas por certas moléculas produzidas por microrganismos. A SAR é ativada por bactérias patogênicas através do ácido salicílico

liberado (López-Baena *et al.*, 2009). Por outro lado, as bactérias não patogênicas têm papel fundamental na ISR uma vez que sensibilizam e desencadeiam a resposta de defesa da planta contra um amplo espectro de organismos patogênicos através da sinalização de etileno e ácido jasmônico (Pérez-Montaña *et al.*, 2013). A ISR é um mecanismo no qual as PGPBs aumentam a resistência da planta modulando as propriedades físicas e bioquímicas da planta hospedeira (Pieterse *et al.*, 2002), sendo essa relação de estreita especificidade (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Desta forma as PGPBs atuam como promotoras indiretas de crescimento vegetal.

1.5.2- Interferência no sistema de quorum sensing

Muitas bactérias controlam a densidade populacional de seu nicho através da comunicação por moléculas diversas e consequente indução do processo de migração chamado *quorum sensing* (QS). Muitas plantas são capazes de produzir moléculas que interferem nos sistemas de QS das bactérias. Uma vez que detectam um patógeno, inibem o fenômeno a fim de impedir que essas bactérias se agreguem e cheguem até a planta para causar a doença. Por outro lado, se os microrganismos são benéficos, induzem o sistema de QS para que as bactérias se unam e alcancem a planta para benefício mútuo (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

As homoseril lactonas (AHLs) são moléculas produzidas por microrganismos que induzem o sistema de QS e regulam a expressão de genes ligados a produção do fator de virulência ou formação de biofilme em vários fitopatógenos (Quiñones *et al.*, 2005). Uma forma de promoção indireta de crescimento é a interferência nos fatores de virulência dos fitopatógenos por microrganismos benéficos do solo. Algumas bactérias produzem acilase ou lactonase, enzimas que degradam moléculas de AHLs. Uma vez degradadas, bactérias patogênicas que poderiam fazer uso destas moléculas para colonização do tecido vegetal tornam-se incapazes de fazê-lo. Desta forma, PGPBs capazes de interferir nos sistemas QS podem ser potencialmente utilizadas contra agentes patogênicos bacterianos.

1.5.3- Antagonismo

Uma das maneiras de se controlar o crescimento de fitopatógenos é através da produção de compostos com atividade antimicrobiana como por exemplo antibióticos, toxinas e compostos tensoativos ou a produção de enzimas de degradação da parede extracelular do patógeno como quitinases, proteases e glucanases (Haas e Défago, 2005). Muitos microrganismos podem sintetizar uma vasta gama de compostos com atividade antimicrobiana. Estes compostos podem ser oriundos de metabolismo secundário, ou caracterizar-se como moléculas protéicas/peptídeos derivadas ou não de síntese ribossômica (Bulgarelli, 2013). Essas PGPBs atuam na saudabilidade da planta e dessa forma, contribuem para seu crescimento.

1.5.4- Produção de ácido cianídrico

A produção de ácido cianídrico (HCN) desencadeia uma possível ação antagonica a patógenos. Insetos e outros herbívoros, ao entrarem em contato com o tecido vegetal durante ação de herbivoria, fazem com que glicosídeos cianogênicos entrem em contato com enzimas hidrolíticas do citoplasma das células, permitindo que as mesmas produzam ácido cianídrico. Fisiologicamente, o HCN inibe a cadeia respiratória ao se ligar com o Fe^{3+} da citocromo-oxidase na mitocôndria (Srinivasan *et al.*, 2012). Algumas bactérias apresentam capacidade de produzir esse ácido e, em associação benéfica com as plantas, estabelecem uma relação de proteção contra fitopatógenos.

1.6- Bactérias biorremediadoras

Sabe-se que muitas PGPR apresentam a capacidade de degradar poluentes do solo, e essa contribuição permite que as plantas se estabeleçam como vegetação natural em um local contaminado (Pérez-Montañó *et al.*, 2014). Esse potencial inclui degradação de compostos como herbicidas, pesticidas, compostos orgânicos perigosos, xenobióticos e metais pesados (Liu *et al.*, 2017).

O arsênio é um elemento de forte ameaça a saúde ambiental e humana. Sua ocorrência está associada a certos tipos de minerais, principalmente arsenopirita ($FeAsS$), loellingite ($FeAs_2$), realgar (As_4S_4) e arsenato pirita (FeS_2), que podem ser liberados para águas, solos e sedimentos por processos de oxidação desses sulfetos e

imobilizados por adsorção em óxidos ou hidróxidos de ferro (Deschamps *et al.*, 2003). Esses processos ocorrem naturalmente, mas podem ser intensificados pelas atividades de mineração, com a exposição de grandes volumes de rochas. No Quadrilátero Ferrífero, o arsênio tem uma estreita relação com os depósitos de ouro presentes em minerais como arsenopirita, löllingite ou como impureza em arsenopirita (Figueiredo *et al.*, 2006). Embora a remoção do arsênio em ambientes contaminados seja difícil, diversos grupos taxonômicos de microrganismos são capazes de metabolizá-lo naturalmente (Oremland *et al.*, 2004).

A toxicidade do arsênio depende do seu estado químico. Os estados redox típicos no ambiente são As (III) e As (V). O arsenato é um análogo estrutural do fosfato e compete com esse íon essencial em muitas reações enzimáticas, interrompendo a fosforilação oxidativa e privando as células de seu suprimento de energia. Por outro lado, o arsenito tem uma afinidade muito alta para grupos tiol e pode, portanto, inibir muitas enzimas que dependem destes grupos em posições catalíticas críticas (Hughes, 2002). O arsenito é considerado mais tóxico e perigoso do que o arsenato devido à inibição de proteínas além de possuir maior biodisponibilidade em ambientes aquosos a pH neutro ou ácido (Kruger *et al.*, 2013).

A captação de arsênio em células procarióticas é catalisada por várias proteínas transportadoras, devido à semelhança estrutural de As (III) e As (V) com os substratos dos respectivos transportadores (Kruger *et al.*, 2013). A semelhança estrutural entre o arsenato e o fosfato facilita os organismos a absorverem o arsenato por meio de transportadores de fosfato, enquanto que o arsenito é internalizado por meio de aquagliceroporinas, que se destinam principalmente à condução de solutos orgânicos, tais como ureia e glicerol (Javadevan e Kumari, 2016).

A figura 4 representa de forma resumida os processos de transporte e biotransformação de arsênio por bactérias.

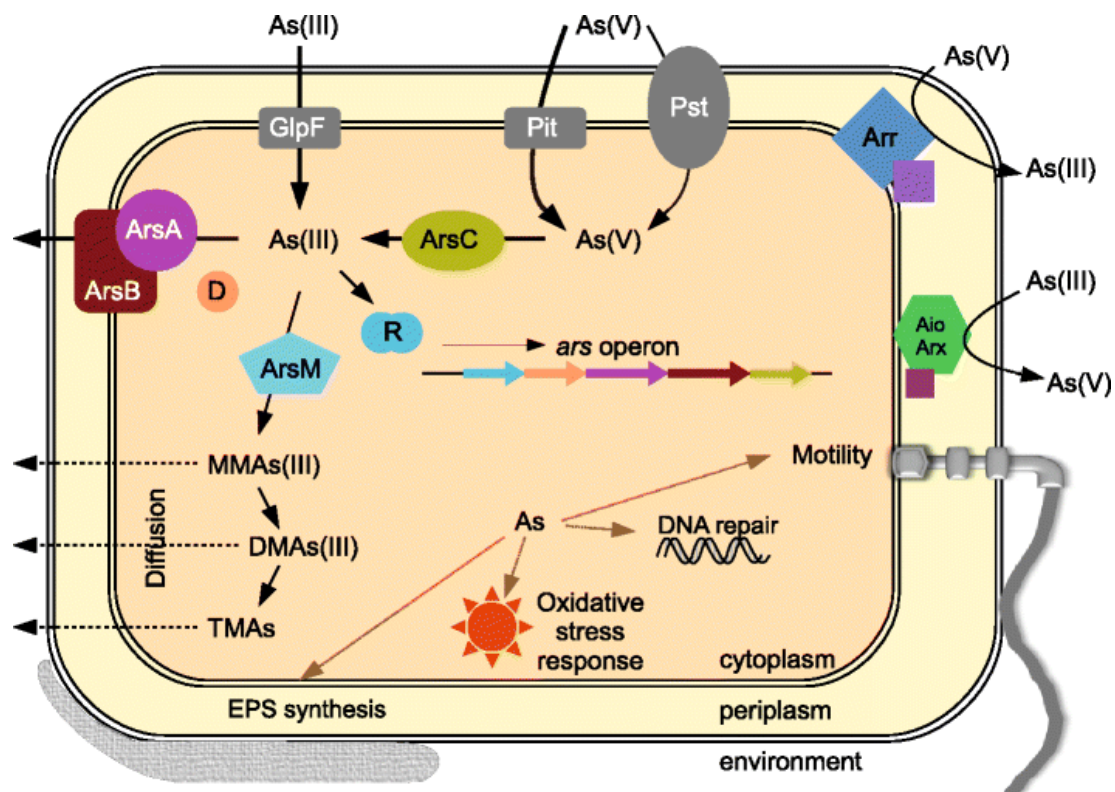


Figura 4: Interação bacteriana com o metal pesado arsênio. As é absorvido através de transportadores de glicérol ou fosfato. O arsenato é reduzido a arsenito que pode então ser extrudado da célula por ArsAB ou metilado por ArsM em intermediário voláteis: arsenito monometílico (MMAs), dimetil arsenito (DMA) ou em trimetil arsina (TMA). A presença do metal controla a expressão de Ars. Arsênio fora do citoplasma pode ser usado para ganho de energia por oxidação de arsenito ou respiração anaeróbica por redução de arsenato. Extraído de Kruger, *et al* Bacterial metabolism of environmental arsenic—mechanisms and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97: 3827. doi:10.1007/s00253-013-4838-5

A tolerância ao arsênio em bactérias é geralmente mediada pelos produtos gênicos do operon *ars* (Rosen, 2002). O conjunto de genes *arsRBC* e *arsRDABC*, conferem resistência dos procariontos a arsênio, sendo esse segundo associado com concentrações mais elevadas deste metal pesado. O arsenito é bombeado para fora da célula pela ação da proteína transportadora transmembranar ArsB. Alguns organismos possuem o gene *arsA* acoplado a *arsB* e, por codificar para uma ATPase, aumenta significativamente a resistência ao arsenito dos organismos que a possuem funcionalmente (Rosen, 2002). Em algumas bactérias, a proteína Acr3p pode substituir ArsB como a via principal para a extrusão de arsenito (Achour *et al.*, 2007), podendo também ser acoplado a *arsA* na ausência de *arsB* (Castillo e Saier, 2010). *ArsD* codifica para uma chaperona que transfere arsenito ligados a glutatona para a subunidade do complexo de ArsAB, ativando-o (Yang *et al.*, 2010). *ArsC* codifica uma arsenato redutase, cuja função é converter arsenato em arsenito, *arsH* codifica

uma oxidoreductase ligada a resposta ao stress oxidativo gerado por As e *arsN* codifica para uma proteína com função de acetiltransferases, associados com genes de resistência a arsênio (Bertin e Andres, 2016). A expressão dos genes associados aos operons *ars* é regulada em resposta à presença de arsênio, sendo o *arsR* o responsável por codificar o regulador de transcrição. Alguns outros genes ligados a resistência a arsênio foram elucidados, entretanto, não se sabe o papel exato nesse processo (Kruger *et al.*, 2013).

Além de resistir ao arsênio, algumas bactérias são capazes de biotransformar o arsênio, metilando-o como um mecanismo de detoxificação. O aumento da volatilidade dos arsênios metilados pode compensar o aumento da toxicidade de alguns intermediários e acredita-se que os genes *arsM* e *arsR* estejam envolvidos nesse processo (Qin *et al.*, 2006). Essa reação parte do arsenito, seguindo uma série de metilações oxidativas mediadas por S-adenosilmetionina metiltransferase e etapas redutoras com glutatona e outros compostos contendo tiol para a produção final de TMAs (trimetilarsina), em princípio, inofensivo (Cullen e Bentley, 2005).

A oxidação do arsênio também é considerada um mecanismo de detoxificação e algumas bactérias são capazes de realizar esse processo graças aos genes *aioAB* que codificam uma arsenito oxidase (Lett *et al.*, 2012). A regulação desse processo se dá pelas proteínas AioS e AioR e pelo fator sigma RpoN (Kang *et al.*, 2012). Além disso, AioX, uma proteína periplasmática, parece ser essencial para a regulação positiva da expressão de *aioAB* na presença de arsenito (Liu *et al.*, 2012).

Existem dois sistemas de redução de arsenito em procariotos, um codificado pelo gene *arsC* (descrito anteriormente) e o associado à arsenate reductase respiratória, codificada pelos genes *arrA* e *arrB* (Macy *et al.*, 2000). Outras proteínas acessórias como ArrC e ArrD podem auxiliar esse complexo (Richey *et al.*, 2009).

Durante esses processos de biotransformação de arsênio, as bactérias bioacumulam o metal até sua liberação sob outra conformação (Dhankhar e Hooda, 2011). Algumas bactérias também podem adsorver esse metal pesado que se liga na sua membrana ou no interior da célula. Neste processo, o metal adere a moléculas de superfície tais como a proteína de camada S (SLP) (Gerbino *et al.*, 2015).

Os avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento genômico e os sistemas de manipulação e processamento de dados destes sequenciamentos transformaram a genômica bacteriana em uma abordagem investigativa acessível em pequena e grande escala. Estudos genômicos oferecem grandes benefícios não apenas para uma compreensão detalhada dos processos e interações microbianas, mas também como auxílio na escolha e exploração de microrganismos de potencial aplicação biotecnológica (Goldston e Smith, 2016). O grande volume de dados genômicos procarióticos e a comparação de sequências de espécies estreitamente próximas revelam um vasto repertório de variações genômicas (Skovgaard *et al.*, 2011). São também essas variações fontes de novas descobertas, seja para buscar novos e eficientes biorremediadores, biocontroladores, biofertilizantes ou quaisquer outros potenciais alvos biotecnológicos associados aos microrganismos investigados.

2- Objetivos

Objetivo geral:

Investigar o potencial biotecnológico de bactérias associadas a plantas endêmicas e peculiares do Quadrilátero Ferrífero quanto à capacidade de atuação como biofertilizantes, biocontradores e biorremediadores de solo.

Objetivos específicos:

- Realizar testes de potencial antifúngico, antibacteriano e diazotrófico a partir de um banco de bactérias isoladas da planta *Langsdorffia hypogaea* e sua interface com plantas hospedeiras e rizosfera;
- Isolar bactérias associadas a raízes e rizosfera de plantas endêmicas e solo da canga da Serra da Moeda, Quadrilátero Ferrífero;
- Realizar ensaios bioquímicos de promoção de crescimento vegetal com as bactérias isoladas;
- Realizar ensaios *in vitro* e *in vivo* de antagonismo de *Xanthomonas citri* com os isolados bacterianos.
- Realizar ensaios de resistência e remoção de arsênio pelas bactérias isoladas.
- Identificar alguns destes isolados bacterianos mais interessantes na perspectiva de uso biotecnológico;
- Analisar a composição genômica de alguns dos isolados que se destacaram como tendo promissoras aplicações biotecnológicas.

Para facilitar a descrição dos resultados e seguindo as resoluções de redação da tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFOP, as seções metodologias, resultados e discussão foram agrupadas de acordo com os artigos científicos que foram elaborados a partir deste trabalho, como descrito abaixo:

- Capítulo I. Potencial biotecnológico de bactérias isoladas da planta holoparasita *Langsdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente no Quadrilátero Ferrífero (artigo publicado).

- Capítulo II. Potencial biotecnológico associado a bactérias isoladas de nove plantas endêmicas e do solo do Quadrilátero Ferrífero (artigo em fase de redação).
- Capítulo III. *Alcaligenes faecalis* isolada da planta endêmica *Mimosa calodrendum* e seu potencial biorremediador (artigo aceito para publicação).
- Capítulo IV. Genômica funcional e comparativa de *Alcaligenes faecalis* strain Mc250 (artigo em fase de redação).

3-Capítulo I: Potencial biotecnológico de bactérias isoladas da planta holoparasita *Langsdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente no Quadrilátero Ferrífero.

Título: Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection

Érica B. Felestrino, Iara F. Santiago, Luana da Silva Freitas, Luiz H. Rosa, Sérgio P. Ribeiro and Leandro M. Moreira

Este artigo é resultado advindo do objetivo de prospectar a microbiota associada a planta holoparasita *Langsdorffia hypogaea*, sua hospedeira e rizosfera correspondente e analisar o potencial desses isolados como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas. Parte dos dados deste artigo foi obtida durante meu mestrado, cuja conclusão se deu após dois anos de ingresso no doutorado. Optamos por compilar os resultados e gerar um único artigo de melhor qualidade em detrimento de dois de menor fator de impacto. A separação temporal em mestrado e doutorado depreciaria os resultados e limitaria a discussão desse modelo com um todo. Resumidamente, *Langsdorffia hypogaea* é uma espécie holoparasita pouco estudada e seu modelo de interação, junto ao solo peculiar do Quadrilátero Ferrífero, caracterizam-na como um modelo potencial para a descoberta de novos microrganismos de interesse biológico e biotecnológico. Foram obtidos o total de 81 isolados associados aos filos Firmicutes e Proteobacteria. A habilidade de produzir sideróforo, ácido cianídrico, ácido-indol-acético, fixar nitrogênio, secretar enzimas hidrolíticas e inibir enteropatógenos e fitopatógenos foi detectada em vários isolados. Os resultados auxiliaram a melhor compreensão desse modelo de interação, bem como classificam potenciais promotores de crescimento para aplicação na agricultura.

Este artigo foi publicado na revista *Frontiers of Microbiology* em 10 de fevereiro de 2017.



Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection

Érica B. Felestrino^{1,2}, Iara F. Santiago³, Luana da Silva Freitas⁴, Luiz H. Rosa³, Sérgio P. Ribeiro⁴ and Leandro M. Moreira^{1,2*}

¹ Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, ² Laboratório de Genômica e Interação Microorganismos-Ambiente, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, Brazil, ³ Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Programa de Pós-Graduação em Biomas Tropicais, Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Gero Benckiser, University of Giessen, Germany

Reviewed by:

Daolong Dou, Nanjing Agricultural University, China

Dananjeyan Balachandar, Tamil Nadu Agricultural University, India

*Correspondence: Leandro M. Moreira
lmmorei@gmail.com

Specialty section: This article was submitted to Plant Microbe Interactions, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*

Received: 29 July 2016

Accepted: 24 January 2017

Published: 10 February 2017

Citation:

Felestrino ÉB, Santiago IF, Freitas LS, Rosa LH, Ribeiro SP and Moreira LM (2017) Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. *Front. Microbiol.* 8:172. doi:10.3389/fmicb.2017.00172

Soil is a habitat where plant roots and microorganisms interact. In the region of the Brazilian Iron Quadrangle (IQ), studies involving the interaction between microbiota and plants have been neglected. Even more neglected are the studies involving the holoparasite plant *Langsdorffia hypogaea* Mart. (Balanophoraceae). The geomorphological peculiarities of IQ soil, rich in iron ore, as well as the model of interaction between *L. hypogaea*, its hosts and the soil provide a unique niche that acts as selective pressure to the evolution of plant growth-promoting bacteria (PGPB). The aim of this study was to prospect the bacterial microbiota of holoparasitic plant *L. hypogaea*, its plant host and corresponding rhizosphere of IQ soil, and to analyze the potential of these isolates as PGPB. We obtained samples of 11 individuals of *L. hypogaea* containing fragments of host and rhizosphere remnants, resulting in 81 isolates associated with Firmicutes and Proteobacteria phyla. The ability to produce siderophores, hydrocyanic acid (HCN), indole-3-acetic acid (IAA), nitrogen (N₂) fixation, hydrolytic enzymes secretion and inhibition of enteropathogens, and phytopathogens were evaluated. Of the total isolates, 62, 86, and 93% produced, respectively, siderophores, IAA, and were able to fix N₂. In addition, 27 and 20% of isolates inhibited the growth of enteropathogens and phytopathogens, respectively, and 58% were able to produce at least one hydrolytic activity investigated. The high number of isolates that produce siderophores and indole-3-acetic acid suggests that this microbiota may be important for adaptation of plants to IQ. The results demonstrate for the first time the biological importance of Brazilian IQ species as reservoirs of specific microbiotas that might be used as PGPB on agricultural land or antropized soils that needs to be reforested.

Keywords: *Langsdorffia hypogaea*, bioprospecting, biotechnological potential, plant growth-promoting bacteria, Brazilian Iron Quadrangle, IAA and siderophores

INTRODUCTION

Throughout evolution, plants have developed adaptive mechanisms related to interactions with microorganisms (Zilber-Rosenberg and Rosenberg,2008). Accordingly, plants comprise a complex host system, made up of different microhabitats that can be simultaneously colonized by a great diversity of endophytic and epiphytic microorganisms (Lodewyckx et al.,2002). This microbial community is essential for the development of plants since it facilitates the absorption of nutrients and at the same time provides protection against phytopathogens (Fungi, oomycetes, bacteria, viroses, protozoa, and nematodes) and herbivores (Lynch and Whipps,1990).

The rhizosphere or portion of soil that has close contact with the plant roots represents a highly dynamic environment that enables the interaction of roots with beneficial and pathogenic microorganisms, invertebrates and even root systems of other plants (Bais et al.,2006;Raaijmakers et al.,2009). The communication between the plant roots and organisms present in the rhizosphere is based on the production and secretion of chemicals that can cause different responses depending on the sensitivity or responsiveness of microorganisms present in this highly dynamic environment (Jones et al.,1994;Bertin et al.,2003;Badri et al.,2009).

Some microorganisms present in this plant rhizosphere- interface have the ability to solubilize mineral phosphates, among other soil nutrients (Rodríguez and Fraga,1999). Many of them synthesize, provide or increase the production of plant hormones such as indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid, cytokines and ethylene (Costacurta and Vanderleyden,1995); promote associative nitrogen fixation (Richardson et al.,2009); and produce siderophores (Kloepper et al.,1980), hydrolytic enzymes such as glucanases, chitinases, proteases, cellulases, and amylases (Bashan and de-Bashan,2005), hydrocyanic acid (HCN) (Voisard et al.,1989), and even antimicrobial agents (Compant et al.,2005). All these features allow classify them as plant growth-promoting bacteria (PGPB) (Bashan and Holguin,1998). Accordingly, plant growth is favored by the influence of the direct or indirect action of these microorganisms, which features them as important biotool of agronomic and environmental interest (Mirza et al.,2001;Ramamoorthy et al.,2001;Vessey,2003).

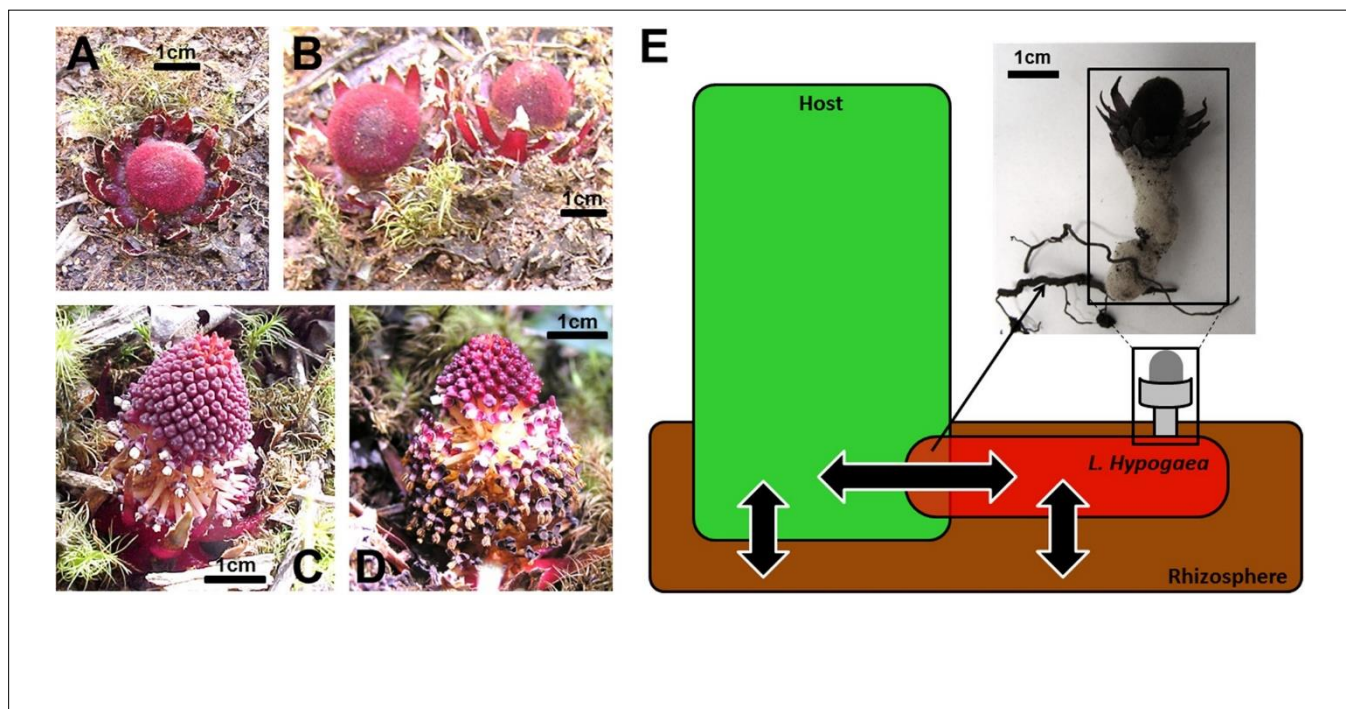
Besides this potential (Moore et al.,2003), these microorganisms are commercially important when capable of producing enzymes with different applicabilities in specific sectors. In the same way, secondary metabolites produced by these microorganisms have been used in medicine, when they have antibiotic, antitumor, antifungal, or antiparasitic activity (Bertin et al.,2003;Glick, 2010).

Therefore, understanding distinct interactions of the microbiota with soil and plants allow not only a better understanding of the biological models studied, but also prospecting potential uses of this microbiota or even its biomolecules in a biotechnological perspective. In this context, the search for new microorganisms and natural processes in environments with unique characteristics and that are neglected in biological studies are fundamental, and this is the case of the Brazilian Iron Quadrangle. The geomorphological peculiarities

of this soil rich in iron ore as well as the model of interaction with plants provide a unique niche that acts as a selective pressure to the evolution of PGPR. Furthermore, these peculiarities make this environment a potential hotspot of microbial diversity. Belonging to a geologically very old craton that covers about 7200 km², the IQ extends between southeast of Ouro Preto and northeast of Belo Horizonte, continuing to the south of Serra do Espinhaço. In this region, there are rocky outcrops that have a naturally high contamination of soil with heavy metals, which makes the environment very adverse for many plant species. Despite this adverse condition, the IQ presents a great floristic diversity with high levels of endemism (Jacobi and do Carmo, 2008). Due to its association with an extensive deposit of iron ore, and since it is one of the least studied ecosystems in Brazil, IQ has a seriously threatened biodiversity due to the intense mining activity associated with its iron outcrops.

Among the plant species threatened by this anthropic activity in IQ, there have been few studies particularly on holoparasitic plants, as in the case of *Langsdorffia hypogaea* MART, the model of this study, being Asteraceae (*Guatteria* genus), Fabaceae (*Dalbergia* genus), Melastomataceae (*Miconia* genus), and Myrsinaceae (*Myrsine* genus) the most representative families of potential host plants from *L. hypogaea* (Vale,2013). There are approximately 4200 species of parasitic plants distributed in 18 families and 274 genera (Nickrent,2002). *Langsdorffia hypogaea* is one of the 44 species of plants described belonging to the family Balanophoraceae, which includes herbaceous angiosperms, achlorophyllous plants and holoparasites of roots of trees, shrubs, and even herbaceous plants (Hsiao et al.,1995). In Brazil, this holoparasite is found in the Amazon, Caatinga, Cerrado, and Atlantic Forest (Cardoso,2014), and although it is not threatened by extinction, due to its wide distribution, it is considered at risk because of substantial habitat loss, due to global warming (Miles et al.,2004) and human use for obtaining wax (Pott et al.,2004). In some places, however, it is considered "Rare," and it is on the list of threatened flora of the state of Paraná, Brazil (Sema/Gtz,1995). In fact, a series of local compromising extinctions can be disrupting the gene flow of this species so vague in its biology of dispersion, and historical events may no longer correspond to the effective state of extinction threat. Morphologically, *L. hypogaea* has two regions that are well distinguishable anatomically, i.e., a basal vegetative body and an apical reproductive region. The vegetative body or rhizome is irregularly cylindrical, elongate and epigeal, with tomentose and fleshy appearance (Hsiao et al.,1995). The reproductive region is represented by dioecious, fleshy, unisexual inflorescences that erupt from ascending vegetative branches, encircle at the base by a sheath of bracts where the fruits are drupaceous and small (Hansen,1980;Cardoso et al.,2011) (**Figures 1A–D**). Haustoria extend from the vegetative body and attach to the roots of host plants (Nickrent,2002). Although there is direct connection with its host, part of vegetative body stays surrounded by soil, allowing intimate contact with organisms that live in the rhizosphere (**Figure 1E**).

Taking into account this anatomic-physiological perspective and composition of fixation substrate of the plant described above, some questions involving this model of interaction are



yet to be answered to better comprehend the biology of the species: understand if the microbiota living in association with *L. hypogaea* is shared to the host plant as well as with the rhizosphere, and verify if the potential of these bacterial isolates contribute to the adaptive mechanism of these plants in such a hostile environment as the soil from ferruginous fields.

In an attempt to answer these and other related questions, we carried out bacterial prospecting. The main objective was to identify which bacterial species were associated with *L. hypogaea*, the host and specific rhizosphere of the soil of the semidunal seasonal forests of Brigida hill, basically composed by sandy-clay textures, low concentration of P and K, high concentration of Ca, Mg, Fe, As, and Sb (Vale,2013), and pH values ranging from 3.9 to 6.2 in the first 20 cm deep (Filho et al.,2010). In parallel, biochemical assays were used to investigate the biotechnological potential of these isolates, which could be eventually used for various purposes.

MATERIALS AND METHODS

Location and Sampling of Plants and Rhizosphere Soil

The collections were made in Serra da Brigida (central point: 20°21' 35" S, 43°30' 11" W), which is part of Parque Natural Municipal das Andorinhas and is in southern part of Environmental Protection Area Cachoeira das Andorinhas, within IQ (Ferreira,2011), municipality of Ouro Preto, Minas Gerais – Brazil (**Supplementary Figure S1**). The topography of the region is sustained by itabirites and quartzites. Itabirites are iron formations, metamorphic and strongly oxidized, showing discontinuous bodies with high ore content (>64% Fe) (Rosière

and Chemale,2000). Sandy and flooded soils are absent and they have large amounts of humic substances (Jacobi and do Carmo,2008). In this forest fragment, we randomly collected 11 individuals of *L. hypogaea*, containing fragments of parasitized roots and remnants of corresponding rhizosphere. The samples were stored in sterile plastic bags and processed on the same day of collection.

Isolation of Bacteria, Media and Culture Conditions

The samples of *L. hypogaea* were externally disinfected using chlorine solution 2.5% by 2 min. We used for each sample five inner fragments of *L. hypogaea* root (~1.0 × 0.5 cm) inoculated in Luria-Bertani (LB) medium (Maniatis et al.,1982) containing 0.03 mg/L thiophanate, with pH adjusted to 6.0. The host root was washed following a standardized sequence of solutions for surface disinfection (9 g/L NaCl – 2 min, 70% alcohol – 2 min, 2,5% sodium hypochlorite – 2 min and 9 g/L NaCl – 2 min), and similarly, five fragments of each root of plant host were inoculated in LB medium. For the isolation of microorganisms present in the rhizosphere and in fragments of plant host root containing traces of soil (approximately 2 g), the samples were placed in a 10 mL of saline solution (0,5 NaCl g/L) for 10 min. Next, an aliquot of 100 µL of this solution was inoculated in selective LB medium. All plates were incubated at 25–28°C for a period of up to 10 days, and the microorganisms grown were isolated in new 60 mm diameter Petri dishes containing the same culture medium. The colonies isolated were photographed (front and back, data not shown) and grouped according to their origin. All isolates were cataloged and preserved in 30% glycerol and stored at –80°C.

DNA Extraction, Amplification, and Sequencing

DNA of the isolates was extracted using the CTAB/NaCl protocol (Doyle and Doyle,1987). The primers 27f and 1492r were used for amplification of bacterial 16S rRNA gene (Lane et al., 1985). The 50- μ L PCR mixture contained 20–50 ng of DNA, 250 pmol of each primer, 5 μ L 10x PCR buffer, 2.5 U rTaq DNA polymeraseTM (Invitrogen), and 100 μ M deoxynucleoside triphosphate mixture. The PCR program consisted of initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min of denaturation at 95°C, 45 s of annealing at 47°C and 2 min of extension at 72°C and a final extension for 10 min at 72°C, utilizing a 2720 ThermalCyclerTM (Applied Biosystems). The amplicons generated by PCR were verified in 1% agarose gels and purified using 20% PEG-8000 in 2.5 M NaCl (Arbeli and Fuentes,2007). The product obtained was quantified by spectrophotometry using a NanoDrop ND 1000TM (NanoDrop Technologies). Sequencing was carried with the DYEamicTM kit (Amersham Biosciences, USA) in combination with the MegaBACE 1000TM automated sequencing system (Amersham Biosciences, USA). The sequencing reactions were performed with 100–150 ng purified DNA and the reagents in the DYEamicTM kit (Amersham Biosciences, USA), using the manufacturer's recommendations. The program consisted of 36 cycles with an initial denaturation at 95°C for 25 min, followed by 15 s of annealing at 50°C and 3 min of extension at 60°C. After cycling, the reaction product was transferred to a 96-well sequencing plate to be precipitated.

For precipitation, 1 μ L of 7.5 M ammonium acetate was added to each well. Next, 28 μ L of absolute ethanol (Merck, USA) were added. The plate was vortexed and incubated for 20 min at room temperature, protected from light. Afterward, the plate was centrifuged for 45 min at 3200 \times g and the supernatant was discarded. Next, 150 μ L of 70% ethanol were added. The plate was centrifuged again for 15 min at 3200 \times g and the supernatant was then discarded. The plate was allowed to stand for 20 min, protected from light, para evaporation of ethanol. Precipitated DNA in each well of the plate was then resuspended in 10 μ L of loading buffer (present in sequencing kit). The plate was vortexed for 2 min, centrifuged for 1 s at 800 \times g and stored at 4°C, protected from light, until injection of samples in a MegaBACE 1000TM sequencer (Amersham Biosciences, USA).

Determination of Sequences and Phylogenetic Analysis

The contigs were assembled using the forward and reverse sequences of each 16S rRNA gene amplicon using Phred (Ewing and Green,1998;Ewing et al.,1998). The DNA sequences were analyzed utilizing the BLASTn program (Altschul et al.,1997). The sequences were aligned using the program Muscle (Edgar, 2004) and then curated by the program G-block (Castresana, 2000). A neighbor-joining phylogenetic tree was then determined using PhyML 3.0 (Anisimova and Gascuel,2006) followed by TreeDyn (Chevenet et al.,2006), and the statistical robustness of the analysis was estimated by bootstrapping with 1,000 replicates.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

All sequences obtained in this study were deposited in GenBank, according to the accession numbers given in **Table 2**.

Production of IAA

The production of IAA was determined by the method ofBric et al.(1991), with modifications. Bacterial producers of IAA were identified by the change in the color of the nitrocelulose disk from yellow (negative result) to red (positive result). The assays were made in triplicates and only those that achieved a positive result in at least two of them were accounted in the analysis.

Production of Ammonium Ions

The production of ammonium ions was determined by the indophenol method (Verdouw et al.,1978), using *Proteus* sp. as positive control (Vince et al.,1973). The samples were read at 690 nm, and the absorbance values were compared with a control condition. The assays were made in triplicates and only those that the absorbance values were greater than or equal to the *Proteus* values in at least two of the assays were accounted in the analysis.

Production of Siderophores

The production of siderophores was based on the work of Schwyn and Neilands(1987), with modifications. To remove traces of iron in medium it was made a pretreatment with hidroxiquinolone followed by separation using dropping funnel (Pierre et al.,2003). An orange shade of the culture medium around the regions where bacteria grew was indicative of production of siderophores. The assays were made in triplicates and only those that achieved a positive result in at least two of them were accounted in the analysis.

Nitrogen Fixation

Nitrogen fixation capacity was investigated using two serial methods: Nitrogen-free combined carbon (NFCC) semi-solid medium, free of N₂ (pH 5.7), supplemented with 5 g/L mannitol and 5 g/L sucrose (Dobereiner et al.,1976) and PCR using universal *nifH* primers (Burgmann et al.,2004). The Change in color of medium from yellow to green was indicative of the capacity to fix N₂. This assay was made in triplicates and only those that achieved a positive result in at least two of them were accounted in the analysis, which was confirmed by amplification of *nifH* fragment evaluated in 1.2% agarose gel. *Bradyrhizobium elkanii* BR96 was used as positive control.

Production of Hydrocyanic Acid (HCN)

The production of HCN was determined by the method ofBakker and Schippers(1987), with modifications. A change in yellow color of filter paper (negative result) to brown (positive result) indicated production of HCN. The assays were made in triplicates and only those that achieved a positive result in at least two of them were accounted in the analysis.

TABLE 1 | Distribution of bacterial representativeness of taxa found in *Langsdorffia hypogaea*, host and rhizosphere.

Phylogenetic group	Bacteria	Number of isolates (Shared with other niches)		
		<i>L. hypogaea</i>	Host	Rhizosphere
Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i>	1	2 (2)	3 (2)
	<i>Bacillus mycoides</i>	1		
	<i>Bacillus</i> sp.	3 (2)	4 (3)	2 (1)
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	4 (2)	1	
	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1	1	1
	<i>Lysinibacillus</i> sp.		3 (2)	3 (3)
	<i>Viridibacillus arenosi</i>			1
	<i>Paenibacillus taichungensis</i>		3 (2)	
Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter freundii</i>		1	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		
	<i>Enterobacter</i> sp.	1	1	2(1)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1		
	<i>Klebsiella</i> sp.	1		1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>			1
	<i>Shewanella</i> sp.		1	
	<i>Raoultella terrigena</i>			1
	<i>Rahnella</i> sp.	1		
	<i>Rahnella aquatilis</i>			1
	<i>Serratia marcescens</i>		2 (2)	1
	<i>Serratia proteamaculans</i>	3 (2)	5 (2)	8 (2)
	<i>Serratia</i> sp.		1	6 (2)
TOTAL	21	18 (6)	25 (13)	31 (11)

Production of Amylase, Cellulase, and Protease

Amylase activity was determined in 90-mm Petri dishes containing Yeast nitrogen base (YNB) medium (2%) containing 2 g/L soluble amide, 5 g/L peptone, and 1 g/L yeast extract, with pH adjusted to 6.0 (Strauss et al.,2001). Cellulase activity was determined in 90-mm Petri containing YNB medium (2%) supplemented with 0.5 g/L cellobiose and 1 g/L carboxymethyl cellulose (Teather and Wood,1982). Protease activity was determined in 90-mm Petri dishes containing culture medium composed of 20 g/L casein, 5 g/L peptone, 3 g/L yeast extract, 10 g/L glucose, and 20 g/L agar, with pH adjusted to 5.0 (Strauss et al.,2001). After 3 days of growth at 28 °C, the bacterial isolates in all assays producing a transparent halos determined the amylase, cellulose, or protease activity in the respective isolates and assays.

Inhibition of Entero- and Phytopathogens

To investigate a possible antimicrobial activity of the isolates, antimicrobial assays were performed against the following targets: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (opportunistic human pathogen), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (associated with food poisoning), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 (causal agent of pneumonia), *Shigella flexneri* (associated with dysentery) and *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (causal agent of citrus canker) using solid LB in a direct inhibition test. The assays were made in triplicates and only those that achieved a

positive result in at least two of them were accounted in the analysis.

To investigate the capacity of isolates to inhibit the growth of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* (causal agent of various diseases in plants), the isolates were grown in LB and then transferred to 60-mm Petri dish containing potato agar. The bacterial isolates were inoculated to make a square of approximately 2 cm on the culture medium. After

1 days of growth of these isolates at 28°C, a fraction of 4 mm² of culture medium containing *F. oxysporum* was inoculated exactly at the center of the plate (center of square), starting at a pre-growth of 5 days at 28°C. The bacteria capable of producing some anti-*Fusarium* substance hindered the growth of the fungus, compared to the growth profile of *Fusarium* under control conditions in the absence of bacterial isolate. The values to determine per cent inhibition were obtained by the formula (%) = (C × E)/C × 100, where C is the diameter of the *Fusarium* culture in control, and E is the diameter in the presence of bacterial isolate (Zhao et al.,2014). The assays were made in triplicates and the average of per cent inhibition was plotted in radar graph.

RESULTS

Characterization of Bacterial Population

Of the 11 samples collected in four different points of Serra da Brígida-MG, we selected and preserved 81 isolates (Table 1).

TABLE 2 | List of isolates representing the 75 OTUs from *L. hypogaea*, host and rhizosphere.

Representative isolate (Accession number)	Nearest type strain	Seq. Id (%)	Q. Cover (%)	Accession number
<i>L. hypogaea</i>				
L6 (KU057004)	<i>Bacillus mycoides</i> UrCA07	73	89	KC618478
L7 (KU057005)	<i>Bacillus</i> sp. SG19	96	99	JX402434
L18 (KU057014)	<i>Bacillus</i> sp. SG19	96	99	JX402434
L19 (KU057015)	<i>Bacillus</i> sp. WYT007	95	98	JQ807855
L22 (KU057017)	<i>Bacillus cereus</i> HKG201	69	85	KF947110
L8 (KU057006)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> R7	95	98	HQ259956
L9 (KU057007)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> R7	96	95	HQ259956
L10 (KU057008)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> R7	94	94	HQ259956
L14 (KU057011)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> DS11	96	99	EU835735
L20 (KU057016)	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> TAX5	95	99	JX280924
L11 (KU057009)	<i>Enterobacter aerogenes</i> PSB28	95	99	FJ360760
L17 (KU057013)	<i>Enterobacter</i> sp. SPj	95	93	FJ405369
L16 (KU057012)	<i>Klebsiella oxytoca</i> ALK313	97	98	KC456529
L28 (KU057023)	<i>Klebsiella</i> sp. 38	96	90	EU294412
L12 (KU057010)	<i>Rahnella</i> sp. DmB	95	97	KF720908
L1 (KU057001)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	97	99	NR074820
L2 (KU057002)	<i>Serratia proteamaculans</i> PW172	94	98	JF494823
L3 (KU057003)	<i>Serratia proteamaculans</i> PW172	93	98	JF494823
L4	No significant similarity found.	—	—	
Host				
H61 (KU057055)	<i>Bacillus cereus</i> M2	95	99	JF836882
H65 (KU057059)	<i>Bacillus</i> sp. SG19	96	94	JX402434
H69 (KU057063)	<i>Bacillus</i> sp. SG19	97	99	JX402434
H72 (KU057066)	<i>Bacillus</i> sp. S11714	99	99	KF956655
H77 (KU057071)	<i>Bacillus cereus</i> strain D7	97	99	KF500919
H80 (KU057073)	<i>Bacillus</i> sp. N4/130	95	98	LN680100
H56 (KU057051)	<i>Lysinibacillus</i> sp. NSi08	42	79	AB811363
H73 (KU057067)	<i>Lysinibacillus</i> sp. E15	72	94	JN082735
H63 (KU057057)	<i>Lysinibacillus</i> sp. E15	95	94	JN082735
H78 (KU057072)	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> fwzy21	95	99	KF208475
H81 (KU057074)	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> STNG28	95	92	KF312283
H59 (KU057053)	<i>Paenibacillus taichungensis</i> B2	95	99	JX010966
H66 (KU057060)	<i>Paenibacillus taichungensis</i> B2	96	98	JX010966
H70 (KU057064)	<i>Paenibacillus taichungensis</i> A80	86	79	JX010963
H64 (KU057058)	<i>Citrobacter freundii</i> H1-2	71	95	KC210870
H60 (KU057054)	<i>Shewanella</i> sp. XH15	81	87	KJ922531
H58 (KU057052)	<i>Enterobacter</i> sp. RA-15	97	95	KJ152098
H55 (KU057050)	<i>Serratia proteamaculans</i> KB22	96	94	JF327454
H62 (KU057056)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	95	99	NR_074820
H67 (KU057061)	<i>Serratia proteamaculans</i> KB22	95	99	JF327454
H68 (KU057062)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	94	93	NR074820
H71 (KU057065)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	96	99	NR074820
H74 (KU057068)	<i>Serratia marcescens</i> S418	96	99	GQ202220
H75 (KU057069)	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> RK26	96	99	KC790279
H76 (KU057070)	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> RK26	95	90	KC790279
Rhizosphere				
R24 (KU057019)	<i>Bacillus</i> sp. SG19	95	99	JX402434
R31 (KU057026)	<i>Bacillus cereus</i> M2	95	99	JF836882
R32 (KU057027)	<i>Bacillus cereus</i> S72	96	99	FJ763650
R35 (KU057030)	<i>Bacillus cereus</i> S72	96	99	FJ763650
R49 (KU057044)	<i>Bacillus</i> sp. SG19	95	99	JX402434
R40 (KU057035)	<i>Viridibacillus arenosi</i> Hc6	95	99	JF899298

(Continued)

TABLE 2 | Continued

Representative isolate (Accession number)	Nearest type strain	Seq. Id (%)	Q. Cover (%)	Accession number
R23 (KU057018)	<i>Lysinibacillus</i> sp. O-E16	95	99	JN613478
R29 (KU057024)	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> fwzy21	71	87	KF208475
R33 (KU057028)	<i>Lysinibacillus</i> sp. T1-9	95	89	KJ127177
R34 (KU057029)	<i>Lysinibacillus</i> sp. E15	97	89	JN082735
R39 (KU057034)	<i>Klebsiella</i> sp. D81	96	97	DQ923489
R48 (KU057043)	<i>Enterobacter</i> sp. Hg4-01	94	97	EU304247
R38 (KU057033)	<i>Enterobacter</i> sp. Hg4-01	83	96	EU304247
R37 (KU057032)	<i>Raoultella terrigena</i> strain PK35	97	97	KC790281
R47 (KU057042)	<i>Rahnella aquatilis</i> 2B-CDF	95	99	FJ811859
R25 (KU057020)	<i>Serratia</i> sp. PT3	95	99	GU458285
R26 (KU057021)	<i>Serratia</i> sp. PT3	95	99	GU458285.2
R27 (KU057022)	<i>Serratia</i> sp. PT3	94	98	GU458285.3
R30 (KU057025)	<i>Serratia</i> sp. S3.MAC.008	70	90	HM063908
R36 (KU057031)	<i>Serratia proteamaculans</i> KB22	95	99	JF327454
R41 (KU057036)	<i>Serratia marcescens</i> KtMC2-16	97	99	KC122200
R42 (KU057037)	<i>Serratia</i> sp. PT3	95	99	GU458285
R43 (KU057038)	<i>Serratia proteamaculans</i> KB22	94	99	JF327454
R44 (KU057039)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	94	96	NR074820
R45 (KU057040)	<i>Serratia</i> sp. PT3	96	96	GU458285
R46 (KU057041)	<i>Serratia proteamaculans</i> KB22	96	98	JF327454
R50 (KU057045)	<i>Serratia proteamaculans</i> KB22	94	99	JF327454
R51 (KU057046)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	95	98	NR074820
R52 (KU057047)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	95	98	NR074820
R53 (KU057048)	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	95	96	NR074820
R54 (KU057049)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Y5	74	97	KJ882377

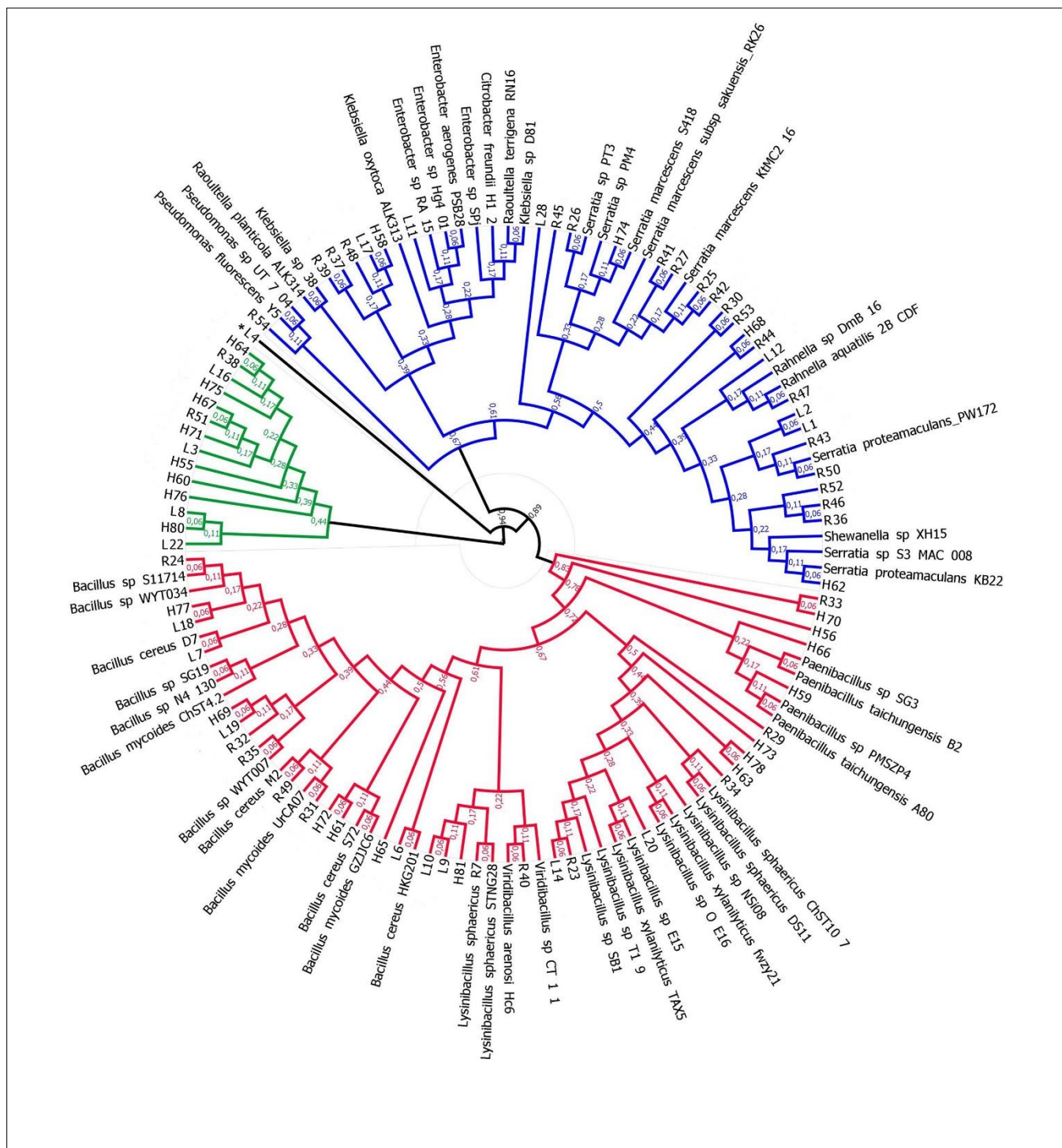
However, isolate L5 was non-viable after storage in glycerol. The growth rate of isolates L13, L15, L21, H57, and H79 were unsatisfactory, resulting in the extraction of insufficient DNA and sequencing of low quality. Although sample L4, isolated from *L. hypogaea*, showed good quality of sequencing and satisfactory assembly of contigs using the assembly parameters (see Materials and Methods), it still showed low percentage of similarity (76.8%) and identity (77%) compared with sequences deposited in GenBank of NCBI, featuring it as a potential new organism to be investigated rigorously.

In the three niches analyzed, we found isolates of the phyla Firmicutes (34), belonging to the genera *Bacillus* (17), *Lysinibacillus* (13), *Paenibacillus* (3), and *Viridibacillus* (1), and Proteobacteria (40), belonging to the genera *Serratia* (26), *Klebsiella* (3), *Rahnella* (2), *Citrobacter* (1), *Enterobacter* (5), *Shewanella* (1), *Raoultella* (1), and *Pseudomonas* (1) (Table 2). Four of these genera (*Serratia*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, and *Enterobacter*) were found in all three niches analyzed, where the first genera was the most representative. Isolates of the genera *Citrobacter*, *Paenibacillus*, and *Shewanella* were found only in the plant host. Isolates of the genera *Viridibacillus*, *Pseudomonas*, and *Raoultella* were found only in the rhizosphere (Table 2). Isolates of the genera *Klebsiella* and *Rahnella* were found exclusively shared between *L. hypogaea* and the rhizosphere.

Phylogenetic analysis of the isolates confirmed the sequencing results and allowed the grouping of the bacterial isolates from different niches to the taxa represented, Firmicutes and

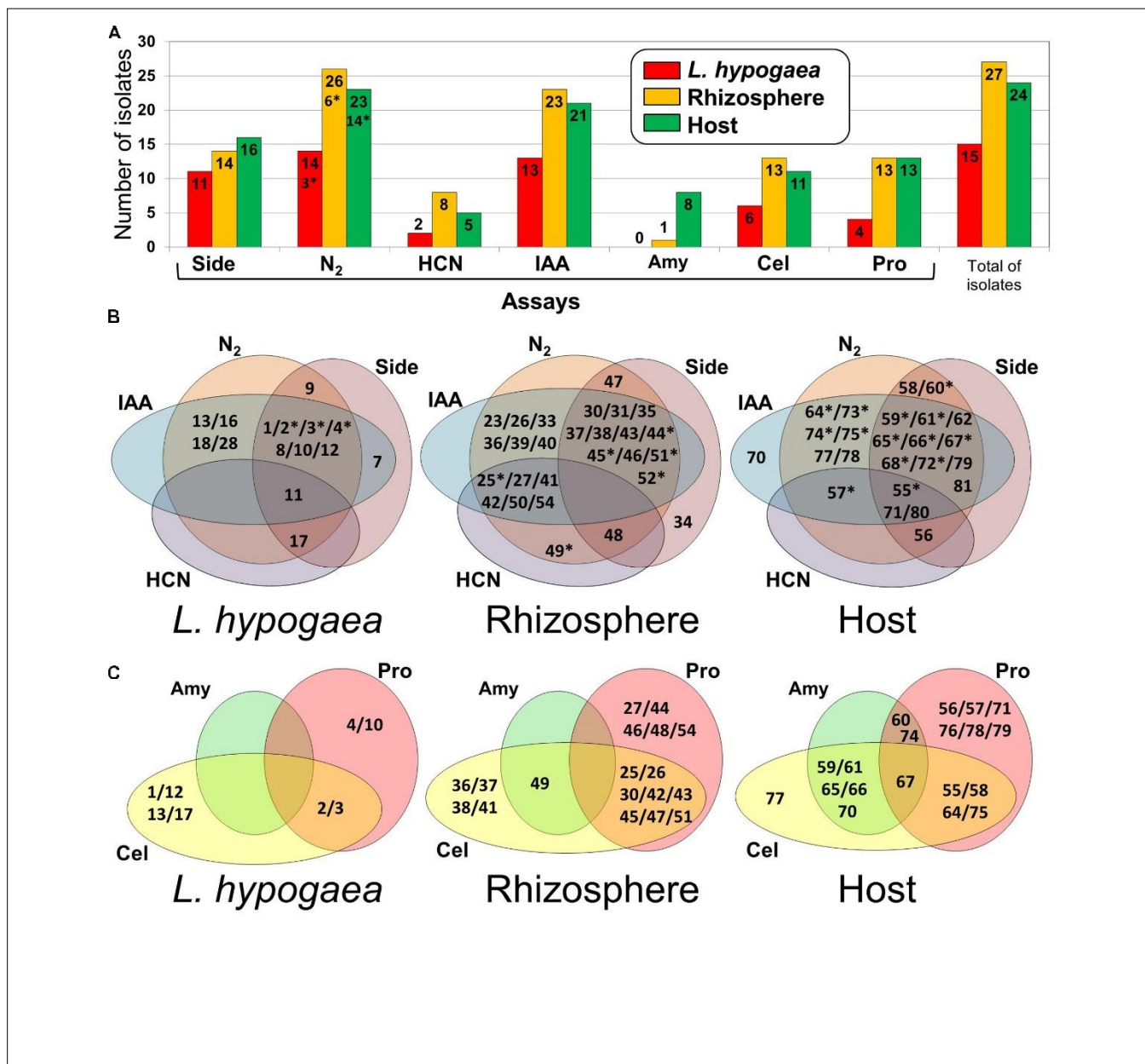
Proteobacteria. The isolates from *L. hypogaea* (L3, L16, L22, and L8), the isolates from the plant host (H55, H60, H64, H67, H71, H75, H76, and H80), and the isolates from the rhizosphere (R38 and R51) were grouped in a different clade (Figure 2).

For the biochemical tests, 66 isolates were analyzed since nine of these isolates showed reduced growth rate, prevented an accurate analysis of the results in the proposed biochemical assays. Of these, 63 isolates showed growth in nitrogen-free medium, representing 14 (93.4%) of the 15 isolates of *L. hypogaea*, 23 (95.8%) of the 24 isolates from plant host and 26 (96.3%) of the 27 isolates from rhizosphere (Figure 3A). From these isolates, the presence of *nifH* was confirmed in 23 genomes by PCR analysis (Supplementary Figure S2). With regard to siderophore production, more than 62% of the isolates were capable of producing these compounds. All isolates were able to produce ammonium ions, at different concentrations. Meanwhile, only 15 isolates (22.72%) were capable of producing hydrocyanic acid. More than 86% of the isolates were capable of producing IAA, of which 13 were from *L. hypogaea* (Figure 3A). In attempt to understand the potential of each of these isolates with regard to the capacity to fix atmospheric N₂, to produce siderophores, IAA, and HCN, Venn diagrams were prepared for each of the three niches analyzed (Figure 3B). Especially the isolates L11, H55, H71, and H80 yielded positive results for all analyses. Of the isolates obtained from *L. hypogaea*, four were capable of to fix N₂ and to produce IAA (L13, L16, L18, and L28), and seven were able to produce IAA and siderophores, and to fix N₂ (L1,



L2, L3, L4, L8, L10, and L12). Of the isolates obtained from the rhizosphere, six were capable of producing IAA and fixing N₂ (R23, R26, R33, R36, R39, and R40). Eleven were capable of producing IAA and siderophores, and even fixing N₂ (R30, R31, R35, R37, R38, R43, R44, R45, R46, R51, and R52), while another six were capable of producing IAA and HCN, and fixing N₂ (R25, R27, R41, R42, R50, and R54). Of the isolates obtained from the

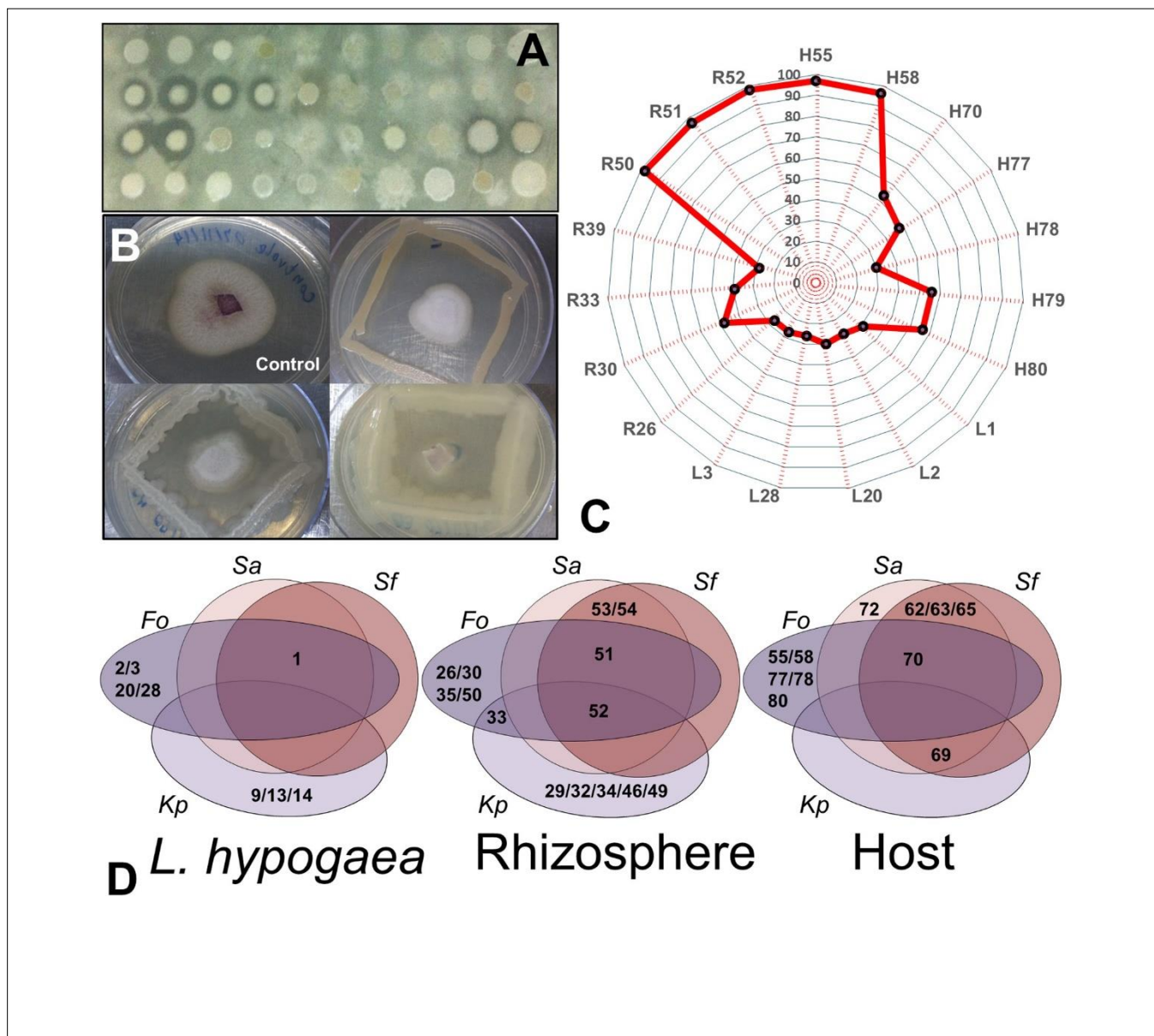
host plant, six were capable of producing IAA and fixing N₂ (H64, H73, H74, H75, H77, and H78). Two were capable of producing siderophores and fixing N₂ (H58 and H60), whereas ten were able to produce IAA and siderophores, and to fix N₂ (H59, H61, H62, H65, H66, H67, H68, H72, H79, and H80). Regarding hydrolytic enzymes assay, 11 isolates were able to produce amylase. None of these isolates was obtained from



L. hypogaea, the isolates obtained from the plant host were the most representative in this analysis. Thirty isolates were capable of producing cellulase, with greatest representativeness among the isolates from the rhizosphere. Thirty isolates were able to produce proteases, with equal representativeness among the isolates from the plant host and rhizosphere. Similarly, a Venn diagram pointing out the isolates and their origin with respect to the production of hydrolytic enzymes was constructed (Figure 3C). Notably, isolate H67 was capable of producing all three types of hydrolytic enzymes investigated.

Twenty isolates were able to inhibit the growth of enteropathogens. They include 11 inhibitors of *Staphylococcus aureus* (L1, R51, R52, R53, R54, H62, H63, H65, H69, H70, and H72), 11 inhibitors of *Klebsiella pneumoniae* (L9, L13,

L14, R29, R32, R34, R46, R49, and H69), and 10 inhibitors of *Shigella flexneri* (L1, R51, R52, R53, R54, H62, H63, H65, H69, and H70) (Figure 4A). No isolate was capable of inhibiting the growth of *Bacillus cereus*, and only one isolate inhibited the growth of *Xanthomonas citri* strain 306 (H65). Nineteen isolates inhibited the growth of *Fusarium* (Figure 4B), 5 of them were obtained from *L. hypogaea* (L1, L2, L3, L20, and L28), eight from the rhizosphere (R26, R30, R33, R39, R50, R51, R52, and R55) and six from the plant host (H58, H70, H77, H78, and H80) (Figure 4D). The potential of some of these isolates is indicated in Figure 4C, ranging from 28% in isolates from *L. hypogaea* to above 95% in the isolates R50, R51, R52, H55, and H58 from rhizosphere and host, respectively.



DISCUSSION

Identification of Microbiota Associated with *L. hypogaea* and Its Interactions

The importance and complexity of the rhizosphere in the interaction with plants and other organisms in which they live have been reported in many studies (Bais et al., 2006; Vacheron et al., 2013; Zhang et al., 2014). Similarly, the modifications in the physiological profile of plants as a result of alterations in the chemical composition of the rhizosphere or the microbiota contained therein have also been characterized, especially with regard to the interaction between plants of agricultural interest (Saleem et al., 2007; Bhattacharyya and Jha, 2012; Dodd and Ruiz-Lozano, 2012; Nadeem et al., 2014). Contrary to these advances, studies seeking to understand the identification of microbiota

associated with parasitic plants, especially holoparasitic ones are limited or lacking. This relation of strict dependence on its host makes it a very interesting target for understanding the degree of importance of microbiota associated with the adaptation and resultant survival of species in the most diverse environments where they occur. Accordingly, this is the first work aimed at understanding the composition and importance of microbiota in the biological interface holoparasitic plant-host-rhizosphere, using *L. hypogaea* as a model. Not only is the biological model distinctive for studies bioprospecting, the sampling site, the IQ, is characterized as an environment also neglected in studies involving its microbiota. Because it is an environment enriched in iron compounds and other heavy metals, whose soils are extremely compacted, adaptation of this microbiota can be directly related not only to the soil features, but also related to the adaptation of plants in this environment, and may uncover

new organisms and the biotechnological potential of this specific microbiota.

Although there are no known genera that are unique for *L. hypogaea*, isolate L4 did not show significant identity (over 80%) with any other isolate with sequence deposited in databanks and therefore deserves attention. This isolate was capable of producing ammonium ions in high concentration, IAA and siderophores and fix nitrogen. This activity could generate better or complementary nutritional conditions compared to those offered by the plant host such as for a tree growing on soils lacking nutrients. A key adaptive aspect of this would be the decrease in risk of mortality of the plant host. Regardless of nutrients that it provides, physical sustentation and supply of water and carbohydrates to the parasite is totally dependent on host plants, and their death is a great adaptive disadvantage (Lopez Pascua et al.,2014). Thus, the co-association with a microbiota capable of providing the necessary nutrients saves the parasitized tree from irreversible stress. However, more studies are necessary to confirm these preliminary results.

Similarly, isolates of the genera *Klebsiella* and *Rahnella* were found only in *L. hypogaea* and the rhizosphere. This allows us to infer that there may be a direct association of soil bacteria with the holoparasitic plant, and that a possible relation of complementarity makes the parasitic plant not only dependent on the plant host for survival but also dependent on specific soil bacteria. This allows us to raise the prospect that perhaps the concept of botanical holoparasitism needs to be rethought, taking the scientific community to undertake further research in this area of knowledge. Although need the host plant for aquisition of carbohydrates, since it does not have the capacity of producing them itself (by the chlorophyll absence), *L. hypogaea* could also depend closely on PGPB to assist in the development of its roots, aquisition of ions from the rhizosphere or even in the interaction with its host plant through their haustoria. Finally, isolates of the genera *Serratia*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, and *Enterobacter* were found in the three niches, reinforcing this exchange of microbiota, now a more complex perspective. These results reinforce the prospect that in a community, the ecological interaction of plants and microorganisms is directly related to the rigor of the habitat and the ability of colonization. In other words, the mutualistic interactions with microorganisms would be the basis of evolution of adaptations to inhospitable environments. The theoretical concept of species "A" of adversity strategists [sensu (Greenslade,1983)], in contrast to the artificial r-k continuum of Pianka(1970;Taylor et al.,1990), or the understanding of "template habitats" (Southwood,1977;Korfiatis and Stamou,1999) and specialization in habitats (consequently, the whole concept and use of bio-indicators) can make sense only in the light of these interactions. Therefore, a specific habitat provides characteristic conditions that promote the growth of certain microorganisms, which in turn facilitate the development of other species associated with them.

Thus, much less time adjustment to selective pressures imposed by oligotrophic and contaminated soils would be necessary to ensure the invasion of environment, always done by species that evolve from less hostile niches. This possibility of having one microbiological micro-habitat that minimizes the

natural hostility of the environment can change the ecological-evolutionary perception of biodiversity evolution, and even the basic theoretical models that guide our understanding of these processes.

PGP Activities of the Isolates

About 95% of isolates showed growth in medium combined nitrogen, thereby demonstrating diazotrophic activity. This may have a direct relation with an environment whose soil is highly leached, oligotrophic and contaminated, like these montane ecosystems or any other soil of Brazilian savannas (Goodland, 1971;Goodland and Pollard,1973;Batmanian and Haridasan, 1985;Haridasan,2008). The understanding of the evolutionary costs of colonizing these environments are well studied (Ribeiro and Brown,2006) and consistent with the existing theoretical propositions (Herms and Mattson,1992;Fine et al.,2004). This is the first time that the role of mutualistic microbiota was taken into consideration as a fundamental adaptive mechanism.

Iron can be available in the soil as Fe^{2+} or Fe^{3+} , where the latter is less soluble but more abundant. Siderophores are molecules secreted by some bacterial species that chelate Fe^{3+} converting it to Fe^{2+} , which as a consequence is internalized by specific cellular receptors for these ions (Neilands,1995). From a competition point of view, microorganisms that are able to utilize siderophores as a mechanism of acquisition of Fe^{3+} make it available for them consequently decreasing the availability of iron for possible competing microorganisms in the same niche (Hibbing et al.,2010). Often when this competition occurs because of a phytopathogenic organism, this resource becomes used as an indirect mechanism of plant growth since it controls the growth of these phytopathogens (Perez-Montano et al.,2014). In the same perspective, many plants only have receptors for siderophores, depending intimately on the their production by microorganisms that live in symbiosis or cooperation with these plants for acquiring iron from the environment, essential for their growth (Crowley et al.,1991). More than half of the bacterial isolates obtained here were producers of siderophores (**Figure 3**). Although this number was high, it was expected since the environment favors the adaptation of bacteria capable of surviving in such high concentrations of iron. Therefore, further study of the structural composition and regulation of the synthesis of these substances in these microorganisms is necessary and may lead to the discovery of new biomolecules with ion-chelating activity.

With regard to the region where the plants were isolated, this perspective becomes even more interesting, because it is an environment classically reported as rich in arsenic, and it is possible that these microorganisms make use of these molecules as an adaptive alternative to the presence of this element (Gonçalves and Lena,2013). Similarly, about 86% of isolates were capable of producing IAA. Since this hormone helps to increase root growth, this could explain the adaptation of plants of these niches to extremely hard soil, which provides surface branching of roots, favoring not only anchoring but also procurement of water and minerals. These bacteria may have great importance in the study model proposed since it is a holoparasitic plant whose capacity to produce this hormone can be rather low in relation to an autotrophic

plant (Magnus et al.,1982), which could explain its intimate dependence on IAA-producing bacteria.

Far less representative, but of similar importance were the isolates in which we identified hydrolytic enzyme activities. These enzymes are of great industrial interest, since they can optimize the manufacture of products of economic interest such as in the case of glucose for fermentation processes obtained through cellulolytic or amylolytic activity, or of amino acids and peptides widely used in the food, pharmaceutical and chemical industry, obtained from proteolytic activity (Dalmaso et al.,2015). In an environmental microbiological context, all these enzymes can be of fundamental importance in the process of adaptation to a specific niche.

Individually, some genera deserve attention because of the previous results described in the literature. R54, for example, was isolated from the rhizosphere and showed similarity to *Pseudomonas fluorescens*. A recent study involving the strains PA4C2 and PA3G8 of *P. fluorescens*, also isolated from the rhizosphere, were found to be able to inhibit the growth of the phytopathogen *Dickeya* (Cigna et al.,2015), which causes diseases in herbaceous plants. In our study, R54 was also found to be a potential inhibitor of enteropathogens since it blocked the growth of *Staphylococcus aureus* and *Shigella flexneri*. Specific strains of *Pseudomonas* have also been described as inducing systemic resistance in cloves, cucumbers, radishes, tobacco, and *Arabidopsis*, which raises the possibility of these bacteria being a potential growth inhibitors of phytopathogens in wild plants. Similarly to *Pseudomonas*, induced systemic resistance has also been described for different strains of *Bacillus* spp., including the specific species *B. amyloliquifaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, and *B. sphaericus* (Choudhary et al.,2007). When inoculated or present in specific organisms, they induce a significant reduction in the incidence or severity of diseases in various hosts (Choudhary et al.,2007). In this study, various isolates showed similarity with bacteria of the genus *Bacillus*, including the strains *B. cereus* and *B. mycoides*. Some of these isolates showed positive results for all the biochemical assays performed (H80) or inhibited the growth of three of the four enteropathogens investigated (H69).

Bacteria of the genus *Enterobacter* has been associated with numerous biological models. *Enterobacter* sp. strain EJ01 isolated from *Dianthus japonicus thunb* (China Sea rose) was described as a bacterium capable of aiding vegetative growth, besides alleviating salt stress in tomato and *Arabidopsis* (Kim et al., 2014). Of the five isolates similar to *Enterobacter* identified in this study, all produced siderophores and fixed N₂, and only two were capable of producing IAA. In another study, *Serratia marcescens* isolated from the rhizosphere of the coconut tree was found to fix nitrogen and to produce IAA and siderophores, among other compounds investigated (George et al.,2013), highlighting the importance of these genera in the support and growth of these plants. Of the 26 isolates that showed similarity to *Serratia*, 25 isolates were capable of fixing N₂ and producing IAA, and 15 were capable of producing siderophores.

Paenibacillus yonginensis DCY84 was evaluated in growth with *Arabidopsis thaliana* subjected to salt, drought and heavy metal stress, and the study showed that plants treated with

this bacterial isolate were more resistant than the untreated control plants (Sukweenadhi et al.,2015). Our isolates H59, H66, and H70 showed similarity to this genus and were able to produce siderophores and IAA and to fix N₂, besides inhibiting enteropathogens. Another recent work isolated bacteria from the rhizospheric soil of *Populus euphratica* and identified ten strains that induced a significant increase in dry weight of buds and roots of wheat (Wang et al.,2014). These isolates were identified as being from the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, and *Serratia*. Among these strains, *Serratia* sp. 1–9 and *Pseudomonas* sp. 23/05 were the most effective strains. Both produced auxin, and significantly increased production when grown under simulated dry conditions, leading to a direct effect on promoting plant growth under drought stress (Wang et al.,2014). Similarly, a work identified 12 endophytic bacteria characterized as diazotrophic, two species belonging to the genus *Paenibacillus*, three to the genus *Mycobacterium*, three to the genus *Bacillus*, and four to the genus *Klebsiella* (Ji et al.,2014). Rice seeds treated with these bacteria showed improved growth, increase in height and dry weight and antagonistic effects against pathogenic fungi (Ji et al.,2014). Our isolates that showed high identity to *Paenibacillus* (H59 – 99% and H66 – 98%), were also capable of fixing N₂ and were thus diazotrophic. The isolate H70, although showing similarity to *Paenibacillus*, was not able to fix N₂, but did inhibit the growth of enteropathogens and *Fusarium*. All isolates that showed similarity to *Klebsiella* (L16, L28, and R39) were also capable of fixing N₂, besides producing IAA.

Perspectives of Use of Isolates

In an agroecological context, there is currently an emerging demand for the development of sustainable agriculture, to decrease our dependence on agrochemical farming and its harmful consequences to the environment (Bhardwaj et al.,2014). The utilization of PGPB to increase farm production has become an important alternative. Similarly, alternative methods for pest control attracted attention, and biological control has been considered a viable solution for various diseases that are difficult to control (Cespedes et al.,2015). This practice aims to maintain a balance in the agroecosystem, so that the host, in the presence of a pathogen or pest, does not suffer significant damage due to the controlling action exerted by non-pathogenic organisms (Meldau et al.,2012). Thus, understanding microbial relations in soils and plants can lead to the discovery of microorganisms with great agricultural potential and other applications as well.

Besides agroecological importance, all potential presented by microbiota isolated from these neglected biological niches drives the search for new products and processes with potential pharmacological and for environmental bioremediation. This was evident by the ability of some isolates to inhibit three out of four investigated enteropathogenic species, besides *Xanthomonas* and *Fusarium* strains. Analysis of genomic composition and metabolites produced by these isolates could uncover new metabolic pathways associated with the synthesis of new biomolecules of pharmaceutical interest. In the same way, the isolates associated with production of IAA and siderophores may be used as bacterial consortia to induce native plant growth in areas degraded by human action (de-Bashan et al.,2012).

CONCLUSION

The integration of biological data found in this study suggests a hypothetical complex network of interaction and mutual dependence between the niches analyzed and the isolated bacteria. Classically, holoparasitic plants draw all necessary nutrients from their host plant. However, the results of this study show that the microbiota in *L. hypogaea* can also be of benefit by supplying nutrients essential for the survival of the plant. This hypothesis needs further and in-depth studies to become valid. From an ecological perspective, this is the first report of the potential of bacteria isolated from the IQ region in producing these siderophores and IAA, which allowed us to infer that part of the adaptive process of these plants in ferroginous fields can be a result of the ability of a large percentage of isolates to produce these compounds. Siderophores would be key for the chelation of iron in the Fe³⁺ state, existing in high concentrations in these ferroginous fields, and the production of IAA by a large number of isolates demonstrated how essential this compound would be for the induction of extensive root system of plants that survive in this environment. The characteristics of the soil from this area are extremely adverse, with low supply of water, requiring the plants to obtain nutrients from more superficial regions. Thus, it is possible that the survival of plants in this environment have some relationship with the presence and interaction with these microorganisms, which could also justify the large endemic plant found in this environment. From a biotechnological aspect, the perspectives and results obtained with this work point to the potential of developing a bacterial consortium that could be used as an indispensable tool in the recovery of areas degraded by anthropic actions, especially in this region where mining activities are eliminating important species of the biome of ferroginous fields. Therefore, the results presented in this work emphasize the importance of studying biological models neglected and differentiated such as the holoparasite plants and ferruginous soils from IQ since they are propitious sources for finding new compounds with biotechnological potential.

REFERENCES

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389

Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552. doi: 10.1080/10635150600755453

Arbeli, Z., and Fuentes, C. L. (2007). Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 272, 269–275. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00764.x

Badri, D. V., Weir, T. L., van der Lelie, D., and Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 642–650. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.014

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159

Bakker, A. W., and Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas*

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ÉF and LF collected samples. ÉF and LM conceived and designed the experiments. ÉF and LM performed all experiments and analysis. ÉF, LM, IS, and LR contributed with reagents, materials and analysis tools. ÉF and LM prepared the figures and tables. ÉF, LM, and SR wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Jesus A. Ferro, Prof. Alessandro Varani and Agda Facincani (FCAV-UNESP) for their help with sequencing and assembly of contigs. We are grateful to Prof. Renata Guerra de Sá Cota (DECBI-UFOP), Silvana de Queiróz Silva (DECBI-UFOP), Cinthia Lopes de Brito Magalhães (DECBI-UFOP), Maria Catarina Megumi Kasuya (UFV), and Cornélio de Freitas Carvalho (DEQUI-UFOP), who all contributed to this study in some way. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Project 481226/2013-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Project CBB APQ-02387-14) and UFOP scientific grants granted to LM. SR is granted researcher from CNPq.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00172/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Geographical location of Serra da Brigida, collection site of *L. hypogaea*. Serra da Brigida is located around the city of Ouro Preto, state of Minas Gerais – Brazil. The stars indicate the sampling points for *Langsdorffia hypogaea*. Adapted from Atlas Digital GeoAmbiental (<http://institutopristino.org.br/atlas/>).

FIGURE S2 | Presence of *nifH* confirmed by PCR analysis.

spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19, 451–457. doi: 10.1016/0038-0717(87)90037-X

Bashan, Y., and de-Bashan, L. E. (2005). “Bacteria,” in *Encyclopedia of Soils in the Environment*, ed. D. Hillel (Oxford: Elsevier), 103–115.

Bashan, Y., and Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1225–1228. doi: 10.1016/S0038-0717(97)00187-9

Batmanian, G. J., and Haridasan, M. (1985). Primary production and accumulation of nutrients by the ground layer community of cerrado vegetation of central Brazil. *Plant Soil* 88, 437–440. doi: 10.1007/Bf02197500

Bertin, C., Yang, X. H., and Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256, 67–83. doi: 10.1023/A:1026290508166

Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., and Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb. Cell Fact.* 13:66. doi: 10.1186/1475-2859-13-66

Bhattacharyya, P. N., and Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327–1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9

- Bric, J. M., Bostock, R. M., and Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 535–538.
- Burgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., and Zeyer, J. (2004). New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 240–247. doi: 10.1128/AEM.70.1.240-247.2004
- Cardoso, L. J. T. (2014). *Balanophoraceae no Brasil*. Master thesis, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Cardoso, L. J. T., Alves, R. J. V., and Braga, J. M. A. (2011). A new species and a key for *Langsdorffia* (Balanophoraceae). *Syst. Bot.* 36, 424–427. doi: 10.1600/036364411X569606
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Céspedes, C. L., Alarcon, J., Aqueveque, P. M., Lobo, T., Becerra, J., Balbontin, C., et al. (2015). New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity. *Environ. Res.* 142, ER15301. doi: 10.1016/j.envres.2015.08.004
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A. L., Jacq, B., and Christen, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7:439. doi: 10.1186/1471-2105-7-439
- Choudhary, D. K., Prakash, A., and Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47, 289–297. doi: 10.1007/s12088-007-0054-2
- Cigna, J., Raoul des Essarts, Y., Mondy, S., Helias, V., Beury-Cirou, A., and Faure, D. (2015). Draft Genome sequences of *Pseudomonas fluorescens* strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, three biocontrol bacteria against *Dickeya* phytopathogens. *Genome Announc.* 3:e01503-14. doi: 10.1128/genomeA.01503-14
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951–4959. doi: 10.1128/Aem.71.9.4951-4959.2005
- Costacurta, A., and Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 1–18. doi: 10.3109/10408419509113531
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P. P., and Szanislo, P. J. (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil* 130, 179–198. doi: 10.1007/BF00011873
- Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., and Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar. Drugs* 13, 1925–1965. doi: 10.3390/md13041925
- de-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., and Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.* 61, 171–189. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.09.003
- Dobereiner, J., Marriel, I. E., and Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum-Lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22, 1464–1473. doi: 10.1139/m76-217
- Dodd, I. C., and Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Microbial enhancement of crop resource use efficiency. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 236–242. doi: 10.1016/j.copbio.2011.09.005
- Doyle, J., and Doyle, J. (1987). A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194. doi: 10.1101/gr.8.3.186
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185. doi: 10.1101/gr.8.3.175
- Ferreira, M. T. M. (2011). *Composição Florística e Distribuição Vertical de Epífitas Vasculares Sobre Individuos de Guapira opposita (vell.) Reitz (Nyctaginaceae) em um Fragmento Florestal na Serra da Brígida, Ouro Preto, MG*. Master thesis, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Filho, A. C., Curi, N., and Shinzato, E. (2010). Soil landscape relationships at the Quadrilátero Ferrífero in the state of Minas Gerais, Brazil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 45, 903–916.
- Fine, P. V., Mesones, I., and Coley, P. D. (2004). Herbivores promote habitat specialization by trees in Amazonian forests. *Science* 305, 663–665. doi: 10.1126/science.1098982
- George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L., and Thomas, G. V. (2013). Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 109–117. doi: 10.1007/s11274-012-1163-6
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.001
- Gonçalves, J. A. C., and Lena, J. C. (2013). Evaluation of risk to human health by natural arsenic contamination in groundwater and soils from the urban area of Ouro Preto (MG). *Geol. USP. Série Cient.* 13, 145–158.
- Goodland, R. (1971). A physiognomic analysis of the ‘Cerrado’ vegetation of central Brasil. *J. Ecol.* 59, 411–419. doi: 10.2307/2258321
- Goodland, R., and Pollard, R. (1973). The Brazilian Cerrado vegetation: a fertility gradient. *J. Ecol.* 61, 219–224. doi: 10.1590/S1519-69842013000200007
- Greenslade, P. J. M. (1983). Adversity selection and the habitat templet. *Am. Nat.* 122, 352–365. doi: 10.1086/284140
- Hansen, B. (1980). Balanophoraceae. *Flora Neotrop. Monogr.* 23:80.
- Haridasan, M. (2008). Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Braz. J. Plant Physiol.* 20, 183–195. doi: 10.1590/S1677-04202008000300003
- Hermis, D. A., and Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants - to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67, 478–478. doi: 10.1086/417659
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., and Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15–25. doi: 10.1038/nrmicro2259
- Hsiao, S. C., Mauseth, J. D., and Peng, C. I. (1995). Composite bundles, the host-parasite interface in the holoparasitic angiosperms *Langsdorffia* and *Balanophora* (Balanophoraceae). *Am. J. Bot.* 82, 81–91. doi: 10.2307/2445790
- Jacobi, C. M., and do Carmo, F. F. (2008). Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. *Megadiversidade* 4, 25–33.
- Ji, S. H., Gururani, M. A., and Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol. Res.* 169, 83–98. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.003
- Jones, D. L., Edwards, A. C., Donachie, K., and Darrah, P. R. (1994). Role of proteinaceous amino-acids released in root exudates in nutrient acquisition from the rhizosphere. *Plant Soil* 158, 183–192. doi: 10.1007/BF00009493
- Kim, K., Jang, Y. J., Lee, S. M., Oh, B. T., Chae, J. C., and Lee, K. J. (2014). Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Mol. Cells* 37, 109–117. doi: 10.14348/molcells.2014.2239
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant-growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885–886. doi: 10.1038/286885a0
- Korfiatis, K. J., and Stamou, G. P. (1999). Habitat templates and the changing worldview of ecology. *Biol. Philos.* 14, 375–393. doi: 10.1023/A:1006543127454
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., and Pace, N. R. (1985). Rapid-determination of 16s ribosomal-Rna sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6955–6959. doi: 10.1073/pnas.82.20.6955
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., et al. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 583–606. doi: 10.1080/0735-260291044377
- Lopez Pascua, L., Hall, A. R., Best, A., Morgan, A. D., Boots, M., and Buckling, A. (2014). Higher resources decrease fluctuating selection during host-parasite coevolution. *Ecol. Lett.* 17, 1380–1388. doi: 10.1111/ele.12337
- Lynch, J. M., and Whipps, J. M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129, 1–10. doi: 10.1007/Bf00011685
- Magnus, V., Simaga, S., Iskrac, S., and Kveder, S. (1982). Metabolism of tryptophan, indole-3-acetic acid, and related compounds in parasitic plants from the genus *Orobanche*. *Plant Physiol.* 69, 853–858. doi: 10.1104/pp.69.4.853
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Meldau, D. G., Long, H. H., and Baldwin, I. T. (2012). A native plant growth promoting bacterium, *Bacillus* sp. B55, rescues growth performance of an ethylene-insensitive plant genotype in nature. *Front. Plant Sci.* 3:112. doi: 10.3389/fpls.2012.00112
- Miles, L., Grainger, A., and Phillips, O. (2004). The impact of global climate change on tropical forest biodiversity in Amazonia. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 13, 553–565. doi: 10.1111/gcb.13315
- Mirza, M. S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., et al. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil* 237, 47–54. doi:

- 10.1023/A:1013388619231
- Moore, J. C., McCann, K., Setälä, H., and De Ruiter, P. C. (2003). Top-down is bottom-up: does predation in the rhizosphere regulate aboveground dynamics? *Ecology* 84, 846–857. doi: 10.1890/0012-9658(2003)084[0846:TIBDPI]2.0.CO;2
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., and Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol. Adv.* 32, 429–448. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.005
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores – Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726. doi: 10.1074/jbc.270.45.26723
- Nickrent, D. L. (2002). “Plantas parásitas en el mundo,” in *Plantas Parásitas de la Península Ibérica e Islas Baleares*, eds J. A. López-Sáez, P. Catalán, and L. Sáez (Madrid: Mundi-Prensa Libros), 7–28.
- Perez-Montano, F., Alias-Villegas, C., Bellogin, R. A., del Cerro, P., Espuny, R., Jimenez-Guerrero, I., et al. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* 169, 325–336. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.011
- Pianka, E. R. (1970). On r and K selection. *Am. Nat.* 104, 592–597. doi: 10.1086/282697
- Pierre, J. L., Baret, P., and Serratrice, G. (2003). Hydroxyquinolines as iron chelators. *Curr. Med. Chem.* 10, 1077–1084. doi: 10.2174/0929867033457584
- Pott, A., Pott, V. J., and Sobrinho, A. A. B. (2004). “Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal,” in *Proceedings of the IV Simpósio Sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal*, Corumbá, 39–40.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., and Moenne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361. doi: 10.1007/s11104-008-9568-6
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan, R. (2001). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* 20, 1–11. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00056-9
- Ribeiro, S. P., and Brown, V. K. (2006). Prevalence of monodominant vigorous tree populations in the tropics: herbivory pressure on *Tabebuia* species in very different habitats. *J. Ecol.* 94, 932–941. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01133.x
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., and Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. doi: 10.1007/s11104-009-9895-2
- Rodríguez, H., and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17, 319–339. doi: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2
- Rosière, C. A., and Chemale, F. Jr. (2000). Itabirito e minérios de ferro de alto teor do Quadrilátero ferrífero – uma visão geral e discussão. *Geonomos* 8, 27–43.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., and Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 635–648. doi: 10.1007/s10295-007-0240-6
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. (1987). Universal chemical-assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Sema/Gtz. (1995). *Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná*. Curitiba:SEMA/GTZ.
- Southwood, T. R. E. (1977). Habitat, the template for ecological strategies? *J. Anim. Ecol.* 46, 337–365. doi: 10.2307/3817
- Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., and van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 91, 182–190. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x
- Sukweenadhi, J., Kim, Y. J., Choi, E. S., Koh, S. C., Lee, S. W., and Yang, D. C. (2015). *Paenibacillus yonginensis* DCY84(T) induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress. *Microbiol. Res.* 172, 7–15. doi: 10.1016/j.micres.2015.01.007
- Taylor, D. R., Aarssen, L. W., and Loehle, C. (1990). On the relationship between R/K selection and environmental carrying-capacity – a new habitat template for plant life-history strategies. *Oikos* 58, 239–250. doi: 10.2307/3545432
- Teather, R. M., and Wood, P. J. (1982). Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777–780.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4:356. doi: 10.3389/fpls.2013.00356
- Vale, P. N. C. (2013). *Solo e Topografia Como Condicionantes da Distribuição da Vegetação em Fitofisionomias Campestre e Florestal em Contato Direto na Serra da Brígida, Ouro Preto, MG*. Master, thesis, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Verdouw, H., Vanechteld, C. J. A., and Dekkers, E. M. J. (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399–402. doi: 10.1016/0043-1354(78)90107-0
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571–586. doi: 10.1023/A:1026037216893
- Vince, A., Dawson, A. M., Park, N., and O’Grady, F. (1973). Ammonia production by intestinal bacteria. *Gut* 14, 171–177. doi: 10.1136/gut.14.3.171
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8, 351–358.
- Wang, S., Ouyang, L., Ju, X., Zhang, L., Zhang, Q., and Li, Y. (2014). Survey of plant drought-resistance promoting bacteria from *Populus euphratica* tree living in arid area. *Indian J. Microbiol.* 54, 419–426. doi: 10.1007/s12088-014-0479-3
- Zhang, Y., Ruyter-Spira, C., and Bouwmeester, H. J. (2014). Engineering the plant rhizosphere. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32C, 136–142. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.006
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., et al. (2014). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 9:e92486. doi: 10.1371/journal.pone.0092486
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Felestrino, Santiago, Freitas, Rosa, Ribeiro and Moreira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4- Capítulo II: Potencial biotecnológico associado a bactérias isoladas de nove plantas endêmicas e solo do Quadrilátero Ferrífero

Título: Biotecnological prospection of culturable bacteria associated with endemic plants and soil of ferruginous fields

Érica B. Felestrino, Izadora Tabuso Vieira, Flávio Fonseca do Carmo, Luciana Kamino, Leandro M. Moreira.

Este artigo foi redigido com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológico de bactérias isoladas de nove plantas endêmicas e do solo do Quadrilátero Ferrífero, ampliando os horizontes de conhecimento biológico previamente estabelecido para uma única planta, *Langsdorffia hypogaea*. Para isso, foram coletadas amostras de raiz e solo das nove espécies endêmicas, além de amostras de solo e raízes emergentes de uma caverna de canga, na região da Serra da Moeda, MG. Foram obtidos 204 isolados bacterianos e muitos destes apresentaram resultado positivo para os ensaios bioquímicos de promoção de crescimento vegetal como produção de sideróforos, ácido cianídrico, ácido-indol-acético, fixação nitrogênio e solubilização de fosfato. Quatro isolados foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno *Xanthomonas citri in vitro* e diminuir a manifestação da doença *in vivo*, e cinco foram resistentes a elevadas concentrações de arsenito e arsenato, com significativas taxas de remoção do metal em solução. Os resultados encontrados destacam a importância de se estudar plantas endêmicas e afloramentos rochosos no Brasil, sendo uma fonte imensurável de biodiversidade, especialmente de microrganismos com potencial biotecnológico, ainda inesplorado.

Este artigo está em vias de finalização para submissão na revista *Plant and Soil*.

BIOTECNOLOGICAL PROSPECTION OF CULTURABLE BACTERIA ASSOCIATED WITH ENDEMIC PLANTS AND SOIL OF FERRUGINOUS FIELDS

Érica B. Felestrino^{1,3}, Izadora Tabuso Vieira⁴, Flávio Fonseca do Carmo², Luciana Kamino², Leandro M. Moreira^{1,3}

¹Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de pesquisas em Ciências Biológicas, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil. ² Instituto Prístino, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. ³Department of Biological Science, Institute of Exact and Biological Science, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil. ³Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil.

#Corresponding author:

LMM mailing address: Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil. Zip Code 35400-000. Phone: +55 (31) 3559-1698, FAX: +55 (31) 3559-1672, e-mail lmmorei@gmail.com

Running Title

Plant Growth Promotion Bacteria associated with endemic plants.

Abstract

A ciclagem de nutrientes, a promoção do crescimento de plantas, a biorremediação de ambientes e o controle biológico de pragas são algumas das funções que residem em meio a diversidade genética e metabólica dos microrganismos associados a plantas. Apesar deste conhecimento estar bem estabelecido para uma série de plantas, em especial àquelas de interesse econômico, ainda são insipientes os trabalhos que buscam descrever a função dos microrganismos associados a plantas do Quadrilátero Ferrífero. Sob esta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias cultiváveis associadas a plantas endêmicas dos campos rupestres ferruginosos da região do Quadrilátero Ferrífero (QF) e analisar seu potencial biotecnológico. Para isto, foram coletadas amostras de raiz e solo associado a nove espécies de plantas endêmicas da Serra da Moeda, MG, além de amostras de solo e raízes emergentes de uma caverna de canga da mesma região. Foram obtidos 204 isolados bacterianos. Desse total, 5,9% foram capazes de solubilizar fosfato, 2,5% de fixar N₂ atmosférico, 26,5% de produzir ácido-indol acético (AIA), 10,3% de sintetizar sideróforos, 23% de produzir ácido cianídrico (HCN), 24% de produzir amilase, e 39,7% de produzir protease. Além disso, quatro isolados foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno *Xanthomonas citri* (Xac306) *in vitro*, além de reduzir em mais de 60% das lesões cancróticas induzidas por Xac306 quando co-inoculadas em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*). Outros cinco isolados foram resistentes a elevadas concentrações de arsenito (As⁺³) e arsenato (As⁺⁵), 5 e 800 mM respectivamente. Estes foram submetidos a espectrometria atômica de raio-X que mostrou redução de até 50% de arsenito e 80% de arsenato em alguns dos isolados. Todos os isolados adsorveram estes metais em suas membranas quando analisados por microscopia eletrônica de varredura com EDS. Estes resultados denotam uma grande importância em estudo de vegetações associadas a afloramentos rochosos no Brasil uma vez que se apresentam como formações únicas, com diversas peculiaridades e altas taxas de endemismos e de raridade. É destacada a alta vulnerabilidade da biota associada aos afloramentos de canga do QF devido à intensa mineração nessa região. Logo, este estudo possui grande relevância, pois está se perdendo não só espécies vegetais únicas como também possivelmente microrganismos não conhecidos com amplo potencial biotecnológico.

Keywords: AIA, nitrogênio, fitopatógeno, arsênio, resistência

INTRODUCTION

O Quadrilátero Ferrífero (QF) é uma região com cerca de 7200 km² localizada entre dois *hotspots* mundiais de biodiversidade, a Mata Atlântica e Cerrado brasileiro. É composto e circundado pelas serras do Curral a oeste, de Ouro Branco ao sul, da Moeda a leste, do Gandarela e do Caraça ao norte, e está inserido em duas das maiores bacias hidrográficas brasileiras, a do Rio Doce e a do Rio São Francisco (Duarte, 2016). Uma diversificada vegetação ocorre ao longo de sua extensão, variando de florestas decíduas semi-tropicais a campos rupestres ferruginosos. Da mesma forma, apresenta uma enorme geodiversidade, sendo composto por diferentes tipos de solo e altitudes, além de um amplo gradiente de clima (Vicente, 2008).

Os campos rupestres ferruginosos são couraças compostas por minerais derivados das formações ferríferas bandadas, hematita compacta e fragmentos de itabirito cimentados por limonita, consideradas ilhas de ferro nos topos e encostas de serras (Dorr, 1964). Em alguns pontos, esses afloramentos chegam a mais de 30 metros de espessura (Simmons, 1963). Devido a essas peculiaridades geomorfológicas, as plantas de campos rupestres apresentam especiações biológicas que favorecem sua adaptação a uma maior conservação de recursos, como a capacidade de lidar com a alta radiação, ventos fortes, distribuição sazonal de chuvas, solo pobre em nutrientes com uma baixa capacidade de retenção hídrica, além de elevadas concentrações de metais (Silveira *et al.*, 2016). Tais condições atuam como poderosos fatores de pressão seletiva e certamente propiciaram a evolução e conseqüente adaptação das plantas em condições tão severas (Gibson *et al.*, 2010). Em decorrências destas condições e características os afloramentos rochosos abrigam espécies raras no Brasil, sendo a maioria das espécies dos campos ferruginosos consideradas endêmicas restritas (Giulietti *et al.*, 2009).

A dinâmica entre as comunidades que vivem nestes ambientes torna as relações ecológicas funcionalmente diversificadas, influenciando até mesmo nas interações entre plantas e microrganismos. Isto porque as plantas proporcionam um nicho único para manutenção de diversas comunidades microbianas e essas, em contrapartida, auxiliam a sobrevivência do vegetal atuando como promotoras de crescimento vegetal (Barrow, 2008).

Neste processo de interação e benefício mútuo, diversificados e elaborados mecanismos bioquímicos são empregados por bactérias para que exerçam este papel junto às plantas. Como mecanismo direto de indução do crescimento vegetal destacam-se as capacidades desta microbita em suplementar a planta com nutrientes ou hormônios. Entre estes mecanismos destacam-se a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N₂), solubilizar fosfato, produzir sideróforos e ácido indol acético (AIA) (Bulgarelli, 2013). Organismos que possuem estes potenciais são comumente utilizados como biofertilizantes. Já como mecanismos de ação indireta destacam-se os organismos que apresentam capacidade de atuarem como biocontroladores ou biorremediadores de solo. Os biorremediadores são aquelas capazes de reduzir a biodisponibilidade de compostos tóxicos às plantas (Ma *et al.*, 2016). Já os biocontroladores são capazes de impedir o crescimento de fitopatógenos por meio de antagonismo microbiano. Estes mecanismos podem estar associados com produção de acilases ou lactonases, antibióticos, toxinas e outras moléculas como ácido cianídrico (HCN) (Combes-Meynet *et al.*, 2011). De forma mais elaborada, este biocontrole também pode se dar por respostas sistêmica induzida (ISR). Neste caso, por meio de sinais moleculares estas bactérias ativam o sistema basal de defesa vegetal que acaba culminando na proteção integral da planta contra ação de patógenos (Vlot *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração todos os tipos de interações benéficas, as relações entre plantas e microrganismos podem oferecer um grande potencial biotecnológico. Isso porque essa diversidade metabólica das PGPB as torna uma alternativa sustentável para a agricultura e nos processos de remediação de solos contaminados.

Diante do que foi exposto, um aspecto relevante é que todo potencial relacionado a microrganismos e plantas endêmicas, além de diversos outros, estão se perdendo devido à intensa atividade de extração mineral na região do QF. Essa área é responsável por aproximadamente 67% da produção de minério de ferro extraído do Brasil (Gurmendi, 2013). Ao mesmo tempo em que atende a demandas econômicas, representa riqueza de biodiversidade e endemismo a ser preservado. Isso denota a importância do presente trabalho que objetiva bioprospectar bactérias com potencial biofertilizante, biocontrolador e biorremediador associadas a plantas endêmicas do QF.

MATERIAL AND METHODS

Área de estudo e coleta amostral

Foram coletadas amostras de nove plantas endêmicas da região de campos ferruginosos da Serra da Moeda - IQ, (latitude 20°15'83''S, longitude 43°97'41''W) sendo elas: *Sinningia rupicola*, *Arthrocerus glaziovii*, *Jacquemontia linarioides*, *Vriesea minarum*, *Oncidium gracile*, *Croton serratoideus*, *Paspalum brachytrichum*, *Chromolaena multiflosculosa*, *Calibrachoa elegans*, além de amostras de raízes e solo dos campos rupestres e de uma caverna dessa região.

Seleção, isolamento e preservação das bactérias cultiváveis

Para isolamento de bactérias associadas a raízes, pequenos fragmentos de raiz foram depositados na superfície de placas de Petri de 90x15 mm contendo meio seletivo Luria- Bertani (LB), acrescido de 2,85 mg/L do antifúngico tiofanato metílico. Para seleção das bactérias endofíticas, as raízes foram superficialmente desinfetadas com uso das soluções: 9 g/L de NaCl/2 min, álcool 70%/2 min, 2% hipoclorito de sódio/2 min e 9 g/L de NaCl/2 min. As bactérias da rizosfera foram isoladas mediante lavagem dos fragmentos de raiz com água estéril. Em seguida uma alíquota de 100 µL desta solução de lavagem foi plaqueada no meio LB seletivo. As bactérias de solo de caverna foram isoladas a partir de uma lavagem de 0,2 g de solo em água estéril, homogeneizadas manualmente por 2 min. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi plaqueada em meio LB seletivo. Todas as placas foram incubadas a 28°C por um período de até 7 dias, e os microrganismos crescidos foram isolados em novas placas de Petri contendo o mesmo meio e preservados em glicerol 15% a -20°C. Para ensaios em larga escala, todos os isolados foram realocados e crescidos em placa de 96 poços, de modo a gerar placas matrizes, tendo sido anotado o mapa da posição de cada isolado, que posteriormente foram plaqueadas com uso de multi-inoculador de 96 poços.

Ensaio de produção de AIA

Para quantificar a produção AIA pelos isolados foi utilizado o método colorimétrico adaptado de Bric *et al.* (1991), utilizando meio de cultura LB enriquecido com 5 mM de triptofano. Os isolados das placas matrizes foram incubados em 200 µL de meio LB líquido por 5 dias a 28°C. As placas foram centrifugadas a 2000g. Em

seguida 100µL dos sobrenadantes foram transferidos para outras placas de 96 poços, seguido da adição de 100 µL de solução Salkowski (2mL FeCl₃·6H₂O 0,5M/L de H₂SO₄) e incubado por 30 min. A produção de AIA foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm. Uma curva padrão com AIA comercial foi previamente estabelecida a fim de gerar uma curva de calibração, realizada com concentrações 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50 e 100 µg.mL⁻¹ de AIA.

Ensaio de fixação de nitrogênio

Partindo das placas matrizes, os isolados foram inoculados em meio de cultura Baz semissólido, livre de N₂, por 14 dias a 28°C (Estrada, *et. al.*, 2001). As bactérias que modificaram a coloração do meio de amarelo para esverdeado indicam a potencial capacidade de fixar nitrogênio.

Ensaio de solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada mediante uso do meio National Botanical Research Institute's phosphate growth (NBRIP) (Nautiyal, 1999), e após 4 dias a 28°C a formação de um halo transparente ao redor da colônia indicou o potencial do isolado em solubilizar fosfato.

Ensaio de produção de sideróforos

A detecção da produção de sideróforo foi baseada no método de Schwyn e Neilands (1987). A partir das placas matrizes, os isolados foram crescidos por 2 dias à 28° e a mudança de coloração de azul para amarelo indica a produção da molécula.

Ensaio de produção de ácido cianídrico

Este método foi adaptado de Bakker e Schippers (1987). Meio LB líquido foi suplementado com 4,4g/L de glicina e 0,081g/L de FeCl₃.6H₂O. A partir das placas matrizes, os isolados foram crescidos a 28°C por 2 dias. Após este prazo, 100 µL de uma solução de ácido pícrico 5% e NaCO₃ 2% foram adicionados em cada poço da placa. A mudança de coloração de amarelo para marrom indicou a produção de HCN.

Ensaio de produção de amilase e protease

Para os ensaios de produção de amilase, os isolados das placas matrizes foram crescidos em placas de Petri contendo meio composto por 6,7g/L de YNB, 2,0g/L de amido solúvel e 20g/L de ágar, a 28°C. Após 24 horas de crescimento o resultado foi revelado com adição de lugol, reagindo por 5 min. (Strauss *et al.*, 2001). Já para os ensaios de produção de protease, os isolados das placas matrizes foram crescidos em meio sólido composto por 20g/L de caseína, 5g/L de peptona, 3g/L de extrato de levedura, 10g/L de glicose e 20g/L de ágar, pH 5,0, por 4 dias a 28°C (Strauss *et al.*, 2001). Em ambos os ensaios a produção de amilase ou protease foi identificada através do aparecimento de um alo transparente.

Ensaio de inibição de fitopatógenos *in vitro*

Para investigar uma possível atividade antimicrobiana dos isolados, ensaios de inibição contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri subsp. citri* patotipo A cepa 306 foram realizados. Na análise de inibição direta, os isolados das placas matrizes foram crescidos em LB líquido a 28°C por 2 dias. Em seguida o fitopatógeno alvo foi espalhado de forma homogênea em uma placa de Petri de 90x15 mm contendo meio LB sólido. Sobre esta cobertura do fitopatógeno foram depositados os isolados bacterianos mediante uso de um multireplicador manual de 96 pontas. A formação de um halo ao redor da colônia do isolado demonstrou inibição do crescimento do fitopatógeno. Os isolados com inibição positiva foram submetidos a um teste de inibição indireta. Esse segundo teste foi realizado com o crescimento do fitopatógeno alvo e do isolado inibidor em câmaras adjacentes de uma placa de Petri septada mantidos a 28°C por 2 dias.

Ensaio de inibição de fitopatógeno *in vivo*

Os ensaios de antagonismo a *Xanthomonas citri subsp. citri* estirpe Xac306 *in vivo* foram realizados sob condições de crescimento controladas no Laboratório de Plantas no Departamento de Tecnologia FCAV da Universidade Estadual Paulista, SP, Brasil. As plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*) foram cultivadas em câmara de crescimento a 28° C e fotoperíodo de 16 h. As bactérias que apresentaram elevada capacidade de inibição *in vitro* foram inoculadas conjuntamente com Xac306 na região abaxial das folhas de citros sob pressão de infiltração com seringas sem agulha. A concentração final de Xac306 e do isolado foram ajustadas para 10⁷CFU/mL em solução de MgCl₂ 10mM. Xac306 em solução de MgCl₂ foi usado como controle

positivo e apenas solução de $MgCl_2$ como controle negativo. As folhas infiltradas foram fotografadas 14 dias após a inoculação. As lesões de cinco folhas infiltradas foram quantificadas e as áreas infectadas foram calculadas utilizando Image J v. 1,48 (Schneider *et al.*, 2012).

Ensaio de resistência a arsênio

Com a finalidade de estudar a resistência dos isolados em diferentes concentrações de arsênio, os isolados das placas matrizes foram crescidos em placas de Petri de 90x15 mm contendo meio LB sólido suplementado com crescentes concentrações de arsenito (As^{+3} 1, 5, 10 e 20mM) ou arsenato (As^{+5} 50, 100, 200, 500 e 800mM). O crescimento dos isolados frente a estas concentrações de arsênio foi avaliado durante 5 dias.

Capacidade de remoção de arsênio *in vitro*

Isolados resistentes a arsênio foram crescidos em 10 ml de meio LB líquido suplementado com 5mM de arsenito e 50 e 300mM de arsenato e mantidas a 28°C em. Um frasco contendo meio de cultura LB sem arsênio e sem bactéria foi utilizado como controle negativo. Após 5 dias, essas soluções foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e analisado por espectroscopia de fluorescência de raios X com reflexão total – TXRF (Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy), S2 Pricofox da Bruker (Hu *et al.*, 2012).

Análise de MEV e SEM / EDS dos isolados resistentes a arsênio

Os isolados resistentes a arsênio foram crescidos por 72 horas a 28°C em LB suplementado com as concentrações máximas de resistência a arsenito e arsenato. Em seguida as células foram precipitadas, lavadas e fixadas em lâminas e, por fim, pulverizadas com nanoestruturas de ouro (De *et al.*, 2008). As lâminas foram então submetidas a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a análise das imagens foi realizada utilizando espectroscopia de raios X de dispersão de energia (SEM/EDS) no NanoLab do Centro Mínero-Metalúrgico da Rede Temática em Engenharia de Materiais (CMM-REDEMAT).

Identificação dos isolados por sequenciamento da região 16S

O DNA dos isolados selecionados foi extraído utilizando DNeasyBlood&Tissue Kit da QIAGEN. Foram amplificadas regiões conservadas do rRNA 16S com os primers universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Yu *et al.*, 2011). A integridade das amostras foi verificada em gel de agarose 0,8% e os produtos do rRNA 16S purificados. As amostras foram quantificadas utilizando *NanoDrop Lite* Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific™. A reação de sequenciamento foi realizada com o sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger) com 96 capilares, ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica, UNESP Jaboticabal. As sequências de DNA foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, 1990).

RESULTADOS

A partir das amostras das nove plantas endêmicas, solo e raízes de caverna, foi isolado um total de 204 bactérias cultiváveis. Todos esses isolados foram crescidos em placa de 96 poços, de modo a gerar placas matrizes facilitando desta forma a análise simultânea de todos os isolados nos ensaios bioquímicos propostos. A tabela em anexo sumariza todos os resultados obtidos por estas análises. Para facilitar a descrição do potencial como PGPB, estes isolados foram classificados em potenciais biofertilizantes, biocontroladores ou biorremediadores de solo, como descrito em detalhes a seguir.

Os isolados que obtiveram os melhores resultados e se demonstraram promissores ao uso em diferentes contextos foram identificados por sequenciamento de região conservada do rRNA 16S. Após uso do programa *Blast* do NCBI, obteve-se o nome do indivíduo com maior porcentagem de identidade. Cada tabela que contém o isolado em potencial apresenta também o nome do indivíduo de melhor identidade, a origem do isolado, porcentagem de cobertura e o resultado dos ensaios. As tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados dos testes em larga escala que representam o potencial biofertilizante, biocontrolador e biorremediador, respectivamente.

Biofertilizantes

Todos os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produzirem AIA, fixarem N₂, solubilizarem fosfato e produzirem amilase. Desses, 12 (5,9%) foram capazes de solubilizar fosfato, 49 (24%) de produzir amilase e 5 (2,5%) isolados apresentaram resultado positivo para o ensaio bioquímico de fixação de N₂. A capacidade de produzir o hormônio AIA foi observada em 54 (26,5%) bactérias, sendo que dessas 9, apresentaram produção superior a 10 µg/mL (Tabela 1 e Fig. 1).

Tabela 1: Principais bactérias com potencial biofertilizante

Seq. Description (Best hit)	Nº	Origem	Ident	AIA	N ₂	PO ₄	Ami
<i>Bacillus thuringiensis</i>	233	Raiz <i>J. linarioides</i>	95%	34,09		+	
<i>Leucobacter</i> sp.	274	Rizo. <i>C. multiflosculosa</i>	94%	13,06			
<i>Serratia</i> sp.	114	Raiz de caverna	79%	12,99		+	
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	177	Raiz <i>A. glaziovii</i>	95%	11,60			
<i>Enterobacter</i> sp.	89	Solo de caverna	*	11,41		+	
<i>Bacillus</i> sp.	107	Solo de caverna	95%	10,99			
<i>Serratia marcescens</i>	116	Raiz de caverna	96%	10,67			
<i>Bacillus</i> sp.	84	Raiz de caverna	96%	10,75			
<i>Bacillus cereus</i>	296	Rizo. <i>C. elegans</i>	96%	9,60		+	
<i>Bacillus cereus</i>	242	Rizo. <i>C. serratoideus</i>	93%		+		+
<i>Lysinibacillus</i> sp.	148	Raiz <i>S. rupicola</i>	95%		+		
<i>Bacillus</i> sp.	247	Rizo. <i>C. serratoideus</i>	96%		+		
<i>Bacillus cereus</i>	248	Rizo. <i>C. serratoideus</i>	97%		+		
<i>Bacillus cereus</i>	273	Rizo. <i>C. multiflosculosa</i>	99%		+		

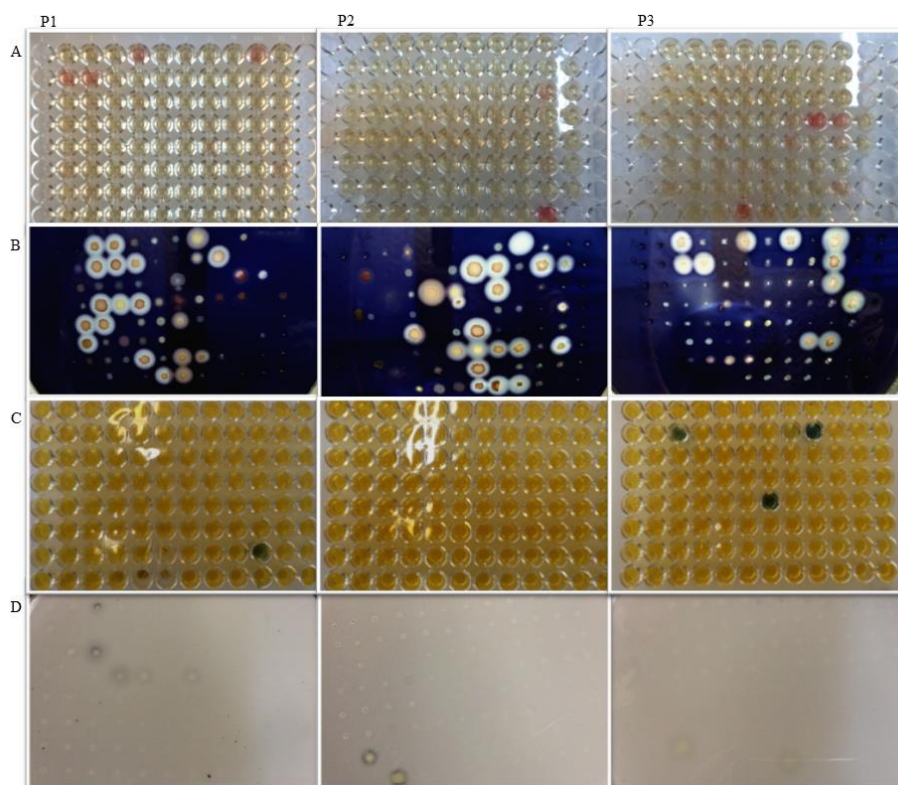


Figura 1: P1, P2 e P3 são as placas originadas da matriz com os 204 isolados. A- Ensaio de AIA no qual a coloração rosa indica a produção do hormônio. B- Ensaio de produção de amilase no qual o alo transparente significa a produção da enzima. C- Ensaio de fixação de nitrogênio, mudança de coloração de amarelo para verde indica potencial. D- Ensaio de solubilização de fosfato com alo indicando capacidade do isolado.

Biocontroladores

Os 204 isolados foram submetidos a ensaios bioquímicos de promoção indireta de crescimento vegetal e de inibição de fitopatógenos. Destes 21 (10,3%) foram capazes de sintetizar sideróforo, 47 (23%) de produzir HCN, 81 (39,7%) de produzir proteases (Figura 2) e 4 (2,75%) inibiram o crescimento de *Xanthomonas citri subsp. citri in vitro*. A partir deste resultado de inibição direta, estes quatro isolados foram submetidos a um teste de inibição indireta a fim de verificar se esse potencial inibitório se dá por compostos sólidos ou voláteis. Para este ensaio, nenhum dos isolados foi capaz de inibir o crescimento de *Xanthomonas*, indicando que as substâncias inibitórias não são voláteis (Figura 3). Os principais resultados quanto ao potencial biocontrolador estão representados na tabela 2.

Tabela 2: Principais bactérias com potencial biocontrolador.

Seq. Description (best hit)	Nº	Origem	Ident	Sid.	HCN	Pro	Inib. XAC
<i>Serratia</i> sp.	108	Raiz de caverna	95%	? (rosa)	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	166	Raiz <i>S. rupicola</i>	96%	? (rosa)	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	115	Raiz de caverna	96%	? (rosa)	+		+
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	268	Raiz <i>C. multiflosculosa</i>	96%		+		+

O símbolo de interrogação significa que a bactéria isolada apresentava pigmentação rosa, o que impediu a detecção da reação do ensaio de produção de sideróforo.

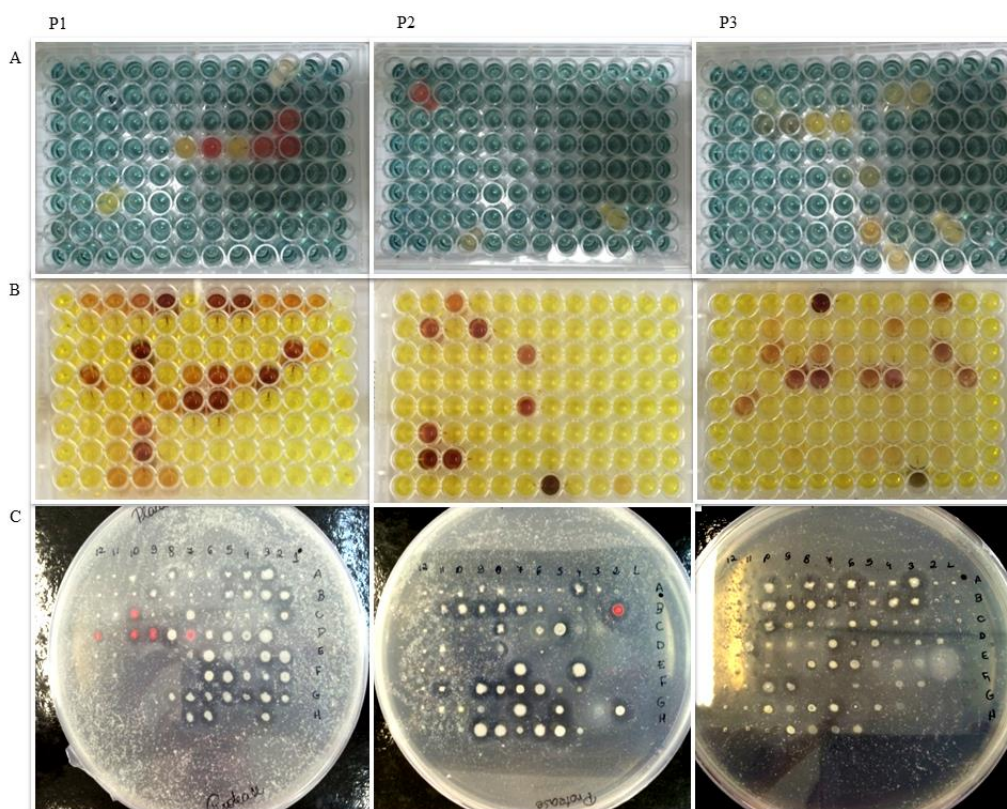


Figura 2: A- Ensaio de produção de sideróforo com mudança de coloração do meio de azul para amarelo. B- Ensaio de produção de ácido cianídrico com modificação da coloração de amarelo para marrom. C- Ensaio de produção de protease com formação de alo transparente para as positivas. Obs.- A coloração rosa nas placas P1 e P2 de sideróforo são colorações naturais dessas bactérias, não sendo possível a detecção da produção de sideróforo por este ensaio.

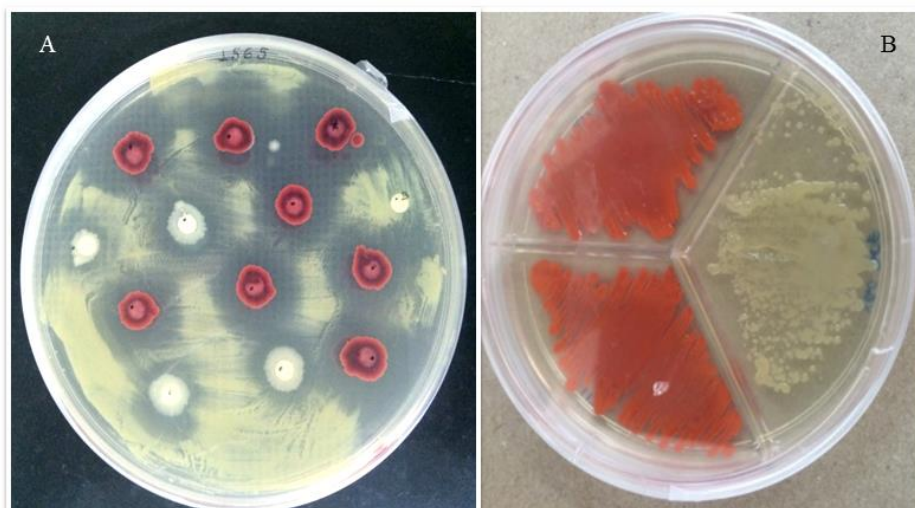


Figura 3: A- Ensaio de inibição direta de *Xanthomonas citri*. O teste foi realizado com os 204 isolados, a imagem representa apenas os positivos. B- Ensaio de inibição por compostos voláteis.

Com o objetivo de verificar se este potencial inibitório também era observado em ensaios *in vivo*, estes isolados foram coinfectados com *Xanthomonas citri* em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*). Após 14 dias as folhas foram verificadas e o que se pôde observar é que as lesões cancróticas diminuíram significativamente em relação ao controle de infecção para os quatro isolados (Figuras 4 e 5).

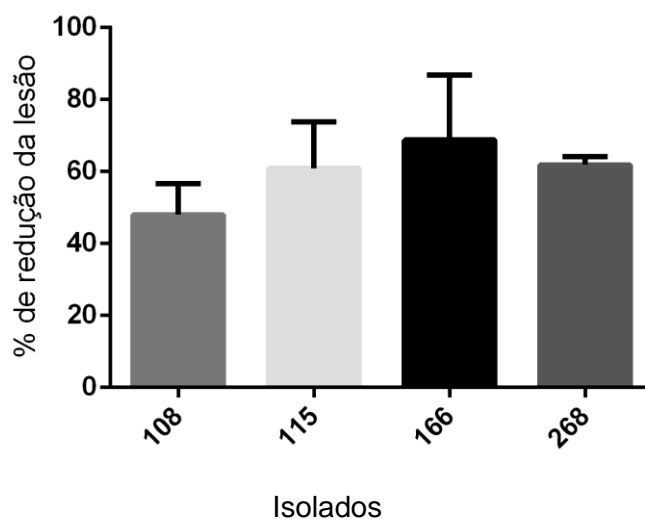


Figura 4: Representação do percentual de redução da lesão causada por Xac306 na presença dos isolados. Cálculos realizados pela medida da área de lesão pelo ImageJ.

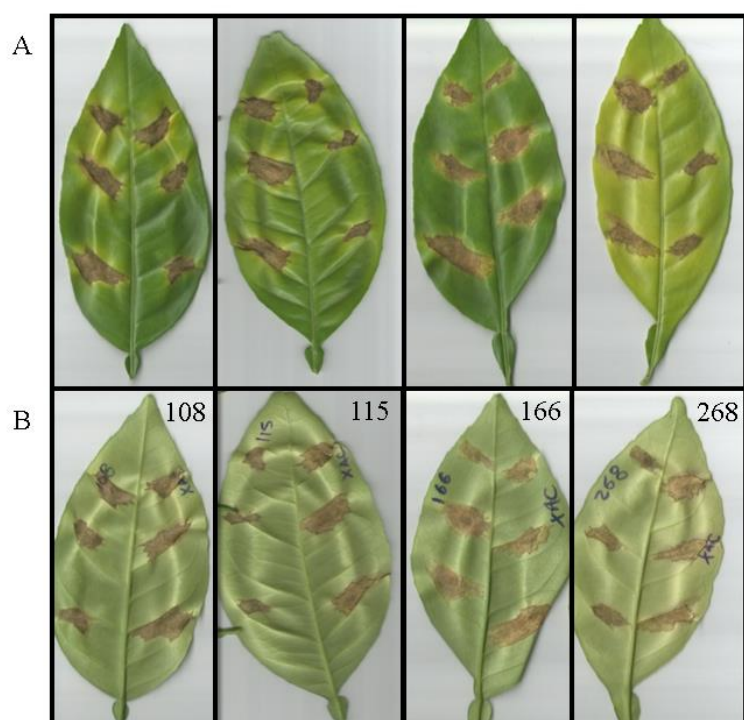


Figura 5: A- Face adaxial das folhas de citros, sendo o lado esquerdo de cada folha o inóculo somente de *Xanthomonas* e o lado direito das folhas o inoculo de Xac com o isolado inibidor. B- Face abaxial das folhas de citros, de forma oposta, o lado direito de cada folha é o inoculo de *Xanthomonas* e o lado esquerdo das folhas o inóculo de XAC306 com o isolado inibidor.

Biorremediadores

Na tentativa de avaliar o potencial quanto a resistência a metais, todos os isolados foram crescidos em concentrações de arsenito e arsenato que variaram, respectivamente, de 0,5 a 10 mM e de 1 a 1000 mM. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que 5 isolados (2,645%) foram capazes de resistir a elevadas concentrações de ambas as espécies de arsênio (tabela 3).

Tabela 3: Isolados com potencial biorremediador e concentrações máximas de tolerância a arsênio.

Seq. Description (best hit)	Nº	Origem	As ⁺³ (mM)	As ⁺⁵ (mM)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	291	Rizo. <i>C. elegans</i>	5	800
<i>Curtobacterium</i> sp.	209	Caule <i>A. glaziovii</i>	5	500
<i>Enterobacter</i> sp.	89	Solo de caverna	5	300
<i>Leucobacter</i> sp.	274	Rizo. <i>C. multiflosculosa</i>	5	50
<i>Curtobacterium</i> sp.	208	Caule <i>A. glaziovii</i>	5	50

Com o propósito de compreender a capacidade de remoção deste metal no meio, estes isolados foram crescidos na presença de ambas as espécies de arsênio e por espectroscopia por fluorescência de raios X com reflexão total – TXRF foi possível verificar que todos os isolados demonstraram elevada capacidade de remoção deste metal após 5 dias (Figura 6). Destaque para o isolado 209 que removeu 50% de arsenito e 60% de arsenato e para o isolado 272 que removeu aproximadamente 50% de arsenito e 80% de arsenato.

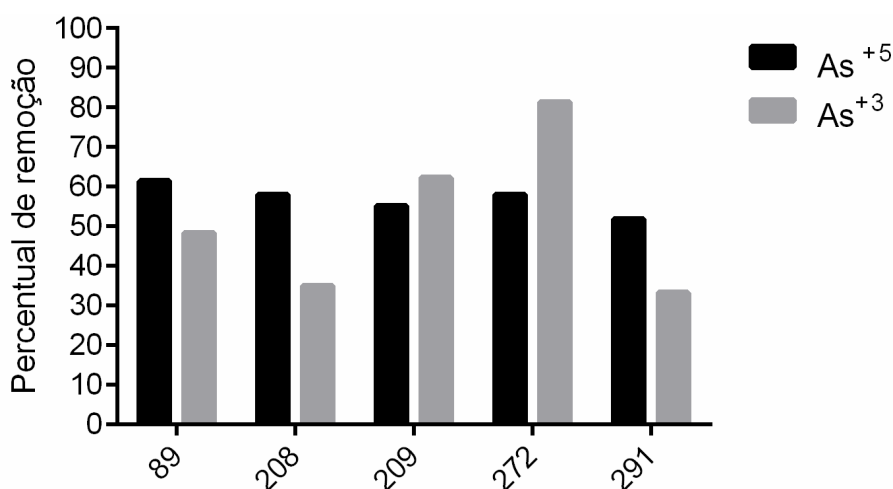


FIGURA 6: Percentual de remoção de As^{+3} e As^{+5} de cada isolado. Para As^{+3} a concentração do metal no meio de cultura foi 5mM e para As^{+5} 300mM para o isolado 291 e 50mM para os demais.

Com o objetivo de compreender possíveis modificações estruturais nas células destes isolados decorrentes do processo de remoção deste metal do meio, microscopia eletrônica de varredura (MEV) seguido de análise de espectroscopia de raios-X de dispersão de energia (EDS) foram realizadas. Foi possível observar que nenhum destes isolados modificou significativamente suas estruturas celulares, mas em todos foi possível detectar formação de aglomerados celulares, resultado típico de células bacterianas submetidas a estresse (Pandey e Bhatt, 2015) (Figura 7). Chamou atenção o fato de que em todos os isolados foram encontradas ambas as espécies de arsênio adsorvidas em suas membranas (dados não apresentados)

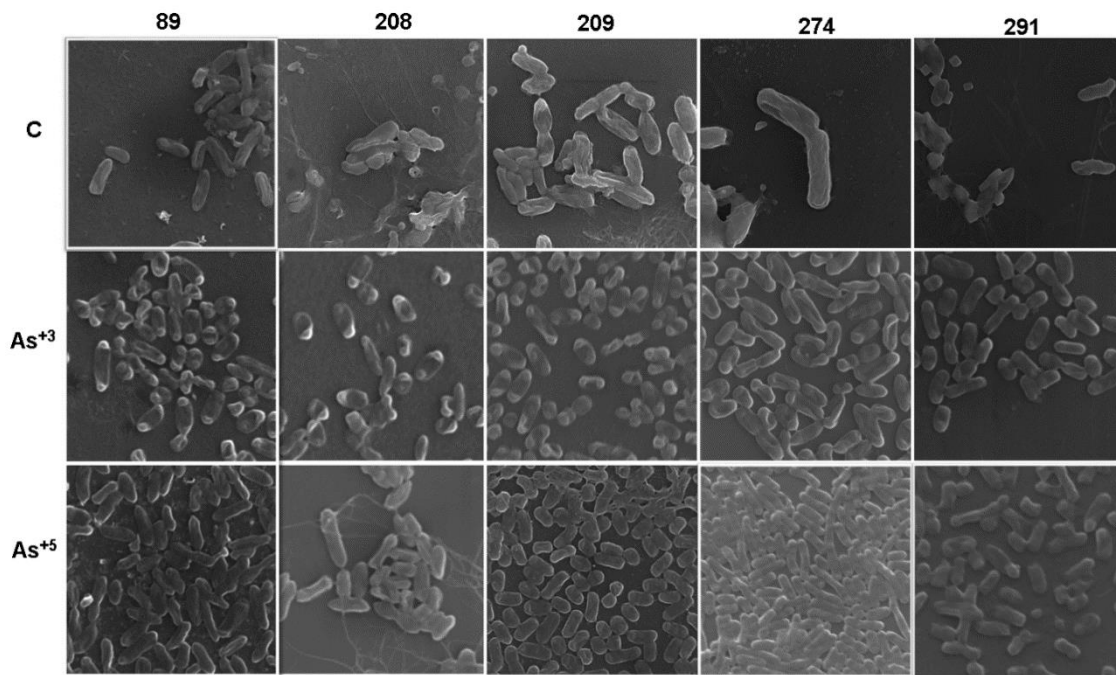


FIGURA7: Microscopia eletrônica de varredura dos isolados resistentes a arsênio. C- controle.

DISCUSSION

A diversidade de plantas presentes nos campos rupestres ferruginosos (CRF) reforça a ideia de que este ambiente não é único, mas sim aglomerados de micro-habitats distintos (Silveira *et al.*, 2016). Essa complexidade estrutural possibilita interações ecológicas heterogêneas de maneira a favorecer o estabelecimento das espécies em um ambiente hostil como o solo do CRF. As características das plantas desse tipo de solo são decorrentes de processos adaptativos que visam a conservação de recursos (Negreiros *et al.*, 2014). Neste contexto, podemos inferir que a associação com uma microbiota específica deve contribuir para manutenção desta condição.

Mais do que auxiliar no estabelecimento das plantas, existe relação direta entre a diversidade de microrganismos e a endemidade das plantas, ou seja, uma relação de complementaridade e especificidade entre plantas e microrganismos. Argüeso *et al.*, (2011) demonstraram a especiação de bactérias nodulantes na planta endêmica *Lupinus mariae-josephi*, que é encontrada em solo com calcário ativo e pH elevado, um micro-habitat restrito. Esses pesquisadores comprovaram por meio de análises moleculares que as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, capazes de induzir formações ondulantes, encontradas na planta endêmica possuíam diferentes

características fenotípicas e simbióticas de outras bactérias do gênero *Bradyrhizobium* de outras *Lupinus* não endêmicas e de locais distintos, concluindo que a especiação das bactérias pode resultar da colonização de um habitat singular. Partindo do mesmo princípio, os microrganismos associados às plantas endêmicas do CRF possivelmente auxiliam no estabelecimento em um ambiente submetido a grandes variações de temperatura, pouca água e altas concentrações de metais, ou seja, um habitat particular.

Os fatores que auxiliam estas bactérias no estabelecimento das plantas endêmicas podem ser diversos, colocando-as como importantes e especializadas bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB). A produção de AIA por 26,5% dos isolados investigados pode estar associada com o mecanismo de enraizamento das plantas em um solo rochoso. Assim, para compensar a dificuldade de penetração, as plantas destas regiões apresentam grande volume de enraizamento adjacente/secundário que cresce paralelamente às rochas, e este potencial pode ter direta relação com a contribuição destas bactérias. Da mesma maneira, algumas bactérias isoladas nesse trabalho que foram capazes de solubilizar fosfato, provavelmente tem papel crucial no estabelecimento das plantas endêmicas em solos tão pobres desse composto. Isso porque o solo dos campos rupestres ferruginosos do QF, embora sejam ricos em Ferro, mostram baixos teores de Si, P e micronutrientes, sendo o fósforo o elemento mais limitante (Schaefer *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2010).

Os solos desenvolvidos sobre a canga também apresentam baixíssimos teores de N₂ total o que reflete sua pobreza química geral (Schaefer *et al.*, 2008). Nesse ponto, são importantes as bactérias fixadoras de nitrogênio, que embora tenham sido encontradas em menor número nesse trabalho (2,5%), podem ser essenciais no desenvolvimento e manutenção destes vegetais, permitindo que a ciclagem deste componente fundamental ao desenvolvimento das plantas se estabeleça. A amilase, por sua vez, é uma enzima importante no metabolismo energético das plantas, o que pode estar relacionado com a produção dessas moléculas por cerca de um quarto dos isolados.

As PGPBs também podem beneficiar o crescimento das plantas de forma indireta, por meio das bactérias biocontroladoras de patógenos. Esse potencial antagonista pode se dar por uma ampla gama de mecanismos como produção de compostos secundários, sideróforos, antibióticos, metabólitos voláteis, enzimas, indução de resposta sistêmica, dentre outros (Saraf *et al.*, 2014). Do total de isolados obtidos

neste estudo, 10,3% dos foram capazes de sintetizar sideróforo, molécula que complexa ferro para torná-lo disponível para planta, suprindo diretamente a necessidade desse elemento pelo vegetal e restringindo o ferro para os fitopatógenos circundantes, eliminando-os por competitividade (Ahmed e Holmström, 2014). Ainda que os campos rupestres ferruginosos sejam ricos em ferro, esse metal não está majoritariamente em sua forma disponível (Schaefer *et al.*, 2008). Outro mecanismo importante ao biocontrole é a produção de enzimas que degradam componentes de membranas de organismos fitopatógenos, como é o caso de proteases (Aeron *et al.*, 2011). Do total de isolados obtidos neste estudo, 39,7% foram capazes de produzir algum tipo de protease, incluindo os quatro isolados que inibiram o crescimento de *Xanthomonas citri*, demonstrando o potencial e a importância destes organismos num possível processo de proteção vegetal. De maneira análoga, a produção de HCN está entre os metabólitos voláteis produzidos por algumas PGPBs que podem causar inibição destes fitopatógenos, como o caso já descrito em *Pseudomonas* sp. LBUM300 que apresentou potencial controle de cancrose induzida por *Clavibacter michiganensis* em plantas de tomate (Lanteigne, 2011). No presente trabalho, 23% do total de isolados foram capazes de produzir HCN, incluindo, novamente, os quatro isolados que foram capazes de inibir *Xanthomonas citri*.

Da mesma forma que promovem o crescimento vegetal e protegem as plantas de fitopatógenos, muitas PGPBs auxiliam na adaptação e manutenção das plantas em ambientes com elevadas concentrações de metais (Kumari *et al.*, 2016; Tak *et al.*, 2013; Gamalero *et al.*, 2009). O arsênio é um metal pesado altamente tóxico, pois acarreta alterações metabólicas severas, culminando em significativos danos celulares (Finnegan e Chen, 2012). As formações geológicas dos campos rupestres ferruginosos do QF, onde foram coletadas as plantas estudadas, apresentam naturalmente elevadas concentrações de arsênio (Costa *et al.*, 2015). A resistência de alguns dos isolados a elevadas concentrações desse metal pode justificar sua adaptação a estes ambientes contaminados e conseqüentemente das plantas associadas a esses microrganismos. Além de resistir ao arsênio, essas bactérias foram capazes de remover o metal do meio e, embora a análise por microscopia de varredura não tenha mostrado mudanças significativas na morfologia das células, o que indicaria bioacumulação do metal, análise por EDS mostrou a presença de arsênio adsorvido na membrana. Assim, esses isolados podem caracterizar-se como potencial biorremediador.

CONCLUSIONS

As análises estabelecidas neste trabalho demonstraram a importância das interações entre bactérias e plantas endêmicas de cangas ferruginosas sugerindo que essas associações estejam diretamente ligadas ao estabelecimento das plantas em um ambiente peculiar. Essas bactérias provavelmente se relacionam com intima especificidade e promovem o crescimento das plantas, protegem contra fitopatógenos e minimiza o contato com o metal pesado arsênio. Além do papel ecossistêmico, os isolados deste trabalho demonstram um grande potencial biotecnológico, uma vez que podem ser utilizados em substituição a fertilizantes, agrotóxicos e ajudar na remediação de ambientes contaminados. A importância desse estudo está também na preservação do Quadrilátero Ferrífero e sua consequente diversidade, um ambiente sobre intença ação antrópica, mas que como demonstrado, corre o risco de ter enorme potencial e diversidade perdidos.

REFERENCES

- Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P. & Maheshwari, D. K. in *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems* (ed. Maheshwari, D. K.) 1–36 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
- Ahmed, E. & Holmström, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* **7**, 196–208 (2014).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
- Bakker, A. W. & Schippers, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry* **19**, 451–457 (1987).
- Barrow, J. R., Lucero, M. E., Reyes-Vera, I. & Havstad, K. M. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? *Commun Integr Biol* **1**, 69–73 (2008).

- Bric, J. M., Bostock, R. M. & Silverstone, S. E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl Environ Microbiol* **57**, 535–538 (1991).
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E. & Schulze-Lefert, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 807–838 (2013).
- Combes-Meynet, E., Pothier, J. F., Moënne-Loccoz, Y. & Prigent-Combaret, C. The Pseudomonas secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of Azospirillum genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 271–284 (2011).
- Costa, R. de V. F. da *et al.* Geochemical mapping of arsenic in surface waters and stream sediments of the Quadrilátero Ferrífero, Brazil. *Rem: Revista Escola de Minas* **68**, 43–51 (2015).
- De, J., Ramaiah, N. & Vardanyan, L. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar. Biotechnol.* **10**, 471–477 (2008).
- Dorr, J. V. N. Supergene iron ores of Minas Gerais, Brazil. *Economic Geology* **59**, 1203–1240 (1964).
- Duarte, G. T., Ribeiro, M. C. & Paglia, A. P. Ecosystem Services Modeling as a Tool for Defining Priority Areas for Conservation. *PLOS ONE* **11**, e0154573 (2016).
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R. & Caballero-Mellado, J. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2790–2798 (2001).
- Finnegan, P. M. & Chen, W. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front Physiol* **3**, (2012).
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G. & Glick, B. R. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* **55**, 501–514 (2009).
- Gibson, N., Yates, C. J. & Dillon, R. Plant communities of the ironstone ranges of South Western Australia: hotspots for plant diversity and mineral deposits. *Biodivers Conserv* **19**, 3951–3962 (2010).

- Giulietti, A.M., Rapini, A., Andrade, M.J.G., Queiroz, L.P., Silva, J.M.C. Rare plants of Brazil. *Conservation International*.(2009)
- Gurmendi, A. C. The Mineral Industry of Brazil. Minerals Yearbook. Vol. 3. Brazil: U.S. *Geological Survey* (2013).
- Hu, S., Lu, J. & Jing, C. A novel colorimetric method for field arsenic speciation analysis. *J Environ Sci (China)* **24**, 1341–1346 (2012).
- Kim, M., Morrison, M. & Yu, Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J. Microbiol. Methods* **84**, 81–87 (2011).
- Kumari, D. *et al.* Microbially-induced Carbonate Precipitation for Immobilization of Toxic Metals. *Adv. Appl. Microbiol.* **94**, 79–108 (2016).
- Lanteigne, C., Gadkar, V. J., Wallon, T., Novinscak, A. & Fillion, M. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. *Phytopathology* **102**, 967–973 (2012).
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C. & Freitas, H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manage.* **174**, 14–25 (2016).
- Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 265–270 (1999).
- Negreiros, D., Stradic, S. L., Fernandes, G. W. & Rennó, H. C. CSR analysis of plant functional types in highly diverse tropical grasslands of harsh environments. *Plant Ecol* **215**, 379–388 (2014).
- Pandey, N. & Bhatt, R. Arsenic resistance and accumulation by two bacteria isolated from a natural arsenic contaminated site. *J. Basic Microbiol.* **55**, 1275–1286 (2015).
- Sánchez-Cañizares, C. *et al.* Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 207–215 (2011).
- Saraf, M., Pandya, U. & Thakkar, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol. Res.* **169**, 18–29 (2014).

- Schaefer, C.E.G.R., Mendonça, B.A.F. and Ribeiro, A.S. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. *In: Jacobi, C.M. (ed.). Simpósio Afloramentos Ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero: Biodiversidade, Conservação e Perspectivas de Sustentabilidade. UFMG/ ICB, Belo Horizonte. (2008)*
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* **9**, 671–675 (2012).
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47–56 (1987).
- Silveira, F. A. O. *et al.* Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant Soil* **403**, 129–152 (2016).
- Strauss, M. L., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G. & van Rensburg, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 182–190 (2001).
- Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 807–838 (2013).
- Tak, H. I., Ahmad, F. & Babalola, O. O. Advances in the application of plant growth-promoting rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. *Rev Environ Contam Toxicol* **223**, 33–52 (2013).
- Vincent, R. de C. & Meguro, M. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Botany* **31**, 377–388 (2008).
- Vlot, A. C., Klessig, D. F. & Park, S.-W. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 436–442 (2008).
- Wang, Y. *et al.* Crop productivity and nutrient use efficiency as affected by long-term fertilisation in North China Plain. *Nutr Cycl Agroecosyst* **86**, 105–119 (2010).

5- Capítulo III: *Alcaligenes faecalis* isolada de *Mimosa calodendrum* e seu destacado potencial biorremediador

Título: *Alcaligenes faecalis* associated with *Mimosa calodendron* rizosphere assist plant survival in arsenic rich soils.

Érica Barbosa Felestrino, Renata de Almeida Barbosa Assis, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes, Isabella Ferreira Cordeiro, Natasha Peixoto Fonseca, Morghana Marina Villa, Izadora Tabuso Vieira, Luciana Hiromi Yoshino Kamino, Flávio Fonseca do Carmo, e Leandro Marcio Moreira

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar o potencial biorremediador das bactérias associadas à planta endêmica *Mimosa calodendrum*. Por ser uma planta arbustiva, é considerada uma espécie fundamental para a manutenção de outras plantas endêmicas de menor porte. Plantas facilitadoras são importantes tanto como pioneiras em ambientes inabitados quanto na regeneração de ambientes degradados. Devido a essa importância, o microbioma dessa leguminosa torna-se propício para encontrar bactérias com potencial biotecnológico. Dentre os isolados, um identificado como sendo uma *Alcaligenes faecalis* apresentou significativo potencial biorremediador para o metal pesado arsênio, com altas taxas de remoção e possível recuperação de solos contaminados. Visto que os solos do Quadrilátero Ferrífero são ricos em arsênio, essas bactérias podem contribuir para a manutenção do ecossistema de canga além de serem promissoras na recuperação de contaminações ambientais.

Este artigo foi submetido na revista *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, e foi aceito com “minor revisions”.

***ALCALIGENES FAECALIS* ASSOCIATED WITH *MIMOSA CALODENDRON* RIZHOSPHERE ASSIST PLANT SURVIVAL IN ARSENIC RICH SOILS**

Érica Barbosa Felestrino¹, Renata de Almeida Barbosa Assis¹, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes¹, Isabella Ferreira Cordeiro², Natasha Peixoto Fonseca¹, Morghana Marina Villa³, Izadora Tabuso Vieira³, Luciana Hiromi Yoshino Kamino⁴, Flávio Fonseca do Carmo⁴, and Leandro Marcio Moreira^{1,5#}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. ³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. ⁴Instituto Prístino, Belo Horizonte, MG, Brasil. ⁵Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, *Campus* Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG, Brasil.

#Corresponding author:

LMM mailing address: Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil. Zip Code 35400-000. Phone: +55 (31) 3559-1698, FAX: +55 (31) 3559-1672, e-mail lmmorei@gmail.com

Running Title

Soil arsenic removal by *A.faecalis* strain Mc250

ABSTRACT

The Ferruginous Rupestrian Grasslands (FRG) in the Iron Quadrangle (IQ) are ecosystems characterized by rocky soils with reduced availability of water and nutrients, but high levels of metals. In order to comprehend the interference of microorganisms on the adaptive process of endemic plant *Mimosa calodendrum* (Fabaceae), bacteria associated with its roots and rhizosphere were isolated. Fourteen isolates were obtained and subsequently grown in the presence of different concentrations of arsenic species. The isolate Mc250, an *Alcaligenes faecalis* strain, resisted to 10 mM of As (III) and 800 mM of As (V). In the presence of this strain, atomic spectrometer detected a reduction of 55% for As (III) and 72% for As (V) respectively in 10 mM and 500 mM solution. Scanning electron microscopy of this isolate demonstrated morphological modification and EDX spectroscopy revealed the presence of both As species adsorbed on the membrane, justifying the removal observed in the *in vitro* assays. To validate this potential removal of As *in vivo*, tomato plants were used as grown model in the presence and absence of *A. faecalis* in soil previously contaminated with 5 mM of As (III). After 14 days, plants from contaminated soil had their growth improved when compared to untreated control plants. All these results suggest for the first time that plant-associated bacteria from FRG-IQ present potential for soil rhizoremediation and may benefit the adaptive processes of plants in extreme environments including application in recovering degraded areas.

Keywords: Arsenic removal, arsenic resistant bacteria, Iron Quadrangle, *Mimosa calodendron*, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, rhizoremediation.

INTRODUCTION

The Iron Quadrangle (IQ), an area of approximately 7200 km² located in the south central region of Minas Gerais State, is remarkable for the giant iron and gold ore reserves (Figure 1A). Therefore, mining activity in this region placed Brazil as the second largest world provider of iron ore. In 2014, around 400 million tons were produced, most of which extracted from IQ, which concentrates almost 80% of iron mines in activity (Salgado and Carmo, 2015).

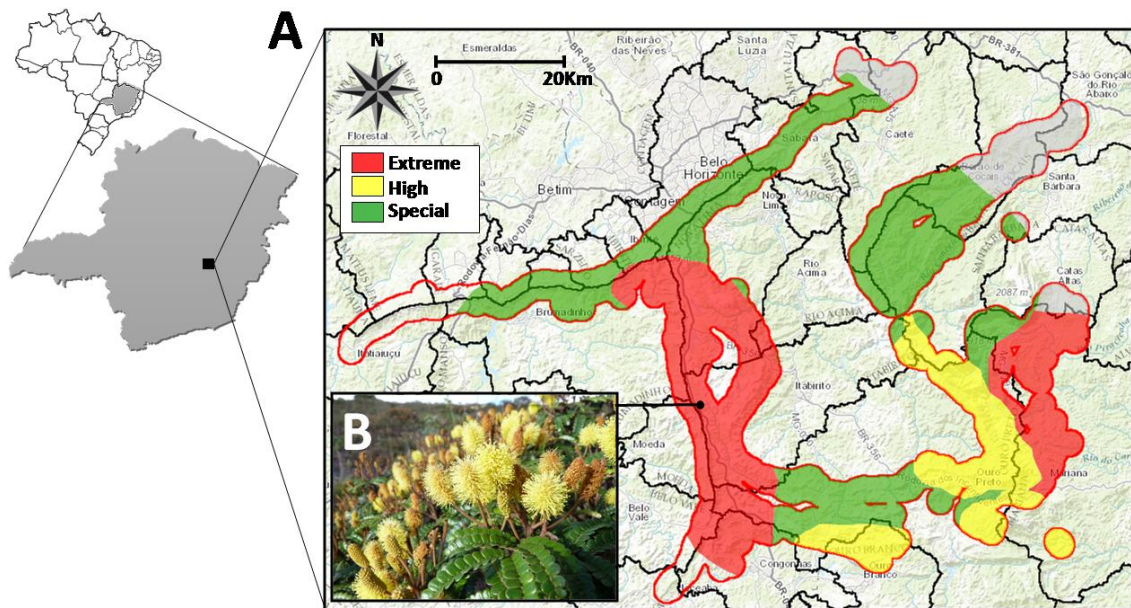


Figure 1: Iron Quadrangle geographical location and area where *Mimosa calodendron* was sampled. A) IQ location highlighting elevated areas that stand out on their vertices. The colors identify the priority areas for biodiversity conservation of Minas Gerais flora (see legend) obtained from the digital atlas Geoambiental (<http://www.institutopristino.org.br/atlas>). B) Identification of the area in Moeda Mountain where *Mimosa calodendron* was sampled.

The high geochemical diversity and intense mining activities resulted in soils and stream sediments with anomalous concentrations of many different trace elements such as Zn, Pb, Ni, Cr, and As. Arsenic is a heavy metal extremely toxic to any organism and its toxicity mechanisms in plants are well established (Tripathi *et al.*, 2007). Average concentrations of arsenic in soils from the IQ regions are around 960 mg/kg, though in some situations it might reach up to 13400 mg/kg. These higher As-concentrations generally occur associated with magmatic sulfides and iron ores (Vicq *et al.*, 2015).

The iron geosystem of IQ consists of Cretaceous limonite cemented iron-caps, named *cangas*, and other lithotypes composed by high concentrations of metallic minerals especially iron and manganese. The extreme environmental conditions of *cangas* such as surface temperatures up to nearly 70°C, acids and impoverished soils, and substrates with high concentrations of metallic minerals, maintain plant communities characterized by a rarity and high degree of endemism (Carmo and Jacobi, 2016). The plant endemism in this region is directly related to their morphophysiological adaptations (Vincent and Meguro, 2008) associated with production of osmolytes, alteration in water transport, and detoxification of reactive oxygen species (Rodríguez *et al.*, 2008). Due to the presence of such adaptive traits, these plants are characterized as metalliferous, which can be grouped as hyperaccumulators, metallophytes (with endemic taxa from metal-bearing areas), and pseudometallophytes (Whiting *et al.*, 2004).

In southeastern of Brazil these peculiar vegetation is classified as Ferruginous Rupestrian Grasslands (FRG) (Silveira *et al.*, 2016). Metallophytes communities of plants from FRG represent one of the most relevant for conservation purposes since they can provide ecological services such as phytoextraction, phytostabilization, and phytoprospection (Ginocchio and Baker, 2004), being for some authors considered a diversity hotspot region (Silveira *et al.*, 2016). In FRG, sixty *canga* endemic plants were catalogued (Carmo and Jacobi, 2012); however, a few have been better characterized in an ecological context, as is the case of the leguminous *Mimosa calodendron* Mart. ex Benth (Fabaceae). This nodulating shrubby leguminous species may be an important N₂ fixer, and even act as a “nurse plant” promoting, for example, shadowing, which in turn would favor the recruitment and establishment of seedlings (Dayrell *et al.*, 2015).

Nevertheless, there are no studies connecting *Mimosa calodendron* or any other endemic species from this region with the soil microbiota, except a few works demonstrating the relationship of some of these plants to phosphate metabolism (Matias *et al.*, 2009). In contrast, it is known for other models the importance of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in the maintenance and growth of plant species (Santoyo *et al.*, 2016). PGPR have been highlighted due to its role as microorganisms that can act in bioremediation, biocontrol, and biofertilization (Pérez-Montañaño *et al.*, 2014). In this context, they seem to be fundamental to survival, maintenance and adaptation of plants to FRG.

Based on this geochemical and environmental perspective, the main purpose of this study was to investigate, although in a preliminary and focused manner, the importance of bacteria associated with the roots and rhizosphere of *Mimosa calodendron*, as bioremediator of soils contaminated with high As concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Plant sample collection

Three *Mimosa calodendron* roots and rhizosphere samples were collected from the Moeda Mountains (latitude 20°15'83''S, longitude 43°97'41''W), Minas Gerais State, Brazil (Figure 1B). The samples were transferred to laboratory 4 hours after collected.

Bacterial isolation

The samples were serially diluted (up to 10^{-6}) and inoculated in Petri dishes (60 x 15 mm) containing Luria-Bertani (LB) agar medium (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 10 g/L, agar 15 g/L, adjusted to pH 7.0). The root samples were washed to external disinfection following the steps: 9 g/L NaCl solution for 2 min, 70% alcohol for 2 min, 2% sodium hypochlorite solution for 2 min, and 9 g/L NaCl solution for 2 min. Slices of roots pre-disinfected were inoculated on LB agar medium surface. In both cases, the plates were incubated at 28°C for up to seven days. To isolate bacterial strains, the colonies were individually streaked in another Petri dish containing LB agar medium. Fourteen isolates were originally obtained and kept in LB medium slants in 15% glycerol at -80°C.

BOX-PCR-based identification of bacterial species

BOX-PCR analysis was used to verify molecular characterization of bacterial isolates (Versalovic *et al.*, 1991). The PCR reaction was prepared to a final volume of 25 µl containing: 2 µl of DNA, 4 µl primer BOX (BOX 1AR) 50 pmol, 4 µl of PCR buffer 5X (Fermentas), 1 µl 25 mM MgCl₂, 3 µl dNTP 10 mM, 0.3 µl of 5U TaqDNA polymerase (Fermentas), and the final volume filled with sterile distilled water. The PCR thermocycler (Biosystems) was used under the following conditions: initial denaturation

at 95 °C for 5 minutes followed by 35 cycles of 1 minute denaturation at 95 °C, 1 minute annealing at 53 °C, and 2 minute extension at 72 °C. A final extension was incorporated for 10 minutes at 72 °C. PCR products were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis in 1x TBE buffer, eluted in 6X run buffer stained with ethidium bromide for approximately 30 min at 120V.

Arsenic resistance assays

All isolated bacterial strains were screened for arsenic resistance assay. These strains were grown on LB plates containing different concentration of As (V) (Na_2HAsO_4) ranging from 0.5 to 500 mM (~ 150 to 250.000 mg kg^{-1}) and As (III) (NaAsO_2) ranging from 0.1 to 10 mM (~ 13 to 1.300 mg kg^{-1}). All plates were incubated at 28°C for up to 3 days. *Mimosa calodendron* isolate 250 (Mc250) was found to be resistant to 800 mM As (V) and 10 mM As (III). This bacterial strain has been selected for further analysis.

Identification of Mc250 strain

Pure culture of Mc250 strain was grown overnight in LB medium for the isolation of genomic DNA using QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The identification was carried out through PCR amplification of 16S rDNA. The As resistant isolate was named *Alcaligenes faecalis* strain Mc250 and its sequence data have been deposited in the GenBank (accession number KY271067). Sequence analysis of the isolate was compared with 16S rDNA sequences using Blastn search (Altschul *et al.*, 1997).

Growth curve of *A. faecalis* strain Mc250

In order to study the effect of metal concentration on bacterial growth, *A. faecalis* strain Mc250 was inoculated in LB broth with and without 10 mM As (III) and 800 mM As (V), and incubated at 28°C under shaking conditions at 180 rpm. Growth was monitored spectrophotometrically at 600 nm at every three hours until constant readings were observed in control and test samples.

***In vitro* arsenic removal capacity by *A. faecalis* strain Mc250**

The *A. faecalis* strain Mc250 was grown at 28°C in two Erlenmeyer flasks of 500 mL containing both 300 mL nutrient broth and 500 mM As (V) and 10 mM As (III) each one. As-free media was taken as a control. The flasks were placed in an orbital shaker at 150 rpm at 28°C. Culture broth of 10 mL was collected, centrifuged, and the supernatant analyzed by atomic absorption spectrophotometry. Finally, total arsenic and other heavy metals were determined.

Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM/EDS)

The sixteen-hours grown culture of *A. faecalis* strain Mc250 was inoculated (1%, v/v) in two LB plates with 500 mM of As (V) and 10 mM of As (III) respectively, and incubated for 72 h at 28°C. Cells were harvested after incubation by centrifugation and washed twice with sodium phosphate buffer (pH 7.4). Cells were then fixed with paraformaldehyde solution (0.5%) and washed twice with sodium phosphate buffer. Dehydration of cells was carried out in gradient of ethanol, and the fixed cells were sputtered with gold nanostructures (Focardi *et al.*, 2010). The scanning electron microscopy observation and energy dispersive X-ray spectroscopy analyses were performed at NanoLab of *Centro Mínero-Metalúrgico da Rede Temática em Engenharia de Materiais* (CMM-REDEMAT).

Experimental assay using tomato plants

A greenhouse experiment was conducted to evaluate the effect of bacterial isolates on plant growth and As uptake by tomato Santa Clara 5800 cultivar. It was previously performed a tomato growth curve for different concentrations of As (III) in order to detect which metal concentration affects plant growth. The limiting concentration of 5 mM was established for As (III). The soil sample was contaminated with 5 mM of As (III) and two days later, 20 tomato seeds were planted in the flask and inoculated with bacteria resistant to metal (Mc250). The culture was previously prepared by growing in liquid LB to reach 1 O.D. and centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm. The pellet was resuspended in tap water and this solution was inoculated in the contaminated soil.

After 14 days of growth, the plants had the stem size, root, and germination rate measured.

RESULTS

Arsenic resistance assay

A total of 14 isolates were obtained from the collected samples. All of them were tested in different concentrations of arsenite varying from 0.5 to 10 mM; and arsenate varying from 1 to 1000 mM. Three isolates stood out because they resisted to elevated concentrations of both arsenic species investigated: Mc250 and Mc251 (10 mM As (III) and 800 mM As (V)), and Mc252 (5 mM As (III) and 800 mM As (V)), all associated with *Mimosa calodendron* rhizosphere. Before the selection of resistant isolates for the further tests, a PCR was performed with BOX primer in order to evaluate the genetic similarity of the isolates through band patterns analyses (Figure 2). As a result, Mc250 and Mc251 isolates had the same band pattern suggesting that they are the same microorganism. Thus, as their resistance capacity was the highest, in-depth studies were carried out with Mc250.

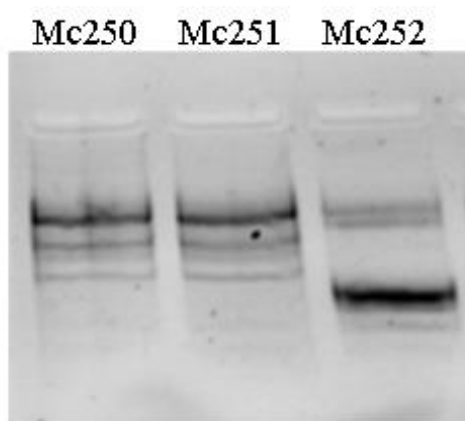


Figure 2: PCR with BOX primer using Mc250, Mc251, and Mc252 isolates. Mc250 and Mc251 isolates showed the same band pattern suggesting they are the same microorganism.

Identification of the resistant isolate Mc250

Using 16s rRNA sequencing, the arsenic resistant bacteria Mc250 was identified as belonging to *Alcaligenes faecalis* strain (GenBank accession number KY271067) with 99% identity with other bacteria of the same genera and specie.

Effect of arsenic on growth of *A. faecalis* strain Mc250

The isolate growth curve in the presence and absence of As (III) and As (V) is shown in Figure 3A. *A. faecalis* strain Mc250 exhibited a prolonged lag phase of 33 hours when compared to the control without As that presented a lag phase of 6 hours. Thus, it is likely that this differential growth rate reflects the protein expression patterns of *A. faecalis* strain Mc250 under stress caused by As. The minimum inhibitory concentration (MIC) for sodium arsenite was 12.5 mM in LB broth, where 99% of cellular growth inhibition for *A. faecalis* strain Mc250 was observed (Figure 3B).

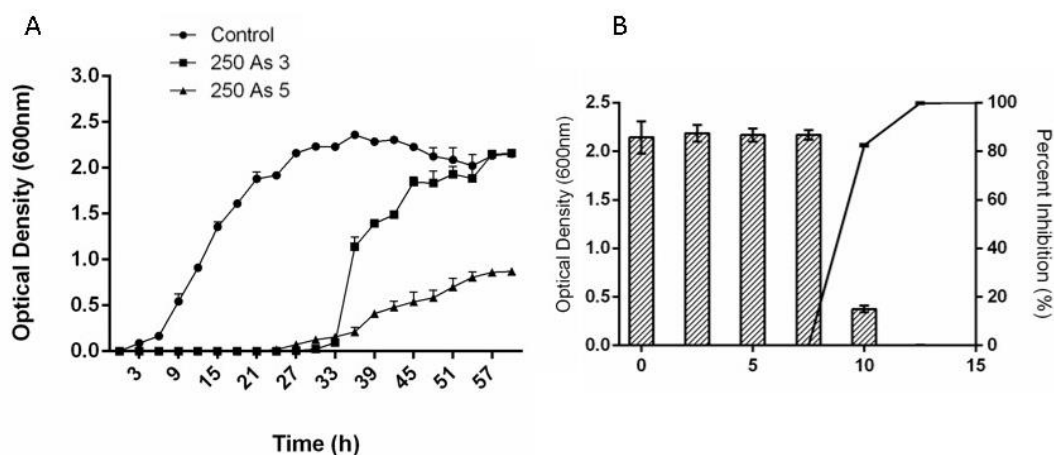


Figure 3: A) Growth curve of *A. faecalis* strain Mc250 in LB broth without As (circle), in LB broth with 10 mM of As (III) (square) and in LB broth with 800 mM of As (V) (triangle). B) Minimum inhibitory concentration (MIC) of As (III) (graph bar) and percentage of inhibition of *A. faecalis* strain Mc250 cells in different concentrations of As (III) (line graph).

As (III) and As (V) removal in culture media

The atomic spectrometer detected a reduction of approximately 55% of As (III) in a 10 mM solution, and a removal of approximately 72% of As (V) in a 500 mM solution in the presence of the isolate Mc250 (Table 1).

Table 1 Removal values of As (III) and As (V) in the presence of *A. faecalis* strain Mc250.

[As(III)] mg/L	[As(V)] mg/L
----------------	--------------

Initial	689.2	55,100.0
Final	380.4	39,500.0
% removal	55%	72%

Changes in cell morphology

The scanning electron microscopy (SEM) of *A. faecalis* strain Mc250 cells without (control) and with exposure to As (III) and As (V) are shown in Figure 4A-C, respectively. SEM analysis of the arsenic treated and untreated cells displayed distinct changes in cell size. The effect of arsenic was visible through increase in cell volume. This remarkable increase in cell volume may be interpreted as a possible strategy of the cell to improve the accumulation of arsenic from the surrounding environment in order to minimize its toxicity. However, in both situations cells were flat and showed intact surfaces. The energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) revealed the presence of As (III) and As (V) adsorbed on the membrane of this isolate.

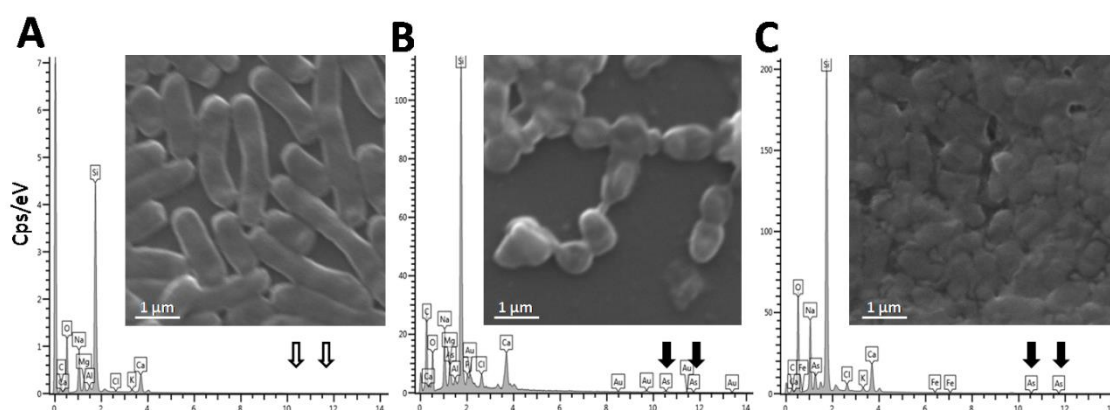


Figure 4 Scanning electron microscopy (SEM) of *A. faecalis* strain Mc250 cells without As (control) (A) and with exposure to As (III) (B) and As (V) (C) with respective EDS.

Effect of *A. faecalis* strain Mc250 in tomato growth in As-contaminated soil

Tomato growth curve in the presence of As (III) revealed 5 mM as a limit concentration for a satisfactory growth. Although there was no statistical significance through One-way ANOVA Dunnet test analysis, a relevant visual growth improvement was detected as shown in Figure 5AB. Moreover, the presence of *A. faecalis* strain Mc250 in soil

contaminated with this As (III) concentration demonstrated an improvement in the germination rate (15%), and stem size (10%). These differences are demonstrated in the graphic and in Figure 5CD with the phenotype reversion.

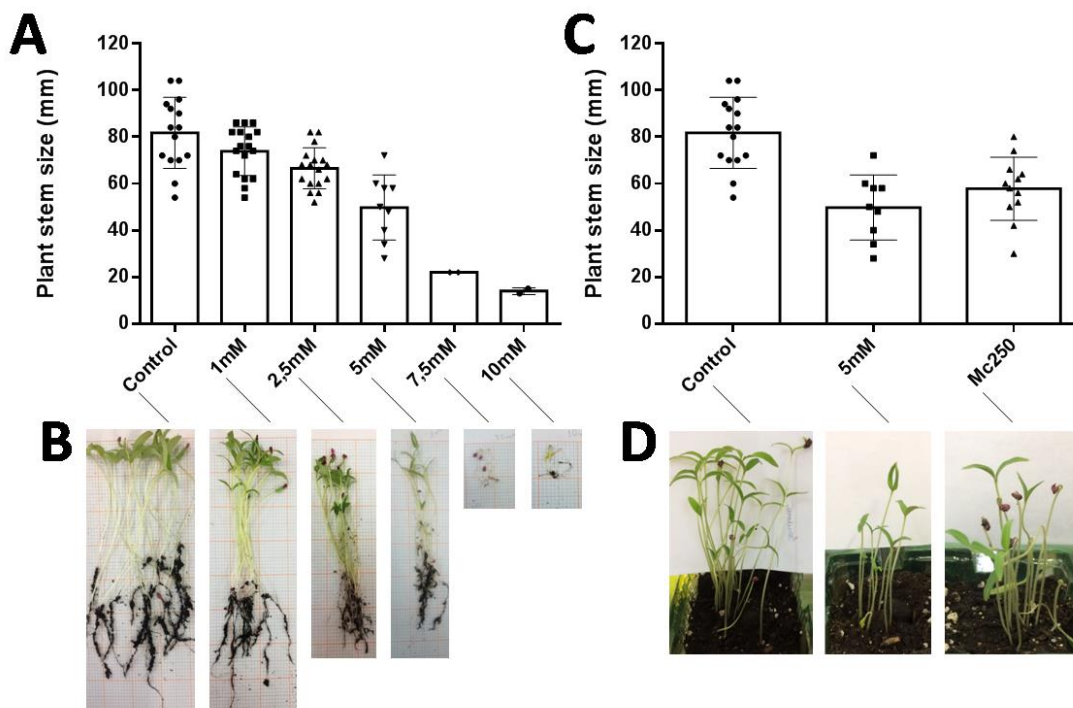


Figure 5: A) Growth curve of tomato plants treated with 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, and 10 mM of As (III) and untreated control. B) Tomato plants treated with As on each respective concentration. C) Growth curve of tomato plants in As-contaminated soil with 5 mM of As (III) without the isolate, in the presence of *A. faecalis* strain Mc250, and untreated control. D) Tomato plants in the respective conditions of "C".

DISCUSSION

Bacteria as metal bioremediator agents and plant supporters

The lack of heavy metals/trace elements or their excess affect plant growth. High levels are toxic for any organism due to blockage of biological functions or modification of essential protein structures (Tak *et al.*, 2013). On the other hand, in small amounts, some heavy metals are essential for plant development and the absence of them induce the reduction of the growth rate (Tak *et al.*, 2013).

Arsenic is a heavy metal extremely toxic to living organisms and its mechanisms of toxicity in plants is well known. Both the inorganic arsenic species (i.e. III and V) operate differently when absorbed by plants; however, they affect directly the growth of aerial parts, roots, and fruit production (Garg and Singla, 2011). As (V) competes with inorganic phosphate (Pi) by binding its transport system (Pst) present in cellular membranes (Wu *et al.*, 2011). Thus, interferes irreversibly in plant metabolism by acting directly on reactions that involve Pi, such as cellular metabolism, DNA metabolism, and cell signaling (Finnegan and Chen, 2012). As (III) penetrates plant tissues by aquaporins (Ma *et al.*, 2008), and once in contact with plant tissues it interferes in protein folding due to its ability to bind to sulfhydryl groups (Ramadan *et al.*, 2007). In both cases, the higher the heavy metals concentration, the higher the production of reactive species.

Plants have developed a sophisticated repertoire of molecular mechanisms to reduce damages caused by these metals. Some species are able to accumulate (hyperaccumulators), degrade, eliminate, translocate metals into their biomass, create a region surrounding the roots where the metal is precipitated and stabilized, or even convert metals into volatile compounds or less toxic forms (Lasat, 2002). In contrast, the survival of non-phytoaccumulator plants in metal-rich environments is improved by the presence of a specialized microbial community (Seth *et al.*, 2007). In addition to protect plants from toxic effects, these communities often facilitate nutritional uptake by enhancing plant growth (Tak *et al.*, 2013). It has been demonstrated that As-resistant bacteria associated with *Pteris vittata*, a hyperaccumulator plant occurring on IQ that improve plant growth and help in metal removal (Han *et al.*, 2016).

This study described for the first time the presence of As-resistant bacteria associated with roots and rhizosphere of *Mimosa calodendron*, an endemic and crucial species to positive interactions on FRG (Figure 1). One of the bacteria identified, belonging to the genus *Alcaligenes*, was analyzed for its potential in arsenic removal from As-contaminated environments as this isolate presented resistance to high As concentrations when compared to those already described in the literature (Kruger *et al.*, 2013). Besides the resistance to such high concentrations, *A. faecalis* strain Mc250 has the *in vitro* capacity to remove respectively 55% and 72% of As (III) and As (V) in solution (Table 1). It is noteworthy that these assays were performed with much higher As concentrations than those found in natural environment (Vicq *et al.*, 2015). Thus, its bioremediation potential might present better efficiency in natural conditions.

A morphological study through scanning electron microscopy (SEM) of *A. faecalis* strain Mc250 revealed that when treated with As (III) and As (V) they modified from rod-shaped to rounded shape (Figure 4). This morphology modification indicates metal accumulation and results from changes in the osmotic potential and cell turgor (Pandey and Bhatt, 2015). EDS analysis of *A. faecalis* strain Mc250 revealed that As was also adsorbed to the membrane (Figure 4). Similar data has been described by (Pandey and Bhatt, 2015) who showed increase in the area of one isolate as a positive response to As (V)-contaminated environment. The bioaccumulation of the isolated was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) and EDX.

According to the hypothesis that this isolate could aid in plant growth in As-contaminated soil, tomato plants were used as a model since its growth rate is higher than FRG native plants. Tomato growth curve for different concentrations of As (III) was established (Figure 5A) in order to determine in which concentrations these assays would be performed. The results demonstrated that in 5 mM not only the seeds germination was broken off, but there were also significant reduction in plant growth. In addition, while only 9 out of 20 seeds (45%) germinated in As-contaminated soil and in the absence of *A. faecalis* strain Mc250, 12 out of 20 seeds (60%) germinated in soil contaminated in the presence of this isolate. Moreover, the growth rate of tomato plants in the presence of *A. faecalis* strain Mc250 was higher than in the absence of this isolate. In fact, heavy metals resistant bacteria can minimize toxicity by acting as plant growth promoters (Mallick *et al.*, 2015).

PGPR and plant maintenance in FRG: perspectives

Environments with high metal concentration in soils as occur in FRG are very restrictive to the establishment of species (Jacobi *et al.*, 2007) in view of the fact that it establishes a selective pressure which influences plant communities (Shure *et al.*, 2007). According to (Silveira *et al.*, 2016), and following the guidelines established by (Hopper, 2009), FRG presents the five characteristics necessary to be considered an Old Climatelly-Buffered Infertile Landscapes (OCBILs). According to the authors, the characteristics 4 and 5, which correspond respectively to nutritional and other biological specializations for resource acquisition and high vulnerability to soil removal, may also be justified by the presence of a specific and specialized microbiota. It is known that PGPR as well as other microorganisms associated with plants such as mycorrhizae play

a key role in the adaptation of plants to these environments (Carvalho *et al.*, 2012). Since the ecological diversity of a community can be determined by ecological and evolutionary processes (Heijden *et al.*, 2008), plant-bacteria interaction may be assumed as a mutualistic association originated from these processes that have occurred over generations and allowed colonization of metal-contaminated environments by plants. The results obtained in this study suggest that habitats colonized by plants in FRG soils is attributed not only to morphological adaptations of species (Alves and Kolbek, 1994), but also to molecular adaptations generated from interactions with bacteria, as observed in a set of studies from different authors (Glick, 2010).

Considering that iron-rich environments are usually habitat to rare flora characterized by high percentages of species with restricted geographical distribution (Silveira *et al.*, 2016), it is possible that they are deeply associated with complex and restrictive coevolutionary processes (Grime, 1977). In this context, plants provide organic molecules originated from its metabolism for bacteria and other microorganisms, which in turn minimizes the potential damage that could be induced by metal and other soil components (or their deficiency, as in the case of P) to plant tissues. This is a possible explanation for the extreme plant vulnerability due to soil removal and consequently elimination of specialized microbiota associated with it.

Some authors describe the restoration of degraded areas in rupestrian grassland as a challenging process (Lambers *et al.*, 2010). This is reiterated by some promising empirical attempts that, notwithstanding, still have low success (Stradic *et al.*, 2015). According to the importance of microorganisms in the association between soil and plants, it is possible that this low success results from changes in the composition of the soil microbiota or its association with plant roots, which reduce the adaptive potential, as observed in other studies (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2011). Thus, the restoration studies should be complemented by studies of soil microbial ecology maintenance.

Silveira *et al.* (2016) recently reported that despite the increase in the last two decades in the number of indexed scientific articles on FRG and related topics, they are still incipient and polarized in some areas of scientific knowledge, which explain the neglected study of one of the most biologically diverse and endangered ecosystems of the world. This is even more noticeable in studies related to microorganisms associated with this environment. This study, therefore, provides a wide range of opportunities to understand the real role of microorganisms associated with soil and plants of FRG, allowing the discovery of new microorganisms (due to the high number of endemic

plants in this region and its geological and evolutionary origin), as well as metabolic pathways, genes, and metabolites with wide ecological and biotechnological interest. In this case, products and processes that could be conjectured as ecosystem services, also neglected, could be used as scientifically-based conservation strategies to support proposals for the conservation of ferruginous fields.

CONCLUSIONS

The results presented in this study demonstrate for the first time the potential of bacteria associated with roots and rhizosphere of endemic plants from FRG as soil bioremediator agents (Figure 6). Although it is a preliminary proposal, it provides not only a great opportunity for new investigations that may assist in understanding the adaptation of metallophyte plants, but also signals the biotechnological potential of microorganisms in a neglected environment in systematics and in-depth scientific studies. Taking other models of plant-bacteria interaction in hostile environments as reference, it is possible to infer that the PGPR in rupestrian grassland also develop a key role in the system ecology allowing survival and maintenance of plant species from this environment. Thus, the acquisition of more isolates from a larger number of plants in this region is required for complementary scientific contributions about the microbiota from FRG.

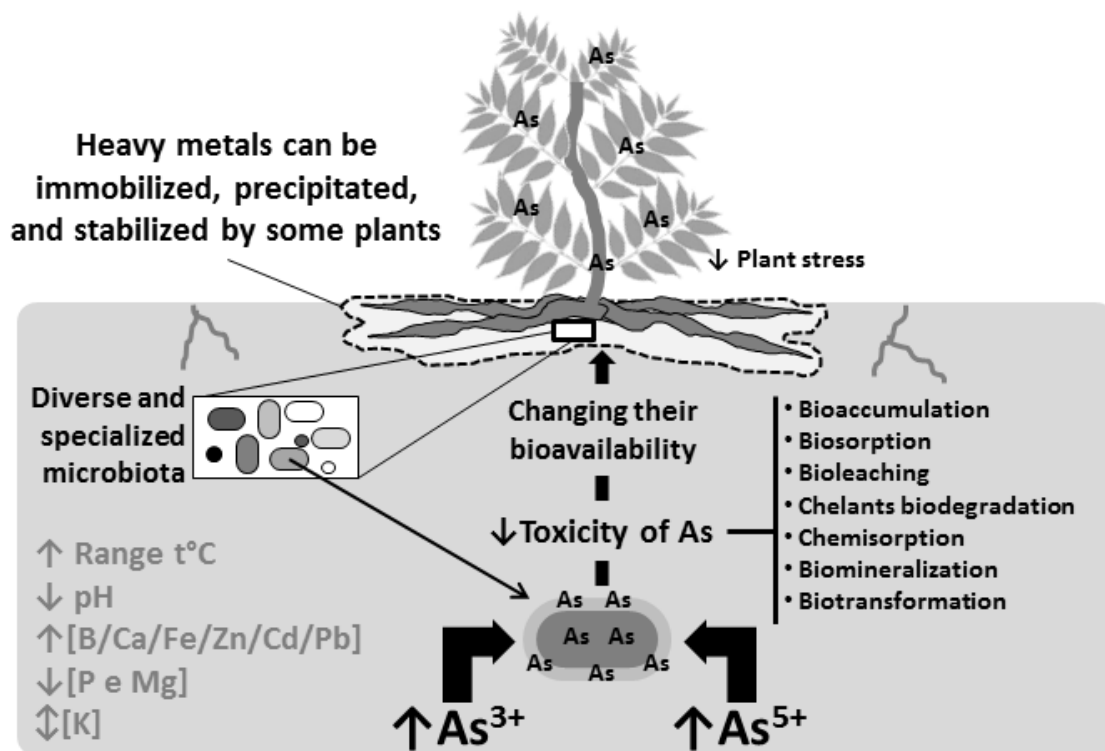


Figure 6 FRG are very restrictive to establishment of species due to great temperature variation, low pH, soils with reduced availability of water and nutrients, low concentrations of phosphorous and magnesium, but high levels of metals such as iron and manganese, and anomalous concentrations of many different trace elements such as Zn, Pb, Ni, Cr, and As. In order to reduce damage caused by these metals, some plants have developed molecular mechanisms to deal with such conditions. They can accumulate (hyperaccumulators), degrade, eliminate, translocate metals into their biomass, create a region surrounding the roots where the metal is precipitated and stabilized, or even convert metals into volatile compounds or less toxic forms. Furthermore, a specialized microbial community could modify metal bioavailability assisting hyperaccumulator and non-phytoaccumulator plants through different processes such as bioaccumulation, biosorption, bioleaching, chelants biodegradation, chemisorption, biomineralization, and biotransformation. These bacteria associated with endemic plants from FRG-IQ may benefit adaptive process facilitating the maintenance of this species in extreme environments. Thereby, to protect plants from toxic effects, these communities often facilitate nutritional uptake by enhancing plant growth.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the staff of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology (LBBM, Federal University of Ouro Preto, UFOP) for their support. Ney Sampaio and NanoLab of *Centro Mínero-Metalúrgico da Rede Temática em Engenharia de Materiais* (CMM-REDEMAT) are thanked for spectroscopy and

microscopy analyses, respectively. Funding for this work was provided by the following agencies: *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES). Thanks to Prof. João Carlos Setubal (IQ-USP) for the help with assembly and identification of the sequence deposited at Genbank.

COMPETING INTERESTS

The authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17), 3389-3402.
- Alves, R.J.V., and Kolbek, J. 1994. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio*, 125-139.
- Carmo, F.F., and Jacobi, C.M. 2012. "Vascular plants on cangas," in *Floristic Diversity of the Quadrilátero Ferrífero Cangas*, eds. C.M. Jacobi & F.F. Carmo. (Belo Horizonte: IDM Ltda), 43-50.
- Carmo, F.F., and Jacobi, C.M. 2016. Diversity and plant trait-soil relationships among rock outcrops in the Brazilian Atlantic rainforest. *Plant and Soil* 403(1-2), 7-20.
- Carvalho, F., Souza, F.A., Carrenho, R., Moreira, F.M.d.S., Jesus, E.d.C., and Fernandes, G.W. 2012. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 52, 9-19.
- Dayrell, R.L.C., Gonçalves-Alvim, S.J., Negreiros, D., Fernandes, G.W., and Silveira, F.A.O. 2015. Environmental control of seed dormancy and germination of *Mimosa calodendron* (Fabaceae): implications for ecological restoration of a highly threatened environment. *Brazilian Journal of Botany* 38(2), 395-399.
- Finnegan, P.M., and Chen, W. 2012. Arsenic toxicity : the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology* 3(June), 1-18.
- Focardi, S., Pepi, M., Ruta, M., Marvasi, M., Bernardini, E., Gasperini, S., *et al.* 2010. Arsenic precipitation by an anaerobic arsenic-respiring bacterial strain isolated from the polluted sediments of Orbetello Lagoon, Italy. *Letters in Applied Microbiology* 51(5), 578-585. 10.1111/j.1472-765X.2010.02938.x.
- Garg, N., and Singla, P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants : physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ Chem Lett* 9, 303-321.
- Ginocchio, R., and Baker, A.J.M. 2004. Metallophytes in Latin America: A remarkable biological and genetic resource scarcely known and studied in the region. *Revista Chilena de Historia Natural* 77(1), 185-194.
- Glick, B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28(3), 367-374.

- Grime, J.P. 1977. Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *The American Naturalist* 111(982), 1169-1194.
- Han, Y.-h., Fu, J.-w., Chen, Y., Rathinasabapathi, B., and Ma, L.Q. 2016. Arsenic uptake , arsenite efflux and plant growth in hyperaccumulator *Pteris vittata* : Role of arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere* 144, 1937-1942.
- Heijden, M.G.A.v.d., Bardgett, R.D., and Straalen, N.M.v. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11(3), 296-310.
- Hopper, S.D. 2009. OCBIL theory: Towards an integrated understanding of the evolution, ecology and conservation of biodiversity on old, climatically buffered, infertile landscapes. *Plant and Soil* 322(1), 49-86.
- Jacobi, C.M., Carmo, F.F., Vincent, R.C., and Stehmann, J.R. 2007. Plant communities on ironstone outcrops : a diverse and endangered Brazilian ecosystem 1 C. *Biodivers Conserv* 16, 2185-2200.
- Kruger, M.C., Bertin, P.N., Heipieper, H.J., and Arsène-Ploetze, F. 2013. Bacterial metabolism of environmental arsenic - Mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(9), 3827-3841.
- Lambers, H., Brundrett, M.C., Raven, J.A., and Hopper, S.D. 2010. Plant mineral nutrition in ancient landscapes : high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. *Plant Soil* 334, 11-31.
- Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of environmental quality* 31(1), 109-120.
- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.-y., Su, Y.-h., McGrath, S.P., *et al.* 2008. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS* 105(29), 9931-9935.
- Mallick, I., Islam, E., and Mukherjee, S.K. 2015. Fundamentals and Application Potential of Arsenic-Resistant Bacteria for Bioremediation in Rhizosphere: A Review. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 24(6), 704-718.
- Matias, S.R., Pagano, M.C., Muzzi, F.C., Oliveira, C.A., Carneiro, A.A., Horta, S.N., *et al.* 2009. Effect of rhizobia , mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil q. *European Journal of Soil Biology* 45, 259-266.
- Pandey, N., and Bhatt, R. 2015. Arsenic resistance and accumulation by two bacteria isolated from a natural arsenic contaminated site. *Journal of Basic Microbiology* 55, 1275-1286.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., Del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., *et al.* 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169(5-6), 325-336.
- Ramadan, D., Cline, D.J., Bai, S., Thorpe, C., and Schneider, J.P. 2007. Effects of As (III) Binding on -Hairpin Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2981-2988.
- Rodriguez, R.J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., *et al.* 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J* 2(4), 404-416. 10.1038/ismej.2007.106.

- Salgado, A.A.R., and Carmo, F.F. 2015. "Quadrilátero Ferrífero: A Beautiful and Neglected Landscape Between the Gold and Iron Ore Reservoirs," in *Landscapes and Landforms of Brazil.*, eds. B.C. Vieira, A.A.R. Salgado & L. Santas. (London: Springer), 319-330.
- Sánchez-Cañizares, C., Rey, L., Durán, D., Temprano, F., Sánchez-Jiménez, P., Navarro, A., *et al.* 2011. Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology* 34(3), 207-215.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., and Glick, B.R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183, 92-99.
- Seth, C.S., Chaturvedi, P.K., and Misra, V. 2007. Toxic Effect of Arsenate and Cadmium Alone and in Combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in Response to its Accumulation. *Environmental toxicology* 22(6), 539-549.
- Shure, D.J., Ragsdale, H.L., and Sep, N. 2007. Patterns of Primary Succession on Granite Outcrop Surfaces. *Ecology* 58(5), 993-1006.
- Silveira, F.A.O., Negreiros, D., Barbosa, N.P.U., Buisson, E., and Carmo, F.F. 2016. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre : a neglected conservation priority. *Plant and Soil* 403, 129-152.
- Stradic, S.L.E., Silveira, F.A.O., Buisson, E., Cazelles, K., Carvalho, V., Fernandes, G.W., *et al.* 2015. Diversity of germination strategies and seed dormancy in herbaceous species of campo rupestre grasslands. 2, 537-546.
- Tak, H.I., Ahmad, F., and Babalola, O.O. 2013. "Advances in the Application of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Phytoremediation of Heavy Metals.", 33-53.
- Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., *et al.* 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol* 25(4), 158-165. 10.1016/j.tibtech.2007.02.003.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19(24), 6823-6831.
- Vicq, R., Matschullat, J., Leite, M.G.P., Nalini Jr, H.A., and Mendonça, F.P.C. 2015. Iron Quadrangle stream sediments , Brazil : geochemical maps and reference values. *Environ Earth Sci* 74, 4407-4417.
- Vincent, R.D.C., and Meguro, M. 2008. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 31(3), 377-388. 10.1590/s0100-84042008000300002.
- Whiting, S.N., Reeves, R.D., Richards, D., Johnson, M.S., Cooke, J.A., Malaisse, F., *et al.* 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology* 12(1), 106-116.
- Wu, Z., Ren, H., McGrath, S.P., Wu, P., and Zhao, F.-j. 2011. Investigating the Contribution of the Phosphate Transport Pathway to Arsenic Accumulation in Rice 1 [W]. *Plant Physiology* 157, 498-508.

6- Capítulo IV: Genômica funcional e comparativa de *Alcaligenes faecalis* strain Mc250

Título: Genome analysis of *Alcaligenes faecalis* strain Mc250: A rhizobacteria adapted to the ferruginous rupestrian fields

Érica Barbosa Felestrino, Renata de Almeida Barbosa Assis, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes, Isabella Ferreira Cordeiro, Natasha Peixoto Fonseca, Morghana Marina Villa, Izadora Tabuso Vieira, Luciana Hiromi Yoshino Kamino, Flávio Fonseca do Carmo, Camila Carrião, João Carlos Setubal, Nalvo Almeida Junior e Leandro Marcio Moreira.

Este trabalho teve como objetivo central sequenciar o genoma de *Alcaligenes faecalis* Mc250, isolada da planta endêmica *Mimosa calodendrum*, e realizar uma análise funcional e comparativa com outros genomas do mesmo gênero obtidos no banco de dados do NCBI. Nas análises funcionais foi possível encontrar genes envolvidos na produção de sideróforo, dados comprovados empiricamente. Foram também encontrados genes relacionados a resistência a arsênio, corroborando os dados obtidos em ensaios descritos no trabalho anterior. Assim como o sideróforo e o arsênio, vários genes que justificam a adaptação desse indivíduo em seu ambiente, como genes ligados a degradação de compostos fenólicos, vias do ciclo do nitrogênio, da obtenção de fosfato e *quorum sensing* foram encontrados. Tais análises demonstram que *Alcaligenes faecalis* Mc250 é uma espécie bem adaptada às relações com *Mimosa calodendrum* e aos solos dos campos rupestres ferruginosos.

Este artigo está em vias de finalização para submissão.

GENOME ANALYSIS OF *ALCALIGENES FAECALIS* STRAIN MC250: A RHIZOBACTERIA ADAPTED TO THE FERRUGINOUS RUPESTRIAN FIELDS

Érica Barbosa Felestrino¹, Renata de Almeida Barbosa Assis¹, Camila Gracyelle de Carvalho Lemes¹, Isabella Ferreira Cordeiro², Natasha Peixoto Fonseca¹, Morghana Marina Villa³, Izadora Tabuso Vieira³, Luciana Hiromi Yoshino Kamino⁴, Flávio Fonseca do Carmo⁴, Camila Carrião^{1,5}, João Carlos Setubal⁶, Nalvo Almeida Junior⁷ and Leandro Marcio Moreira^{1,5#}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. ³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular,

Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil. ⁴Instituto Prístino, Belo Horizonte, MG, Brasil. ⁵Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, *Campus* Morro do

Cruzeiro, Ouro Preto, MG, Brasil. ⁶Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

⁷Faculdade de Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

#Corresponding author:

LMM mailing address: Departamento de Ciências Biológicas (DECBI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil. Zip Code 35400-000. Phone: +55 (31) 3559-1698, FAX: +55 (31) 3559-1672, e-mail lmmorei@gmail.com

Running Title

A.faecalis strain Mc250 genome analysis

ABSTRACT

Alcaligenes sp são bactérias gram-negativas, aeróbicas, geralmente encontradas em solo, água, estações de tratamento de águas residuárias e associadas a plantas. Muitas bactérias desse gênero já foram descritas como promotoras de crescimento vegetal, biocontroladora de patógenos de plantas e biorremediadoras de solos contaminados. O objetivo deste trabalho foi analisar funcional e de forma comparativa o genoma de *Alcaligenes faecalis* Mc250, isolada da planta endêmica de campos rupestres ferruginosos *Mimosa calodendrum*. Para as análises comparativas outros quatro genomas pertencentes ao gênero *Alcaligenes* foram utilizados, sendo apenas um deles completo (ZD02), além de um grupo externo. Na análise funcional de *Alcaligenes faecalis* Mc250, não foram encontrados genes associados com produção de auxina, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato, sendo esses resultados confirmados por ensaios experimentais. Apesar disso, foram encontradas vias completas associadas com internalização e metabolismo de fosfato e de desnitrificação. Características genéticas de biocontrole podem justificar esse potencial como a capacidade de degradar uma extensa variedade de compostos fenólicos, produzir ácido cianídrico e sintetizar sideróforo. Essas duas últimas potencialidades encontradas no genoma também foram comprovadas nos testes bioquímicos. Análises específicas para produção de sideróforo demonstrou a capacidade de síntese de enterobactina. A análise genômica comparativa com outras estirpes relacionadas revelou que esse potencial é compartilhado entre as bactérias analisadas, possivelmente uma característica do gênero. Por último, a capacidade de resistir a altas concentrações de arsênio, revelada em trabalho anterior, foi confirmada pela presença de genes de resistência a esse metal. Comparando com os outros genomas estudados, as *Alcaligenes* resistem e reduzem arsenato a arsenito, diferentemente da *Achromobacter* utilizada como grupo externo que além dessas, possui vias de oxidação de arsenito. Finalmente, este estudo fornece uma base para futuras investigações genéticas desta bactéria e suas interações moleculares com a planta, além de ser um alvo para aplicações biotecnológicas.

INTRODUCTION

Com o aumento da demanda por produtos mais eficientes e menos agressivos ao ambiente, biofertilizantes, biocontroladores e biorremediadores de solos contaminados são importantes alternativas para agricultura (Sahoo, *et al.*, 2014). Os biofertilizantes são considerados componentes da gestão integrada de nutrientes, sendo compostos por microrganismos que aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas e interagem com a rizosfera quando aplicado em contato com sementes ou diretamente no solo (Raja, 2013). Estes microrganismos mantêm o solo rico em micro e macronutrientes por meio da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e potássio, liberação de fitormônios reguladores do crescimento vegetal, além de biodegradarem a matéria orgânica do solo (Bulgarelli, *et al.*, 2013). As bactérias biocontroladoras por sua vez, auxiliam na contenção de insetos e doenças causadas por agentes patogênicos, especialmente bactérias e nematóides. Nesse caso, os microrganismos detêm mecanismos indiretos de promoção de crescimento relacionados principalmente à supressão de patógenos por exclusão e antagonismo (Bulgarelli, *et al.*, 2013). Por fim, existem as bactérias biocontroladoras que removem, neutralizam ou desintoxicam poluentes do ambiente contaminado (Weyens *et al.*, 2015). No caso de contaminantes orgânicos, as bactérias geralmente conseguem degradá-los em produtos não tóxicos, utilizando-os como uma fonte alternativa de carbono. Já no caso de contaminantes inorgânicos metálicos, os microrganismos desenvolveram três mecanismos de resistência: o efluxo dos metais da célula mediado por transportadores, transformação dos metais em formas não tóxicas ou menos tóxicas e biossorção.

Bactérias do gênero *Alcaligenes* são comumente encontradas em solo, água, estações de tratamento de águas residuárias e associadas a plantas, embora os mecanismos de adaptação e colonização da filosfera, rizosfera e solo de plantas permaneça pouco conhecido (Nakano *et al.*, 2014). São caracterizadas como aeróbias gram-negativas, embora algumas estirpes sejam capazes de sobreviverem em condições anaeróbias na presença de nitrato ou nitrito. Por essa razão, bactérias desse gênero possuem amplas aplicações no tratamento de esgoto (Nakano *et al.*, 2014). Alguns isolados de *A. faecalis* produzem enzimas que degradam contaminantes orgânicos e podem ser aplicadas na biodegradação de poluentes e xenobióticos (Kong *et al.*, 2014). Além do potencial de degradação de compostos orgânicos, *A. faecalis* já foi descrita como capaz de neutralizar ambientes contaminados com arsênio (Phung *et al.*, 2012), de

produzir uma variedade de compostos promotores de crescimento vegetal e de atuarem como bicontroladoras de patógenos de plantas (Yokoyama *et al.*, 2013)

Partindo do conhecimento sobre o potencial biotecnológico de bactérias do gênero, o objetivo deste trabalho foi estudar o genoma de *Alcaligenes faecalis* MC250, isolada da rizosfera de *Mimosa calodendrum*, planta endêmica encontrada na Serra da Moeda, Quadrilátero Ferrífero. Características geomorfológicas peculiares dos campos rupestres ferruginosos possivelmente modularam a microbiota ali existente. Outro possível fator modulador seria a relação dessa bactéria com uma planta endêmica restrita, ou seja, a diversidade do microbioma associado a plantas tem estrita relação com a diversidade vegetal. Neste contexto, a análise genômica de *Alcaligenes faecalis* MC250 busca explicar suas relações ecológicas com o ambiente e com a planta, bem como avaliar seu potencial biotecnológico quanto a capacidade de promover o crescimento vegetal, controlar fitopatógenos e biorremediar ambientes contaminados.

MÉTODOS

Sequenciamento Genômico, Montagem e Anotação

A estipe de *Alcaligenes faecalis* Mc250 foi isolada da planta endêmica *Mimosa calodendrum*, descrita com detalhes no capítulo anterior. A bactéria foi cultivada em meio Luria Bertani para posterior extração de DNA utilizando o Kit *Wizard Genomic DNA purification* (Promega) de acordo com especificações do fabricante. A biblioteca foi construída e sequenciada usando a plataforma Illumina MiSeq, com tamanho médio da biblioteca de 732pb com o total de 5.867.947 *reads* identificados. As análises foram executadas utilizando *SSPACE Premium scaffolder* versão 2.0 (Boetzer *et al.*, 2011) e os *gaps* dentro dos *scaffolds* foram fechados automaticamente com o *GapFiller* (Boetzer e Pirovano, 2012). As montagens *de novo* das sequências foram realizadas por *CLC Genomics Workbench 7* (<http://www.clcbio.com>). O genoma foi anotado através do pipeline JGI (Markowitz *et al.*, 2014) e todas as consultas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) foram realizadas pelo JGI (Mavromatis *et al.*, 2009). Para cada gene codificador de proteína, o nome do gene e a descrição do produto foi anotada baseada nos genes homólogos identificados pelo OrthoMCL (Li *et al.*, 2003) definindo como parâmetros as especificações de BlastP (Camacho *et al.*, 2009).

Comparação genômica e análise filogenética

Os dados gerados do genoma de *Alcaligenes faecalis* Mc250, juntamente com outros cinco genomas adquiridos no NCBI (quatro do mesmo gênero e um grupo externo), foram depositados na ferramenta *Orthologsorter* disponível em um domínio de acesso restrito (<http://jau.facom.ufms.br/alcaligenes/>) (Faria e Almeida, 2013). Esta plataforma foi desenvolvida especificamente para esses indivíduos e permite realizar comparações entre os genomas anotados (Figura 1). Isto possibilita analisar a presença ou ausência de cada família de proteína entre os seis genomas (incluindo *Alcaligenes faecalis* Mc250) e consequentemente identificar famílias de proteínas exclusivas, flexíveis e conservadas que são compartilhadas por cada subconjunto de bactéria. Desta forma, o perfil filogenômico foi previsto com base nas famílias de proteínas conservadas entre as seis espécies analisadas. Os números de proteínas exclusivas, flexíveis e conservadas fornecidos por essa plataforma foram plotados em um diagrama

de Veen para ilustrar essa distribuição utilizando o programa *InteractiVenn* (Heberle *et al.*, 2015).

UFOP *Alcaligenes* Project

Show families

with at least one gene of this genome	without genes of this genome	with or without genes of this genome (doesn't matter)	exactly one gene of this genome	with specific limits	Min	Max	
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	0	4	Afaeca_UFOP
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	0	5	Afaeca_NBIB_017
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	0	5	Afaeca_phenolicus_DSM16503
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	0	3	Afaeca_phenolicus_IITR89
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	0	5	Afaeca_ZD02
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	0	36	Achro_arsenitoxydans_SY8
<input type="radio"/> check all	<input type="radio"/> check all	<input checked="" type="radio"/> check all (see all families)	<input type="radio"/> check all				

and keywords example: kinase,protease

Figura 1: Ferramenta *Orthologsorter* usada para identificação das famílias de proteínas. É possível selecionar as espécies e analisar as famílias de proteínas compartilhadas entre elas.

Características genômicas de *Alcaligenes faecalis* Mc250

Dentro do mesmo domínio restrito, foi inserido um servidor *Blast* que possibilita a busca interna de genes, proteínas e replicons de todas as seis espécies ou de cada uma separadamente. Essa função permitiu procurar genes e proteínas de interesse e assim fazer uma análise funcional, especialmente de *Alcaligenes faecalis* Mc250 (UFOP). Além dessa ferramenta exclusiva, outras de uso aberto foram utilizadas para auxiliar na análise funcional do genoma da estirpe Mc250 como o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa e Gto, 2000), o *Uniprot* (Uniprot Consortium, 2017) e o BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Ensaio *in vivo* para confirmar a análises *in silico*

Ensaio de produção de AIA

Para detectar a capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) foi utilizado o método colorimétrico adaptado de Bric *et al.* (1991), utilizando meio de cultura LB líquido enriquecido com 5mM de triptofano. Após 5 dias a 28°C, as células foram centrifugadas a 2000g e ao sobrenadante adicionado igual volume de solução Salkowski

(2mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,5M/L de H_2SO_4), permanecendo incubado por 30 min. A mudança de coloração de amarelo para rosa indica a produção do hormônio.

Ensaio de fixação de nitrogênio

Alcaligenes faecalis Mc250 foi incubada em meio de cultura Baz semissólido, livre de N_2 , por 14 dias a 28°C (Estrada, *et. al.*, 2001). A modificação da coloração do meio de amarelo para esverdeado indica a potencial capacidade de fixar nitrogênio.

Ensaio de solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada mediante uso do meio *National Botanical Research Institute's phosphate growth* (NBRIP) (Nautiyal, 1999), e após 4 dias de incubação a 28°C a formação de um halo transparente ao redor da colônia indica o potencial do isolado em solubilizar fosfato.

Ensaio de produção de sideróforos

A detecção da produção de sideróforo foi baseada no método de Schwyn e Neilands (1987). *A. faecalis* Mc250 foi crescida por 2 dias à 28° e a mudança de coloração de azul para amarelo indica a produção da molécula.

Ensaio de produção de ácido cianídrico

Este método foi adaptado de Bakker e SchipperS (1987). Meio LB líquido foi suplementado com 4,4g/L de glicina e 0,081g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. O isolado foi crescido a 28°C por 2 dias. Após este período, igual volume de uma solução de ácido pícrico 5% e NaCO_3 2% foi adicionado. A mudança de coloração de amarelo para marrom indica a produção de HCN.

Ensaio de inibição de fitopatógenos

Foi realizado teste de atividade antimicrobiana de Mc250 contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xac) patotipo A. Mc250 foi inoculada em placa de LB sólido na qual foi previamente feito um “tapete” de Xac. A formação de alo indica capacidade de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características genômicas

Um sumário das características dos genomas analisados está apresentado na Tabela 1. O genoma de *Alcaligenes faecalis* Mc250 foi sequenciado com qualidade de 80%, com o total de 3.278.030 pares de base e o conteúdo de CG bem próximo das outras *Alcaligenes* usadas como comparativa neste trabalho.

Tabela 1: Características dos genomas analisados.

ID	Strain	Status	Size (bp)	C+G	Protein -coding genes	Property	Ref.
UFOP (Mc250)	<i>Alcaligenes faecalis</i> _Mc250_Ufop	scaffold	3278030	57%	3,781	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	Este estudo
ZD2	<i>Alcaligenes faecalis</i> _ZD2	completo	4248680	57%	3,816	Nematodo	Ju <i>et al.</i> , 2015
NBIB_017	<i>Alcaligenes faecalis</i> _NBIB_017	scaffold	4.165480	56%	3,804	Solo de plantação de arroz	Liu <i>et al.</i> , 2016
DSM16503	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i> DSM 16503	scaffold	4248310	56%	3,916	Bioprocessador de águas residuais	Rehffus e Urban <i>et al.</i> , 2005
IITR89	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i> _IITR89	scaffold	3774060	58%	3,524	Rio Cauvery	Regar <i>et al.</i> , 2016
SY8	<i>Achromobacter arsenitoxydans</i> SY8	scaffold	6160000	66%	5,625	Solo contaminado com arsênio	Li <i>et al.</i> , 2012

Análises filogenéticas e diagrama de Venn

As árvores filogenéticas foram originadas automaticamente dentro da mesma ferramenta de uso restrito (<http://jau.facom.ufms.br/alcaligenes/>). Foram geradas duas árvores, sendo a primeira baseada nas famílias de proteínas conservadas identificadas pelos genomas no *Orthologsorter* a partir de 2.145 famílias de proteínas conservadas (Figura 2-A), e a segunda baseada no genoma completo (Figura 2-B). Para as duas entradas a distribuição das espécies permaneceu a mesma, o que fortalece a posição filogenética ocupada por *Alcaligenes faecalis* Mc250.

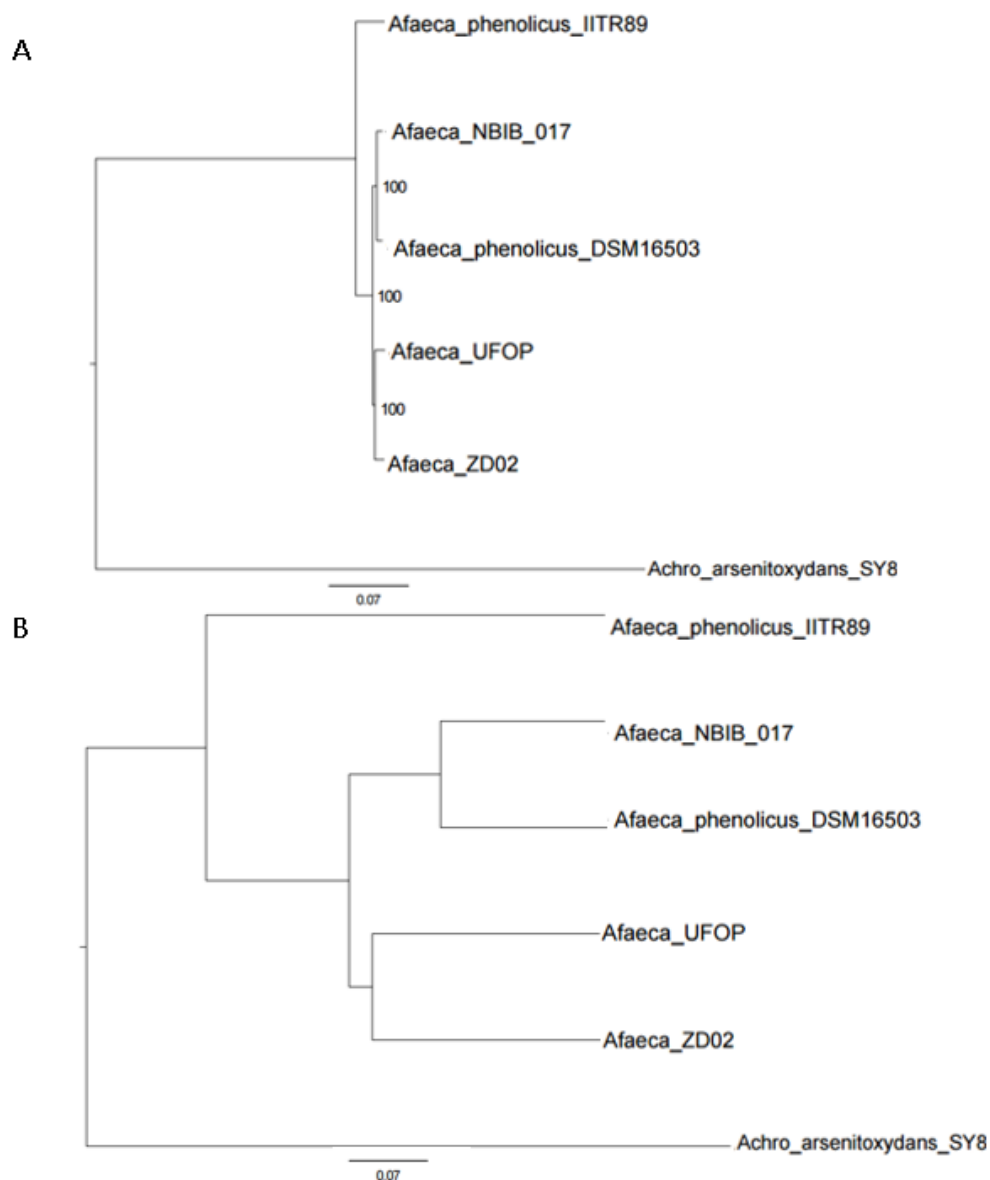


Figura 2: A- árvore filogenética baseada nas proteínas conservadas entre seis genomas analisados. B- Árvore filogenética dos seis genomas analisados baseada no genoma completo.

O diagrama de Venn apresenta todas as proteínas conservadas nas seis linhagens (*core*), as proteínas exclusivas de cada espécie (*singltons*) e todas as proteínas das possíveis combinações entre as seis espécies (*flexible*) (Figura 3). *Alcaligenes faecalis* Mc250 apresentou 199 genes exclusivos, sendo a maioria hipotéticos (sem função estabelecida). Dentro dos *singltons* foram encontradas duas proteínas antitoxinas e uma proteína relacionada a resistência a multidrogas. Essas proteínas estão diretamente relacionadas à resistência intrínseca e adquirida a antibióticos (Martinez *et al.*, 2009). Entretanto, já foi descrito que proteínas de resistência a multidrogas estão também relacionadas aos

processos de desintoxicação de metabólitos intracelulares como metais (Martinez *et al.*, 2009), o que condiz com o ambiente de origem dessa bactéria, solos com elevadas concentrações de metais como arsênio (Costa *et al.*, 2015).

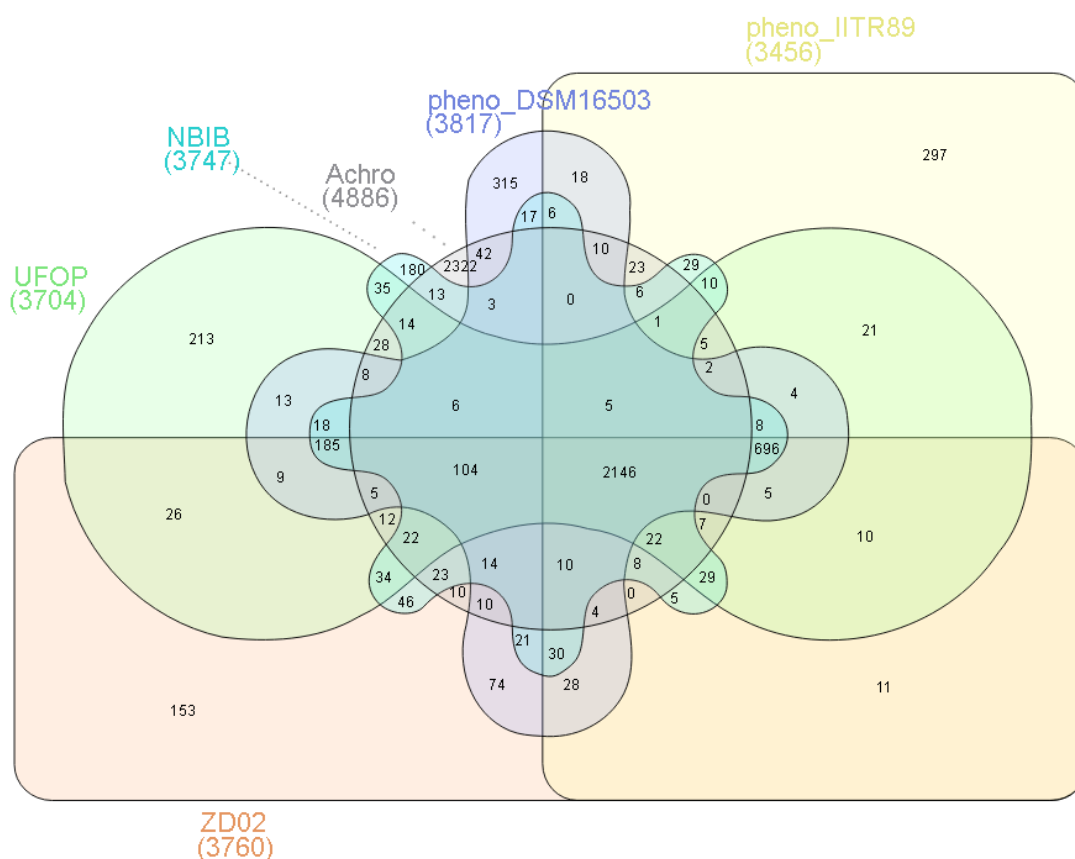


Figura 3: Diagrama de Venn representando as proteínas conservadas, flexíveis e exclusivas dos seis genomas analisados.

Análise funcional do genoma de *A. faecalis* Mc250 e ensaios bioquímicos

Arsênio

Em trabalho anterior (Capítulo 3), *Alcaligenes faecalis* Mc250 se mostrou resistente a altas concentrações de arsenito e arsenato. Com a finalidade de compreender essa resistência, buscas por genes relacionados foram feitas em seu genoma. Foram encontrados os genes *arsR* regulador do operon de arsênio, *arsB* que codifica proteína de membrana que bombeia o arsênio para fora da célula, *arsH* cuja proteína codificada está associada com a resposta ao estresse oxidativo causado pelo arsênio e *arsC* que codifica para uma arsenato redutase, que transforma arsenato em arsenito. Essa

configuração gênica confere a estirpe Mc250 a capacidade de resistir ao metal e bombeá-lo para fora da célula lhe protegendo da toxicidade. Embora pareça contraditório transformar arsenato, que é menos tóxico, em arsenito que é mais tóxico, especula-se que esses mecanismos tenham relação com a evolução quando, na atmosfera anóxica, quase nenhum arsenato estava presente (Rosen, 2002). Quando a atmosfera se tornou oxíca e o arsenato passou a ser mais abundante, acredita-se que as arsenato redutases tenham evoluído rapidamente a partir de fosfatases para complementar a via de resistência ao arsênio existente (Rosen, 2002).

Outro possível motivo de transformar arsenato em arsenito seria para posterior transformação em formas metiladas de arsênio (trimetilarsina-TMAs) que são voláteis e consequentemente detoxificam sua célula e o ambiente em que se encontra (Heipieper *et al.*, 2013). A reação começaria com arsenito, seguindo uma série de metilações oxidativas por S-adenosilmetionina metiltransferases e etapas redutoras com glutatona e outras contendo tiol para a formação do produto TMAs, que se acredita ser bastante inofensivo (Cullen e Bentley 2005). Foram encontrados alguns genes na estirpe Mc250, incluindo genes previamente anotados como hipotéticos, que poderiam corresponder a essa via. Esses dados necessitam de mais estudo, entretanto, eles justificaram o potencial removedor detectado por essa bactéria em trabalho anterior (Capítulo 3).

Além da análise funcional de *Alcaligenes faecalis* Mc250 para os genes de arsênio, uma análise comparativa relacionada a resistência dos seis genomas depositados foi realizada (figura 4). Os operons se repetiram para as três espécies mais próximas filogeneticamente: *Alcaligenes faecalis*_Ufop (Mc250), *Alcaligenes faecalis*_ZD2 e *Alcaligenes faecalis*_NBIB_017. A estirpe *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* DSM 16503 seguiu o mesmo padrão, mas com duplicação dos genes *arsR*, *arsH* e *arsB*. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus*_IITR89, mais distante das demais na filogenia, aparece com novos genes: *acr3*, que codifica para uma proteína de membrana que bombeia o arsênio para fora da célula e é homóloga ao *arsB*, o *arsA* que codifica para uma ATPase acoplada a *ArsB* que aumenta a resistência ao arsênio, e o *arsD* que codifica para uma chaperona que transfere o As e ativa o complexo AB. O grupo externo, *Achromobacter arsenitoxydans* SY8, foi isolado de solo altamente contaminado com arsênio e, por isso, extremamente adaptado a essa condição. Além das proteínas que as outras espécies possuem, também apresenta o operon de oxidação de arsênio *aiocABXSR* (Li *et al.*, 2012). Embora esse operon não tenha sido encontrado em

nenhuma das *Alcaligenes* analisadas, já foi descrito sua existência em outras *Alcaligenes* (Elias *et al.*,2001; Phung *et al.*, 2012).

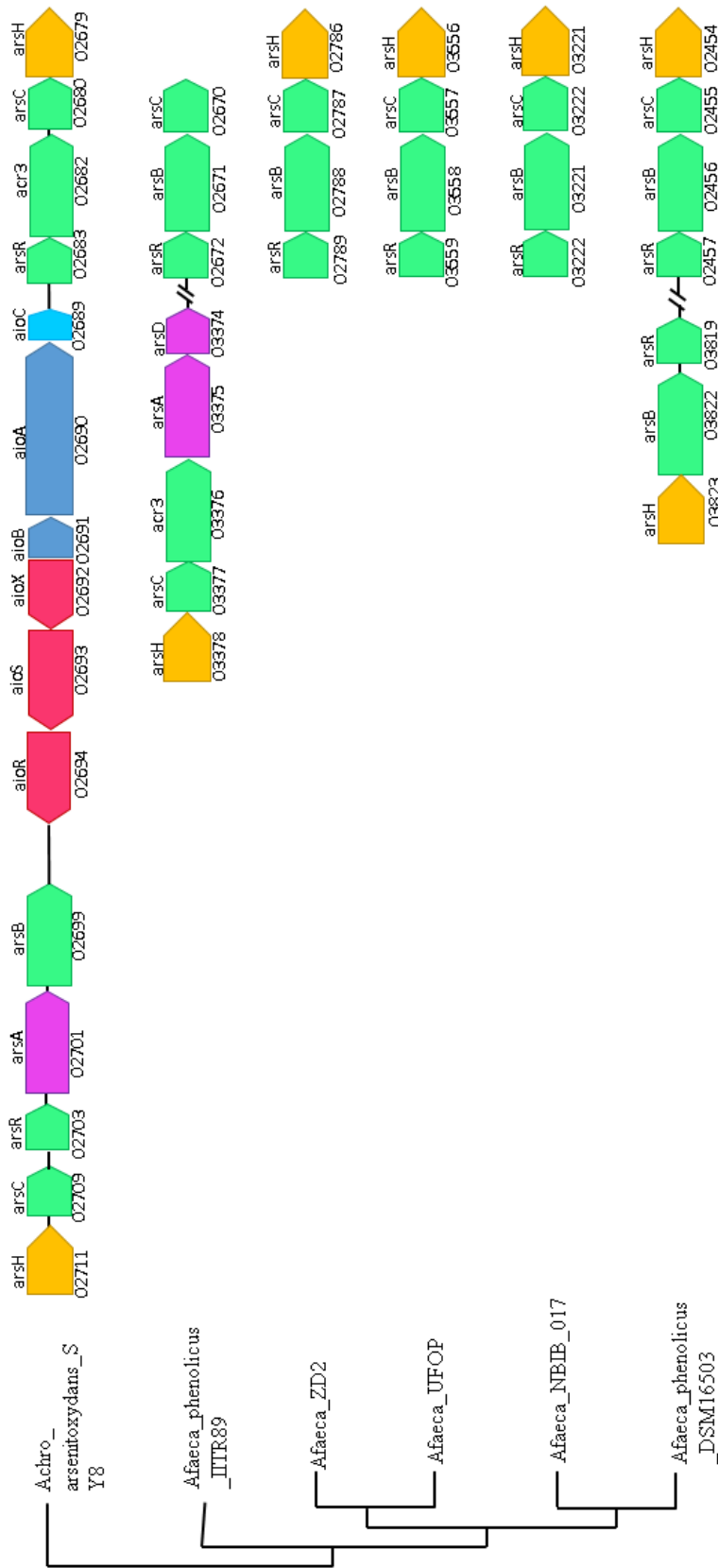


Figura 4: Análise comparativa dos genes de resistência a arsênio nos seis genomas analisados.

Sideróforo

O teste bioquímico de produção de sideróforo demonstrou que *Alcaligenes faecalis* Mc250 é capaz de produzir essa molécula. Na análise do genoma pôde-se observar que essa bactéria apresenta via completa de síntese de enterobactina, um sideróforo do tipo catecolato, sintetizado por bactérias gram-negativas (Tsuji *et al.*, 2016).

A síntese da enterobactina inicia quando a bactéria se encontra em estado de deficiência de ferro. Existe uma completa maquinaria de síntese da molécula, exportação para quelação de ferro, internalização e liberação do metal no meio intracelular. O passo inicial é a transformação de corismato em 2,3-di-hidroxibenzoato (DHB) pela ação de EntC, EntB e EntA (ou os seus ortólogos). O DHB segue então caminhos diferentes para os vários sideróforos. Na formação de enterobactina, a NRPs EntF ativa L-serina, formando o intermediário dipeptidil DHB-serilo, que então ciclotrimeriza para produzir enterobactina. A molécula é então secretada passando pelo transportador EntS e assim quelar o Fe no meio (Donadio *et al.*, 2007).

Após a quelação do Fe, receptores específicos na membrana externa permitem a entrada do sideróforo (Zheng e Nolan, 2012). A bactéria pode ter receptores para outros tipos de sideróforo além do tipo que ela produz. *Alcaligenes faecalis* Mc250 possui receptores para outros três tipos de sideróforos, além da enterobactina, sendo eles pioverdina, pioquelina e pseudobactina. Isso lhe permite captar o ferro de sideróforos produzidos por outras bactérias, saindo assim em vantagem na competição dentro do nicho.

Reconhecido pelo receptor específico, o sideróforo passa pela proteína de membrana FepA que apresenta estrutura do tipo β -barril e reconhece o domínio de ligação ao ferro e os domínios de ligação amida de FeEnt (enterobactina ligada ao Fe) (Raymond *et al.*, 2003). O movimento de passagem conduzido por FepA é transduzido pelo complexo TonB-ExbB-ExbD, que está ancorado na membrana citoplasmática (Krewulak e Vogel, 2011). FepB fornece FeEnt aos poros citoplasmáticos formados por FepD e FepG, em associação à ATPase citoplasmática, FepC. Uma vez no citoplasma, FeEnt esterase, que é codificada pelo gene *fes*, catalisa a clivagem hidrolítica da ligação, conduzindo à liberação intracelular de ferro com conseqüente regeneração de

Enteroquelina (Raymond *et al.*, 2003). A figura 5 mostra toda essa maquinaria em *Alcaligenes faecalis* Mc250, com os respectivos genes encontrados no seu genoma.

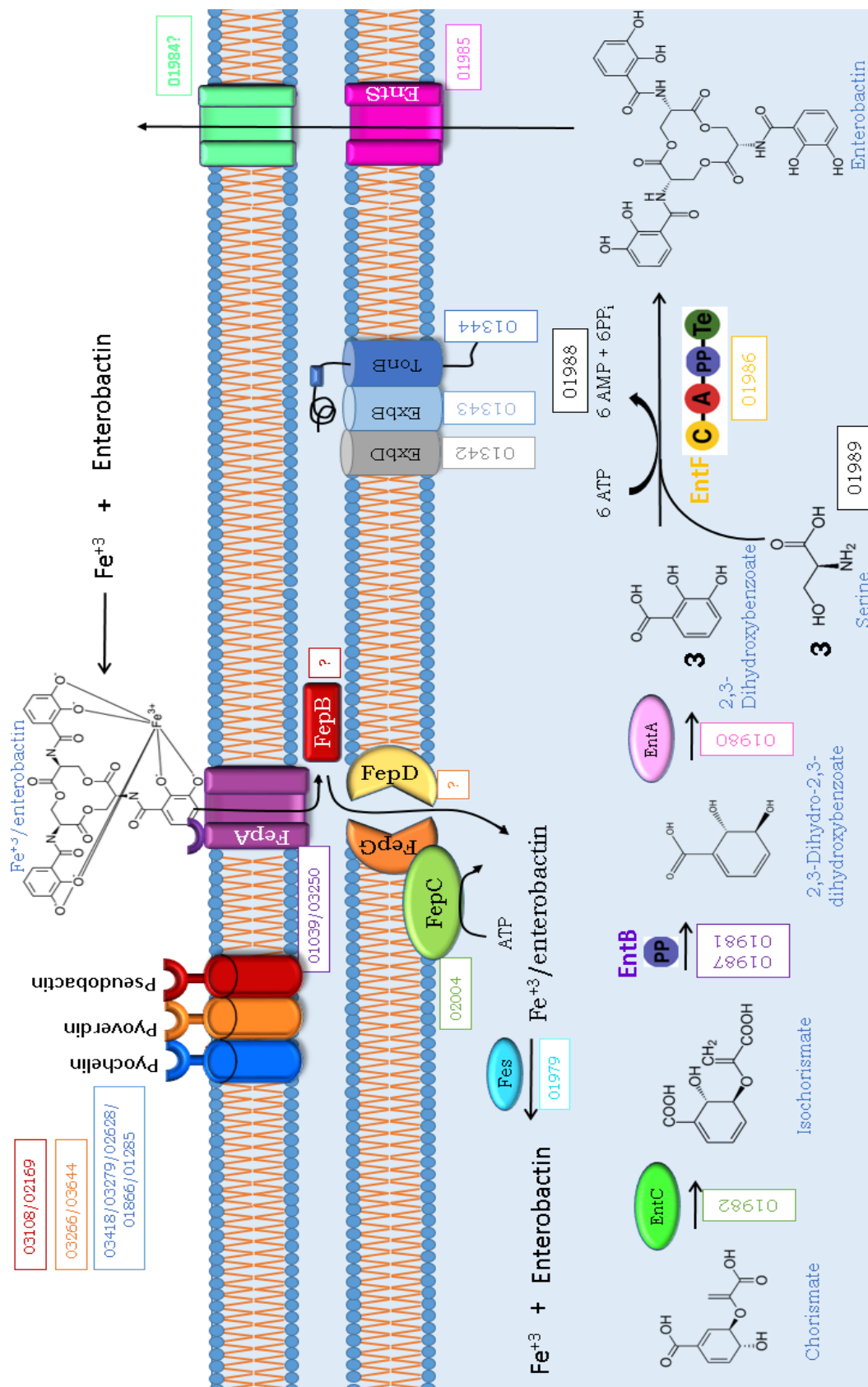


Figura 5: Síntese de enterobactina, exportação, captação de ferro, internalização e liberação do de metal no espaço intracelular.

Foi realizada uma busca por essa via de síntese de enterobactina nos outros cinco genomas estudados. Pôde-se observar que essa via é conservada entre os organismos do gênero, apresentando pouquíssimas variações como a presença de um gene hipotético nas linhagens *Alcaligenes faecalis*_Ufop (Mc250), *Alcaligenes faecalis*_ZD2 e *Alcaligenes faecalis*_NBIB_017, os mais próximos filogeneticamente. O grupo externo, *Achromobacter arsenitoxydans* SY8, não apresentou nenhum gene relacionado a via de síntese de enterobactina (Figura 6).

As bactérias desenvolveram numerosos mecanismos para adquirir competitivamente ferro nos ambientes em que vivem, e a produção de sideróforo é uma das mais importantes. Entretanto, a síntese de sideróforo ou a captação dessa molécula disponível no meio varia de acordo com o microrganismo. A diversidade estrutural dos sideróforos gera capacidades diferentes para adquirir ferro entre os membros de uma comunidade microbiana (Arthur e Ellermann, 2016). A estirpe Mc250 é originária da rizosfera de uma planta do Quadrilátero Ferrífero, local com altos teores de ferro. Esse metal, embora em altas concentrações, está em sua maior parte indisponível para a captação dos organismos que ali vivem. A produção de sideróforo por essa bactéria, além de auxiliá-la na obtenção de ferro, também pode auxiliar na disponibilização para a planta em uma relação simbiótica.



Figura 6: Comparação entre os seis genomas dos genes de síntese do sideróforo enterobactina.

Promoção de crescimento vegetal

Nos ensaios bioquímicos, *Alcaligenes faecalis_Ufop* (Mc250) não foi capaz de produzir o hormônio de crescimento vegetal ácido indol acético, o que corrobora com os dados genômicos, pois não foi encontrado nenhum gene de síntese dessa molécula. Para o teste de fixação de nitrogênio o resultado também foi negativo. Dados genômicos confirmaram que Mc250 não possui genes de fixação de nitrogênio, embora apresente uma completa maquinaria de desnitrificação relacionada a via anaeróbica de produção de energia. Em um solo pobre em oxigênio, elas transformam nitrato e outras moléculas em nitrogênio gasoso, sendo importante para fechar o ciclo e aumentar a disponibilidade para outros organismos incluindo as plantas (Pajares e Bohannan, 2016) (Figura 7). O teste de solubilização de fosfato por Mc250 foi negativo, e embora ela não tenha genes relacionados a solubilização, ela apresenta genes de internalização como o sistema transportador *ugpBCAE*, e o sistema *pstSABC* (Figura 7).

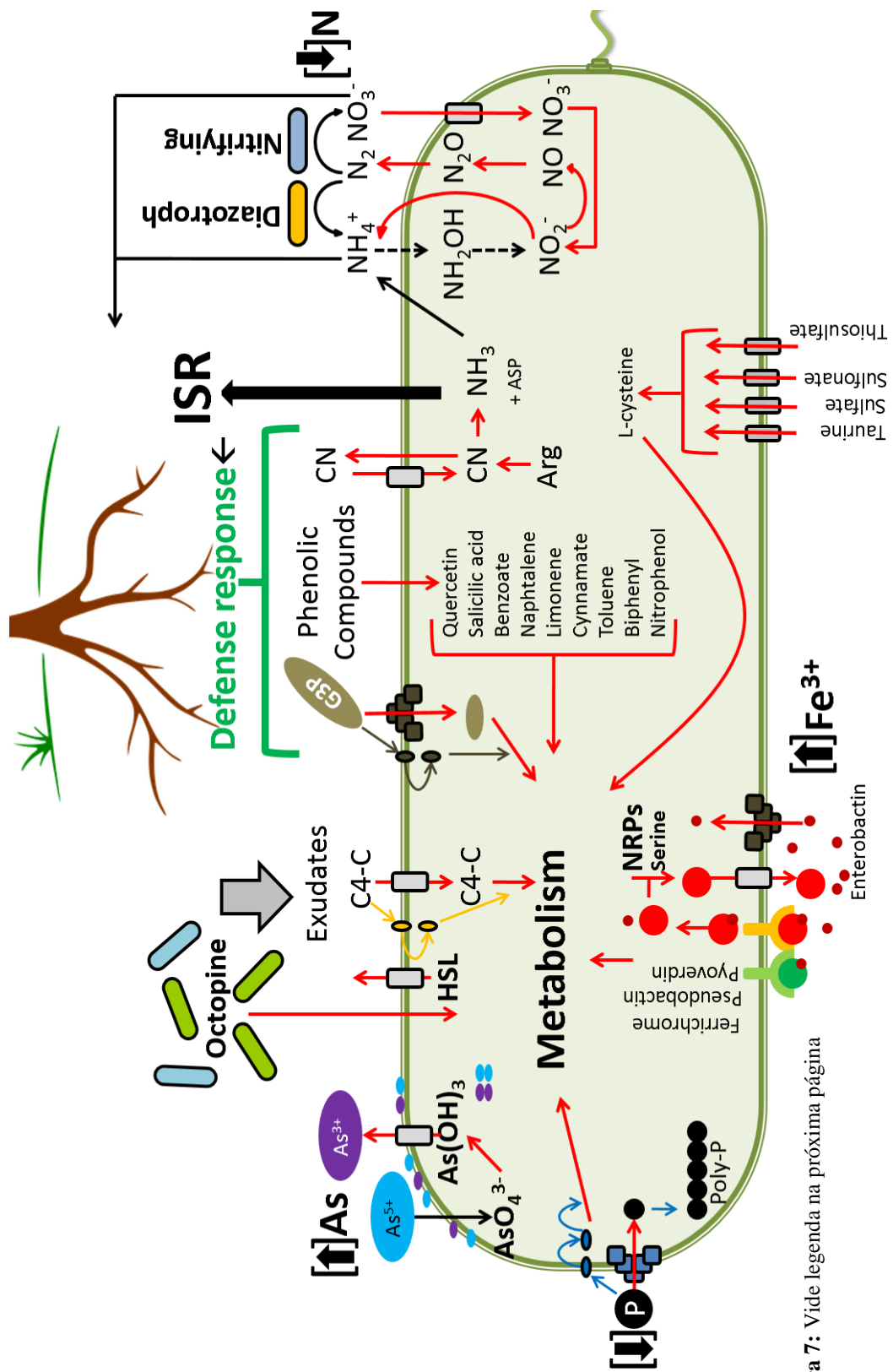


Figura 7: Vide legenda na próxima página

Figura 7: Integração metabólica das vias identificadas no genoma de *Alcaligenes faecalis* Mc250. Abrange os sistemas de internalização de ferro por sideróforo, síntese de enterobactina com intermédio de serina e NRPS, internalização de fosfato, resistência e redução de arsênio, comunicação entre bactérias via HSL e octopina, comunicação com a planta via exsudato C4-carboxilato, resposta contra a defesa da planta através de degradação de glicerol-3-fosfato e compostos fenólicos, produção de ácido cianídrico de ação biocontroladora, participação no ciclo do nitrogênio com papel na desnitrificação e internalização de moléculas de enxofre para síntese de cisteína. Todos esses processos geram compostos integrantes do metabolismo bacteriano.

Proteção vegetal

Nos ensaios bioquímicos foi possível detectar a capacidade de produção de ácido cianídrico por *Alcaligenes faecalis* Mc250. No teste de inibição do fitopatógeno *Xanthomonas citri* esse isolado também obteve resultado positivo. Nos dados genômicos foi possível encontrar o gene *hcnB* relacionado com síntese do HCN. Essa molécula tem direta relação com a proteção da planta uma vez que inibe a cadeia respiratória dos patógenos, ao se ligar ao Fe da citocromo oxidase na mitocôndria. Uma vez associado a planta, a bactéria estabelece uma relação benéfica de proteção (Srinivasan *et al.*, 2012). (Figura 7).

Os compostos fenólicos e o glicerol-3-fosfato produzidos pelas plantas estão também relacionados com sua proteção, pois conferem alta resistência a microrganismos patogênicos e pragas (Bhattacharya *et al.*, 2010). O sistema de defesa da planta produz tais moléculas que são tóxicas para muitos organismos associados a plantas. Para driblar o sistema de defesa da planta, alguns microrganismos são capazes de degradar esse compostos, gerando subprodutos de vias metabólicas essenciais para seu funcionamento. Em outras palavras, além de escapar da resposta imune da planta, aproveita-se do evento para aperfeiçoar seu metabolismo com essa fonte de carbono alternativa (Seo *et al.*, 2009). *Alcaligenes faecalis* Mc250 apresenta genes para vias completa de degradação de glicerol-3-fosfato e vários compostos fenólicos como quecetina, ácido salicílico, benzoato, naftaleno, limoneno, cimanato, tolueno, bifenil e nitrofenol (Figura 8). Além de justificar a relação ecológica de *A. faecalis* Mc250 com a planta *Mimosa calodendrum* que é uma interação benéfica, a expressiva variedade de compostos fenólicos degradados torna esse isolado um alvo para indústria com interesse na degradação de compostos aromáticos (Seo *et al.*, 2009).

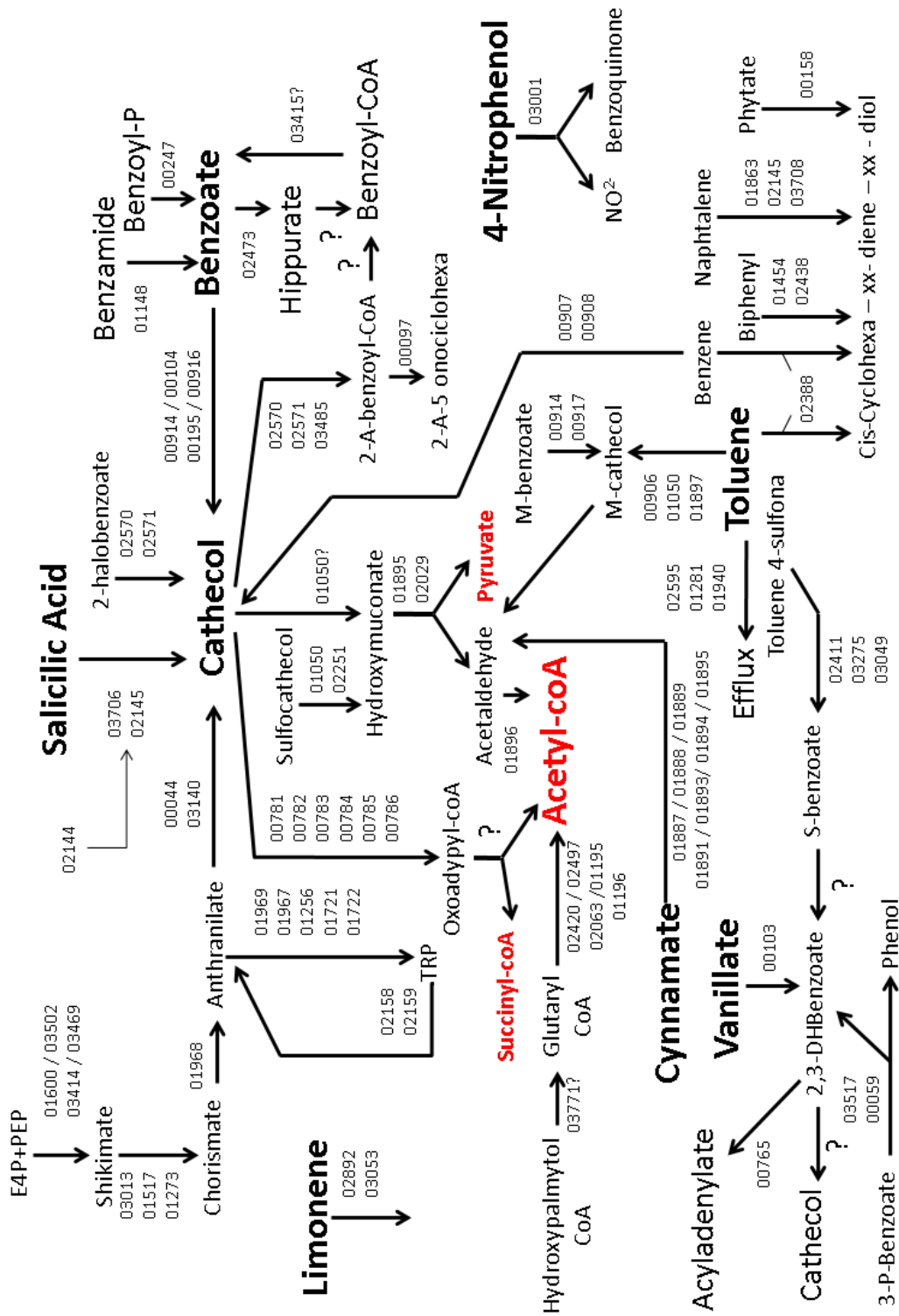


Figura 8: Vias de degradação de compostos fenólicos encontradas em *A. faecalis* Mc250.

Comunicação com as plantas

As interações entre plantas e microrganismos ocorrem pela transferência de informações moleculares e genéticas que incluem muitos mecanismos e classes de moléculas, sendo essa comunicação chamada de *quorum sensing* (Araújo *et al.*, 2016). O primeiro passo na interação planta-microrganismo é o reconhecimento microbiano de exsudatos radiculares liberados pelas plantas no solo. Além de proporcionar um ambiente rico em carbono, aminoácido e sais orgânicos, as raízes das plantas iniciam comunicação cruzada com os microrganismos produzindo sinais específicos que estimulam sua colonização (Bais *et al.*, 2006).

A. faecalis Mc250 possui proteínas que permitem sua comunicação com outras bactérias e com as plantas. Ela possui proteínas capazes de reconhecer e internalizar C4-carboxilatos produzido como sinal pela planta, sendo codificadas pelos genes *dauA*, *dctB* e *dctD*, além das proteínas transportadora e periplasmática. O C4-carboxilato é aproveitado como fonte de carbono no metabolismo bacteriano, assim ao reconhecer o sinal da planta, a bactéria precisa migrar em sua direção. Essa quimiotaxia é possibilitada por uma série de proteínas que foram encontradas na estirpe Mc250 como CheA, CheW, CheY, FlhC, FlhD entre outras, além do aparato flagelar completo (Figura 7).

Além da comunicação com as plantas, essa bactéria é capaz de comunicar-se com outros microrganismos do solo de modo a atraí-los ou repeli-los de acordo com o interesse (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). No caso da Mc250 essa molécula de comunicação é o HSL. Ela também seria capaz de reconhecer octopinas produzidas por outras bactérias, pela presença de genes que apresentam esta função (Figura 7).

Adaptação ao ambiente

Alcaligenes faecalis Mc250 apresentou em seu genoma vias completas para degradar sulfatos e produzir cisteína. Possivelmente o objetivo dessa via seja sintetizar cisteína ou ainda detoxificar a célula bacteriana do excesso de enxofre (Ono *et al.*, 2017). Partindo dos compostos de enxofre: taurina, sulfato, sulfonatos alifáticos e tiosulfato, a estirpe Mc250 possui genes que codificam para as proteínas envolvidas com transporte dessas moléculas para dentro de sua célula. Após a internalização, todos

os genes codificadores das proteínas necessárias para conversão dessas moléculas em cisteínas estão presentes em *A. faecalis* Mc250 (Figura 7).

CONCLUSÃO

Ao determinar a sequência genômica de *Alcaligenes faecalis* Mc250 este estudo permitiu investigar seu conteúdo genético, possibilitando correlacionar presença e ausência de genes específicos com as características fenotípicas observada nos ensaios bioquímicos realizados. As informações genômicas obtidas suportam as características observadas tornando-os candidatos ideais para desenvolvimento futuro especialmente como biocontroladores e biorremediadores. Estes resultados ajudarão na concepção de estratégias abrangentes para o desenvolvimento de alternativas sustentáveis à problemas ambientais.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
- Araújo, W. L., Dourado, M. N. & Braga, R. M. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology***47**, **Supplement 1**, 86–98 (2016).
- Araújo, W. L., Dourado, M. N. & Braga, R. M. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology***47**, **Supplement 1**, 86–98 (2016).
- Arthur, J. C. & Ellermann, M. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radical Biology and Medicine* doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489)
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. & Vivanco, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 233–266 (2006).
- Bakker, A. W. & Schippers, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry* **19**, 451–457 (1987).

- Bhattacharya, A., Sood, P. & Citovsky, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 705–719 (2010).
- Boetzer, M. & Pirovano, W. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biol.* **13**, R56 (2012).
- Boetzer, M., Henkel, C. V., Jansen, H. J., Butler, D. & Pirovano, W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* **27**, 578–579 (2011).
- Bric, J. M., Bostock, R. M. & Silverstone, S. E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Appl Environ Microbiol* **57**, 535–538 (1991).
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E. & Schulze-Lefert, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 807–838 (2013).
- Camacho, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421 (2009).
- Costa, R. de V. F. da *et al.* Geochemical mapping of arsenic in surface waters and stream sediments of the Quadrilátero Ferrífero, Brazil. *Rem: Revista Escola de Minas* **68**, 43–51 (2015).
- Cullen & Bentley. The toxicity of trimethylarsine: an urban myth. *J. Environ. Monit.* **7**, 11–15 (2005).
- Donadio, S., Monciardini, P. & Sosio, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep* **24**, 1073–1109 (2007).
- Ellis, P. J., Conrads, T., Hille, R. & Kuhn, P. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **9**, 125–132 (2001).
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R. & Caballero-Mellado, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2790–2798 (2001).
- Farias, N. C., and Almeida, N. F. Orthologsorter: Inferring Genotyping and Functionality from Ortholog Protein Families. Campo Grande: Federal University of Mato Grosso do Sul (2013).

- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P. & Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* **16**, 169 (2015).
- Heipieper, H. J., Bertin, P. N., Arsène-Ploetze, F. & Kruger, M. C. Bacterial metabolism of environmental arsenic--mechanisms and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3827–3841 (2013).
- Ju, S. *et al.* The complete genome sequence of *Alcaligenes faecalis* ZD02, a novel potential bionematocide. *J. Biotechnol.* **218**, 73–74 (2016).
- Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
- Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
- Kong, L. *et al.* Colonization of *Alcaligenes faecalis* strain JBW4 in natural soils and its detoxification of endosulfan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1407–1416 (2014).
- Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. TonB or not TonB: is that the question? *Biochem. Cell Biol.* **89**, 87–97 (2011).
- Li, L., Stoeckert, C. J. & Roos, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* **13**, 2178–2189 (2003).
- Liu, X. *et al.* The Genome Sequence of *Alcaligenes faecalis* NBIB-017 Contains Genes with Potentially High Activities against *Erwinia carotovora*. *Genome Announc* **4**, (2016).
- Markowitz, V. M. *et al.* IMG 4 version of the integrated microbial genomes comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* **42**, D560–567 (2014).
- Martinez, J. L. *et al.* A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 44–65 (2009).
- Nakano, M., Niwa, M. & Nishimura, N. Development of a PCR-based method for monitoring the status of *Alcaligenes* species in the agricultural environment. *Biocontrol Sci* **19**, 23–31 (2014).
- Nakano, M., Niwa, M. & Nishimura, N. Development of a PCR-based method for monitoring the status of *Alcaligenes* species in the agricultural environment. *Biocontrol Sci* **19**, 23–31 (2014).

- Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **170**, 265–270 (1999).
- Ono, K. *et al.* Synthesis of l-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. *Free Radic. Biol. Med.* **106**, 69–79 (2017).
- Pajares, S. & Bohannan, B. J. M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Front Microbiol* **7**, 1045 (2016).
- Pérez-Montaño, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* **169**, 325–336 (2014).
- Phung, L. T., Trimble, W. L., Meyer, F., Gilbert, J. A. & Silver, S. Draft genome sequence of *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* NCIB 8687 (CCUG 2071). *J. Bacteriol.* **194**, 5153 (2012).
- Phung, L. T., Trimble, W. L., Meyer, F., Gilbert, J. A. & Silver, S. Draft genome sequence of *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* NCIB 8687 (CCUG 2071). *J. Bacteriol.* **194**, 5153 (2012).
- Raja. Biopesticides and Biofertilizers: Ecofriendly Sources for Sustainable Agriculture. *ResearchGate*
- Raymond, K. N., Dertz, E. A. & Kim, S. S. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *PNAS* **100**, 3584–3588 (2003).
- Rehfuss, M. & Urban, J. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 421–429 (2005).
- Rosen, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**, 86–92 (2002).
- Sahoo, R. K. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma* **251**, 943–953 (2014).
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47–56 (1987).

- Seo, J.-S., Keum, Y.-S. & Li, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 278–309 (2009).
- Srinivasan, S. & Avadhani, N. G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1252–1263 (2012).
- Tsuji, Y., Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K. & Wilson, B. R. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine* **22**, 1077–1090 (2016).
- UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **45**, D158–D169 (2017).
- Weyens, N. *et al.* The Role of Plant–Microbe Interactions and Their Exploitation for Phytoremediation of Air Pollutants. *Int J Mol Sci* **16**, 25576–25604 (2015).
- Yokoyama, S., Adachi, Y., Asakura, S. & Kohyama, E. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**, 89–95 (2013).
- Yokoyama, S., Adachi, Y., Asakura, S. & Kohyama, E. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**, 89–95 (2013).
- Zheng, T. & Nolan, E. M. Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens. *Metallomics* **4**, 866–880 (2012).

8- Considerações finais

As vegetações associadas a afloramentos rochosos no Brasil apresentam-se como formações únicas, com diversas peculiaridades e altas taxas de endemismos e de raridade. É destacada maior vulnerabilidade a biota associada aos afloramentos do Quadrilátero Ferrífero (QF). Com as altas taxas de mineração, essa região está perdendo espécies vegetais únicas e, conseqüentemente, microrganismos associados a elas com possível potencial biotecnológico. O estudo da microbiota associada a *Langsdorffia hypogaea*, *Mimosa calodendrum* e outras nove plantas endêmicas, além de solo dos campos ferruginos do QF permitiu identificar várias bactérias como potenciais biofertilizante, biocontrolador e biorremediador. Microrganismos promotores e mantenedores de espécies vegetais constituem uma alternativa para o desenvolvimento agrícola sustentável e produtivo, sendo plantas endêmicas não estudadas uma potencial fonte de novas aplicações. Ademais, estudar mecanismos e encontrar bactérias com altas taxas de resistência e capacidade de remoção de metais pesados como arsênio auxiliam no desenvolvimento de estratégia de biorremediação.

9- Atividades desenvolvidas

- **Participação em projetos paralelos que geraram os artigos:**

1) **Artigo aceito revista Flora:** Reproductive phenology and floral visitors of a *Langsdorffia hypogaea* (Balanophoraceae) population in Brazil. *Jornal Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*

Luana da Silva Freitas; Leandro Marcio Moreira, Rubem Samuel de Avila Jr., Érica Barbosa Felestrino; Diego Demarco, Hildeberto Caldas Sousa and Sérgio Pontes.

2) **Artigo submetido na revista Environmental Microbiology:** Comparative analysis of 69 complete Xanthomonadaceae genomes reveals seven effector protein families with diverse adaptive and evolutionary histories.

Renata de A. B. Assis, José S. L. Patané, Shalabh Thakur, Érica B. Felestrino, Julio Diaz-Caballero, João Carlos Setubal, Nalvo F. Almeida, David S. Guttman and Leandro Marcio Moreira.

3) **Artigo aceito com minor revisions na revista BMC Microbiology:** Proteomics-based identification of differentially abundant proteins reveals adaptation mechanisms of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during *Citrus sinensis* infection.

Leandro M Moreira*, Márcia R Soares, Agda P Facincani, Cristiano B Ferreira, Rafael M Ferreira, Maria I T Ferro, Fábio C Gozzo, Érica B Felestrino, Camila Carrião Machado Garcia¹, João C Setubal, Jesus A. Ferro, Julio C.F. de Oliveira.

4) **Artigo em vias de submissão:** Gene expression analysis identifies hypothetical genes that may be critical during the infection process of *Xanthomonas citri* subsp *citri*.

Marcelo Luiz de Laia, Leandro Marcio Moreira, Tiago Rinaldi Jacob, Janaína Fernandes Gonçalves, Maria Inês Tiraboshiro Ferro, Any Carolyn Pinto Rodrigues, Érica Barbosa Felestrino, Jesus Aparecido Ferro.

5) Artigo em vias de submissão: An isolated *Cladosporium* sp. removes manganese in acidic conditions.

Ester Alves Mota; Érica Barbosa Felestrino; Versiane Albis Leão; Renata Guerra-Sá.

- **Co-orientação de aluno de iniciação científica:**

1) Thaís Ostolin. Identificação de microrganismos isolados de plantas do Quadrilátero Ferrífero e análise de potencial de promoção de crescimento vegetal. 2015. Iniciação Científica. (Graduanda em Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2) Morghana Marina Villa. Bioprospecção bacteriana em cavernas de canga do Quadrilátero Ferrífero. Iniciação Científica. (Graduanda em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

- **Premiação**

Third best poster of the III International Symposium on Microbiology and Biotechnology, Universidade Federal de Viçosa.

- **Participação em bancas de trabalhos de conclusão de graduação**

1) Participação em banca de Naiara Arcanjo Viegas. Avaliação da atividade antimicrobiana e caracterização de bactérias isoladas de anfíbios localizados na Estação Ecológica do Tripuí, Ouro Preto, MG. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto.

2) Participação em banca de Natasha Peixoto Fonseca. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias isoladas de anfíbios localizados na Estação

Ecológica do Tripuí, Minas Gerais-Brasil. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto.

10- Perspectivas

O presente trabalho demonstra o potencial associado à microbiota de plantas do Quadrilátero Ferrífero abrindo espaço para futuros estudos envolvendo bioprospecção e aplicação biotecnológica. Além disso, evidencia a importância de se estudar um ambiente negligenciado no aspecto de conservação e biodiversidade em contrapasso a intensa exploração mineral.

Os dados gerados no presente trabalho serão ainda explorados em um pós-doutoramento. A aplicação das bactérias potencialmente biofertilizantes no crescimento de sementes de tomate já está sendo testada. O potencial biorremediador dos isolados em solos contaminados com arsênio e a interferência no crescimento de sementes de tomate também já se encontram em andamento.

O genoma dos oito isolados resistentes a arsênio foi sequenciado, sendo analisado neste trabalho apenas o genoma de *Alcaligenes faecalis* Mc250. Os demais genomas serão analisados de forma funcional e comparativa a fim de compreender melhor os mecanismos de resistência e remoção ao arsênio e possibilitar futuras aplicações em larga escala.

11- Referências

- Achour, A. R., Bauda, P. & Billard, P. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* **158**, 128–137 (2007).
- Ahmed, N. & Shahab, S. Phosphate Solubilization: Their Mechanism Genetics And Application. *The Internet Journal of Microbiology* **9**, (2009).
- Ahmed, N. & Shahab, S. Phosphate Solubilization: Their Mechanism Genetics And Application. *The Internet Journal of Microbiology* **9**, (2009).
- Andres, J. & Bertin, P. N. The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiol Rev* **40**, 299–322 (2016).
- *Bacterial iron uptake: a promising solution against multidrug resistant bacteria (PDF Download Available)*.
- Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2010).
- Castillo, R. & Saier, M. H. Functional Promiscuity of Homologues of the Bacterial ArsA ATPases. *International Journal of Microbiology* **2010**, e187373 (2010).
- Combes-Meynet, E., Pothier, J. F., Moënne-Loccoz, Y. & Prigent-Combaret, C. The Pseudomonas secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of Azospirillum genes involved in plant-growth promotion. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 271–284 (2011).
- Crespo, J. C. M. Reflexões sobre a patrimonização das paisagens no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais, MG. Sessão temática: Patrimônio, território e paisagem cultural: novos desafios à preservação. *Encontro da Associação Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação em Arquitetura e Urbanismo*. Porto Alegre (2016).
- Cullen & Bentley. The toxicity of trimethylarsine: an urban myth. *J. Environ. Monit.* **7**, 11–15 (2005).

- Dakora, F. D. & Phillips, D. A. in *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities* (ed. Adu-Gyamfi, J. J.) 201–213 (Springer Netherlands, 2002).
- Deschamps, E., Ciminelli, V. S. T., Weidler, P. G. & Ramos, A. Y. ARSENIC SORPTION ONTO SOILS ENRICHED IN Mn AND Fe MINERALS. *Clays and Clay Minerals* **51**, 197–204 (2003).
- Dhankhar, R. & Hooda, A. Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology* **32**, 467–491 (2011).
- Dorr, J. V. N. Physiographic, stratigraphic and structural development of the QF, Brazil. Washington, DNP/USGS. 109 pp (1969).
- Duijff, B. J., Recorbet, G., Bakker, P. A., Loper, J. E. & Lemanceau, P. Microbial Antagonism at the Root Level Is Involved in the Suppression of Fusarium Wilt by the Combination of Nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47 and Pseudomonas putida WCS358. *Phytopathology* **89**, 1073–1079 (1999).
- Figueiredo, B. R., Borba, R. P., Angélica, R. S. Arsênio no Brasil e exposição humana. In: Silva, C. R. *et al.* Geologia médica no Brasil - efeitos dos materiais e fatores geológicos na saúde humana e meio ambiente. Rio de Janeiro: CPRM (2006).
- Gerbino, E., Carasi, P., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E. & Gómez-Zavaglia, A. Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by Lactobacillus kefir. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 583–592 (2015).
- Giulietti, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M.J.G; Queiroz, L.P. & Silva, J.M.C. Plantas raras do Brasil (2009).
- Goldstone, R. J. & Smith, D. G. E. New perspectives from genomic analyses of bacterial infectious agents. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* **35**, 203–213 (2016).
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. & Yuan, Z.-C. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review. *Microb. Cell Fact.* **15**, 203 (2016).
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. van & Berg, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**, 235–257 (2009).

- Hayatsu, M., Tago, K. & Saito, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science & Plant Nutrition* **54**, 33–45 (2008).
- Hertlein, G. *et al.* Production of the Catechol Type Siderophore Bacillibactin by the Honey Bee Pathogen *Paenibacillus* larvae. *PLOS ONE* **9**, e108272 (2014).
- Hughes, M. F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* **133**, 1–16 (2002).
- Jacobi, C. M., Carmo, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, MG. *Megadiversidade* **4**, 1-2 (2008).
- Jacobi, C. M., Carmo, F. F. Diversidade Florística nas Cangas do Quadrilátero Ferrífero. *Na Raiz* (2012).
- Jacobi, C. M., Carmo, F. F. do, Vincent, R. C. & Stehmann, J. R. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodivers Conserv* **16**, 2185–2200 (2007).
- Jacobi, C. M., do Carmo, F. F. & de Campos, I. C. Soaring Extinction Threats to Endemic Plants in Brazilian Metal-Rich Regions. *Ambio* **40**, 540–543 (2011).
- Jeong, J. & Guerinot, M. L. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **14**, 280–285 (2009).
- Kang, Y.-S., Bothner, B., Rensing, C. & McDermott, T. R. Involvement of RpoN in Regulating Bacterial Arsenite Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5638–5645 (2012).
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. & Wani, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* **56**, 73–98 (2010).
- Kirzinger, M. W. B. & Stavrínides, J. Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends Microbiol.* **20**, 88–93 (2012).
- Kloepper, J. W. Host Specificity in Microbe-Microbe Interactions. *BioScience* **46**, 406–409 (1996).
- Kloepper, J. W. Host Specificity in Microbe-Microbe Interactions. *BioScience* **46**, 406–409 (1996).
- Kloepper, J.W. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience* **46**, 406 e 409 (1996).

- Kobayashi, T. & Nishizawa, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 131–152 (2012).
- Kruger, M. C., Bertin, P. N., Heipieper, H. J. & Arsène-Ploetze, F. Bacterial metabolism of environmental arsenic--mechanisms and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3827–3841 (2013).
- Kumari, N. & Jagadevan, S. Genetic identification of arsenate reductase and arsenite oxidase in redox transformations carried out by arsenic metabolising prokaryotes - A comprehensive review. *Chemosphere* **163**, 400–412 (2016)
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M. & Pagnussat, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 109–136 (2003).
- Lett, M.-C., Muller, D., Lièvreumont, D., Silver, S. & Santini, J. Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *J. Bacteriol.* **194**, 207–208 (2012).
- Liu, G. *et al.* A periplasmic arsenite-binding protein involved in regulating arsenite oxidation. *Environ. Microbiol.* **14**, 1624–1634 (2012).
- Liu, S.-H. *et al.* Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresour. Technol.* **224**, 25–33 (2017).
- López-Baena, F. J. *et al.* The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**, 1445–1454 (2009).
- Macy, J. M., Santini, J. M., Pauling, B. V., O'Neill, A. H. & Sly, L. I. Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch Microbiol* **173**, 49–57 (2000).
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **17**, 458–466 (2009).
- Messenger, A. J. M. & Barclay, R. Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochem. Educ.* **11**, 54–63 (1983).
- Oremland, R. S., Stolz, J. F. & Hollibaugh, J. T. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**, 15–27 (2004).

- Pajares, S. & Bohannan, B. J. M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Front Microbiol* **7**, (2016).
- Pérez-Montaño, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* **169**, 325–336 (2014).
- Pérez-Montaño, F. *et al.* Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Res. Microbiol.* **164**, 749–760 (2013).
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Ton, J., van Pelt, J. A. & van Loon, L. C. Signalling in Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **4**, 535–544 (2002).
- Provorov, N. A. & Andronov, E. E. [Evolution of Root Nodule Bacteria: Reconstruction of the Speciation Processes Resulting from Genomic Rearrangements in a Symbiotic System]. *Mikrobiologiya* **85**, 115–125 (2016).
- Qin, J. *et al.* Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2075–2080 (2006).
- Quiñones, B., Dulla, G. & Lindow, S. E. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 682–693 (2005).
- Richardson, A. E., Barea, J.-M., McNeill, A. M. & Prigent-Combaret, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* **321**, 305–339 (2009).
- Richey, C. *et al.* Respiratory arsenate reductase as a bidirectional enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**, 298–302 (2009).
- Roeser, H. M. P. & Roeser, P. A. O Quadrilátero Ferrífero - MG, Brasil: aspectos sobre sua história, seus recursos minerais e problemas ambientais relacionados. *Revista Geonomos* **18**, (2013).
- Rosen, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**, 86–92 (2002).
- Saha, M. *et al.* Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**, 3984–3999 (2016).

- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S. & Bestervelt, L. L. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* **53**, 303–317 (2013).
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. del C. & Glick, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* **183**, 92–99 (2016).
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. & Gobi, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* **2**, 587 (2013).
- Skamnioti, P. & Ridout, C. J. Microbial avirulence determinants: guided missiles or antigenic flak? *Mol. Plant Pathol.* **6**, 551–559 (2005).
- Skovgaard, O., Bak, M., Løbner-Olesen, A. & Tommerup, N. Genome-wide detection of chromosomal rearrangements, indels, and mutations in circular chromosomes by short read sequencing. *Genome Res.* **21**, 1388–1393 (2011).
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425–448 (2007).
- Srinivasan, S. & Avadhani, N. G. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med* **53**, 1252–1263 (2012).
- Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 807–838 (2013).
- Teale, W. D. *et al.* Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Mol Plant* **1**, 229–237 (2008).
- Vacheron, J. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* **4**, 356 (2013).
- Vernoux, T. & Robert, S. Auxin 2016: a burst of auxin in the warm south of China. *Development* **144**, 533–540 (2017).
- Yang, J., Rawat, S., Stemmler, T. L. & Rosen, B. P. Arsenic binding and transfer by the ArsD As(III) metallochaperone. *Biochemistry* **49**, 3658–3666 (2010).

12- Anexo

Tabela 1: Resultado dos ensaios bioquímicos de todos os isolados bacterianos coletados.

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
82	Raiz encontrada no cocô na caverna 1	A3-P2	6,765			+		+	+			
83	Raiz encontrada no cocô na caverna 1	A4-P2	0,56			+		+	+			
84	Raiz encontrada no cocô na caverna 1	A5-P2	10,75				+	+	+			
85	Raiz encontrada no cocô na caverna 1	A6-P2										
86	Raiz encontrada no cocô na caverna 1	A7-P2						+				
87	Solo da caverna 1	A8-P2	6,605			+		+	+			
88	Solo da caverna 1	A9-P2	8,37					+				
89	Solo da caverna 1	A10-P2	11,405		+		+	+			5	300
90	Solo da caverna 1	B2-P2	4,67						+			
91	Solo da caverna 1	B3-P2	5,72			+			+			
92	Solo da caverna 1	B4-P2				+			+			
93	Solo da caverna 1	B5-P2				+			+			
94	Solo da caverna 1	B6-P2	6,88									
95	Solo da caverna 1	B7-P2	4,7									
96	Solo da canga 1	B8-P2	6,575			+						
97	Solo da canga 1	B9-P2				+			+			
98	Solo da canga 1	B10-P2										
99	Solo da canga 1	B11-P2										
100	Solo da canga 1	C2-P2							+			
101	Solo da canga 1	C3-P2										

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
102	Solo da canga 1	C4-P2						+				
103	Solo da canga 1	C5-P2										
104	Solo da canga 1	C6-P2										
105	Solo da canga 1	C7-P2					+		+			
106	Solo da canga 1	C8-P2										
107	Solo da canga 1	C9-P2	10,985									
108	Raiz da Caverna 1	C10-P2			+			+	+	+		
109	Raiz da Caverna 1	C11-P2			+			+				
110	Raiz da Caverna 1	D2-P2	1,195					+				
111	Raiz da Caverna 1	D3-P2	3,365			+			+			
112	Raiz da Caverna 1	D4-P2				+		+	+			
113	Raiz da Caverna 1	D5-P2				+			+			
114	Raiz da Caverna 1	D6-P2	12,99		+		+	+	+			
115	Raiz da Caverna 1	D7-P2	0,245					+		+		
116	Raiz da Caverna 1	D8-P2	10,67		+		+	+	+			
117	Raiz da Caverna 1	D9-P2			+			+	+	+		
118	Raiz da Caverna 1	D10-P2							+			
119	Raiz da Caverna 1	D11-P2										
120	Raiz da Caverna 1	E2-P2	3,445			+			+			
121	Raiz da Caverna 1	E3-P2				+			+			
122	Raiz da Caverna 1	E4-P2										
123	Raiz da Caverna 1	E5-P2	2,72					+				
124	Raiz da Caverna 1	E6-P2	8,945		+		+	+	+			
125	Raiz da Caverna 1	E7-P2	1,225			+		+				
126	Raiz da Caverna 1	E8-P2										
127	Raiz da Caverna 1	E9-P2										

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
128	Raiz da Caverna 1	E10-P2										
129	Raiz da Caverna 1	E11-P2										
130	Raiz da Caverna 1	F2-P2				+			+			
131	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F3-P2			+		+	+				
132	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F4-P2						+				
133	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F5-P2							+			
134	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F6-P2							+			
135	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F7-P2					+					
136	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F8-P2										
137	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F9-P2										
138	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F10-P2										
139	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	F11-P2										
140	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G2-P2							+			
141	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G3-P2						+	+			
142	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G4-P2						+	+			
143	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G5-P2				+			+			
144	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G6-P2	0,375						+			
145	Tubérculo de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G7-P2	3,94			+			+			
146	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G8-P2				+			+			
147	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G9-P2										
148	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G10-P2		+								
149	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	G11-P2										
150	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H3-P2	0,185					+	+			
151	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H4-P2	2,15					+				
152	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H5-P2						+				
153	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H6-P2				+			+			

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
154	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H7-P2	3,57			+			+			
155	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H8-P2	3,625									
156	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H9-P2										
157	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	H10-P2										
158	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A3-P3						+				
159	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A4-P3	6,115						+			
160	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A5-P3										
161	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A6-P3										
162	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A7-P3										
163	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A8-P3										
164	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A9-P3				+						
165	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	A10-P3										
166	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B2-P3	7,86					+	+	+		
167	Raiz de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B3-P3										
168	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B4-P3										
169	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B5-P3										
170	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B6-P3										
171	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B7-P3				+			+			
172	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B8-P3	2,905			+			+			
173	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B9-P3							+			
174	Flor de <i>Sinirgia rupicola</i> canga 1	B10-P3	2,625			+			+			
175	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	B11-P3				+			+			
176	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C2-P3										
177	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C3-P3	11,595									
178	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C4-P3										
179	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C5-P3				+			+			

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
180	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C6-P3				+		+				
181	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C7-P3										
182	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C8-P3				+			+			
183	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C9-P3										
184	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C10-P3	6,915									
185	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	C11-P3										
186	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D2-P3	4,43									
187	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D3-P3										
188	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D4-P3										
189	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D5-P3										
190	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D6-P3										
191	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D7-P3										
192	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D8-P3							+			
193	Raiz de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D9-P3										
194	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D10-P3	1,695									
195	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	D11-P3										
196	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E2-P3										
197	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E3-P3										
198	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E4-P3				+			+			
199	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E5-P3	3,86									
200	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E6-P3						+				
201	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E7-P3				+			+			
202	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E8-P3										
203	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E9-P3										
204	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E10-P3										
205	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	E11-P3	3,87									

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
206	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	F2-P3						+				
207	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	F3-P3										
208	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	F4-P3									5	50
209	Caule de <i>Artrocereus glaziovii</i> canga 1	F5-P3									5	500
210	Raiz de <i>Vrisea minarum</i> canga 2	F6-P3				+			+			
211	Raiz de <i>Vrisea minarum</i> canga 2	F7-P3				+			+			
212	Raiz de <i>Vrisea minarum</i> canga 2	F8-P3				+			+			
213	Flor de <i>Vrisea minarum</i> canga 2	F9-P3				+			+			
214	Rizosfera de <i>Paspalum bractruicum</i>	F10-P3										
215	Rizosfera de <i>Paspalum bractruicum</i>	F11-P3				+			+			
216	Raiz de <i>Paspalum bractruicum</i>	G2-P3	0,425					+	+			
217	Raiz de <i>Paspalum bractruicum</i>	G3-P3	7,005					+				
218	Raiz de <i>Paspalum bractruicum</i>	G4-P3										
219	Raiz de <i>Paspalum bractruicum</i>	G5-P3							+			
220	Folha de <i>Paspalum bractruicum</i>	G6-P3										
221	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	G7-P3	3,325			+			+			
222	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	G8-P3										
223	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	G9-P3										
224	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	G10-P3	3,375				+					
225	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	G11-P3	5,76		+							
226	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H3-P3										
227	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H4-P3					+					
228	Rizosfera de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H5-P3							+			
229	Raiz de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H6-P3	0,68						+			
230	Raiz de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H7-P3	3,395			+		+	+			
231	Raiz de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H8-P3				+			+			

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
232	Raiz de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H9-P3				+			+			
233	Flor de <i>Jaquemontia linarioides</i>	H10-P3	34,09		+		+	+				
234	Raiz de <i>Oncidium gracilli</i>	A3-P4				+			+			
235	Raiz de <i>Oncidium gracilli</i>	A4-P4	2,85									
236	Raiz de <i>Oncidium gracilli</i>	A5-P4	6,565					+				
237	Rizosfera de <i>Oncidium gracilli</i>	A6-P4	6,345			+			+			
238	Rizosfera de <i>Oncidium gracilli</i>	A7-P4										
239	Tubérculo de <i>Oncidium gracilli</i>	A8-P4				+			+			
240	Tubérculo de <i>Oncidium gracilli</i>	A9-P4										
241	Raiz de <i>Crotum</i>	A10-P4				+		+	+			
242	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B3-P4		+		+	+	+	+			
243	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B4-P4				+			+			
244	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B5-P4										
245	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B6-P4							+			
246	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B7-P4							+			
247	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B8-P4		+			+	+	+			
248	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B9-P4		+			+		+			
249	Rizosfera de <i>Crotum</i>	B10-P4				+			+			
250	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	C3-P4				+	+	+		+	10	800
251	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	C4-P4	0,26			+	+				10	800
252	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	C5-P4					+	+			5	800
253	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	C6-P4	4,705				+	+				
254	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	C7-P4										
255	Rizosfera de <i>Mimosa calodendrum</i>	C8-P4										
256	Raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	C9-P4										
257	Raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	C10-P4	5,43			+		+	+			

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
258	Raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D2-P4										
259	Raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D3-P4	2,08									
260	Nódulo da raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D4-P4				+	+	+				
261	Nódulo da raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D5-P4					+	+	+			
262	Nódulo da raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D6-P4							+			
263	Nódulo da raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D7-P4						+	+			
264	Nódulo da raiz de <i>Mimosa calodendrum</i>	D8-P4						+				
265	Flor de <i>Mimosa calodendrum</i>	D9-P4	10				+					
266	Flor de <i>Mimosa calodendrum</i>	D10-P4	10				+					
267	Raiz de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	D11-P4	0,085			+		+	+			
268	Raiz de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E2-P4						+		+		
269	Raiz de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E3-P4										
270	Raiz de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E4-P4										
271	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E5-P4	7,565									
272	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E6-P4					+		+			
273	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E7-P4		+			+		+			
274	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E8-P4	13,06				+		+		5	50
275	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E9-P4										
276	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E10-P4										
277	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	E11-P4										
278	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	F3-P4										
279	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	F4-P4										
280	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	F5-P4										
281	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	F6-P4										
282	Rizosfera de <i>Cromolena multiflosculosa</i>	F7-P4										
283	Raiz de <i>Calibracoa elegans</i>	F8-P4										

Nº	Origem	Posição	AIA	N2	PO4	Ami	Sid	HCN	Prot	Xac	As3	As5
284	Raiz de <i>Calibracoa elegans</i>	F9-P4				+			+			
285	Raiz de <i>Calibracoa elegans</i>	F10-P4				+			+			
286	Raiz de <i>Calibracoa elegans</i>	G3-P4										
287	Raiz de <i>Calibracoa elegans</i>	G4-P4						+	+			
288	Raiz de <i>Calibracoa elegans</i>	G5-P4						+				
289	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	G6-P4										
290	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	G7-P4					+	+	+			
291	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	G8-P4						+			5	800
292	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	G9-P4										
293	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	G10-P4	5,6		+		+	+	+			
294	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	H4-P4										
295	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	H5-P4										
296	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	H6-P4	9,555		+		+					
297	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	H7-P4										
298	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	H8-P4					+					
299	Rizosfera de <i>Calibracoa elegans</i>	H9-P4						+	+			