



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

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



WASHINGTON LUIZ CANESCHI

**Bioprospecção de bactérias de regiões de canga
do Quadrilátero Ferrífero: estratégia de busca de
alvos com potencial biotecnológico.**

Ouro Preto- 2018



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

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



WASHINGTON LUIZ CANESCHI

**Bioprospecção de bactérias de regiões de canga
do Quadrilátero Ferrífero: estratégia de busca de
alvos com potencial biotecnológico.**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto como parte das exigências do Programa de Pós de Graduação em Biotecnologia para obtenção do título de doutor.

Ouro Preto-2018

C162b

Caneschi, Washington Luiz.

Bioprospecção de bactérias de regiões de canga do Quadrilátero Ferrífero [manuscrito]: estratégia de busca de alvos com potencial biotecnológico / Washington Luiz Caneschi. - 2018.

106f.: il.: color; graf; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Quadrilátero Ferrífero (MG) . 2. Arsênio. 3. *Serratia marcescens*. 4. Genômica . I. Moreira , Leandro Márcio . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 575.111

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 10 dias do mês de Dezembro do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências do Centro de Educação a Distância (Cead), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese do doutorando Washington Luiz Caneschi, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Leandro Marcio Moreira (Presidente - UFOP), pela Profa. Cynthia Canedo da Silva (Membro - Externo), pela Profa. Monica Cristina Teixeira (Membro - UFOP), pelo Prof. Nalvo Franco de Almeida Júnior (Membro - Externo), pela Profa. Silvana de Queiroz Silva (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu ao doutorando Washington Luiz Caneschi 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Bioprospecção de Bactérias de Regiões de Canga do Quadrilátero Ferrífero: Estratégia de Busca de Alvos com Potencial Biotecnológico", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas ao candidato sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que o doutorando foi aprovado por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o eximir final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pelo doutorando. Ouro Preto, 10 de dezembro de 2018.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: Participação por vídeo conferência _____

Doutorando: Washington Luiz Caneschi _____

“Fanático é aquele que não muda de ideia e não muda de assunto”

Winston Churchill

Agradecimentos

Aos professores Dr Leandro Marcio Moreira e Camila Carrião, pela valiosa orientação, pelo exemplo de profissionalismo, pela paciência, pela confiança, por modelar meu pensamento científico e por ter me dado oportunidade de participar deste projeto.

Aos professores, funcionários e colegas dos demais laboratórios do NUPEB.

À todos alunos e alunas do laboratório LabDNA (Laboratório de genômica e processos redox) que dividiram tempo bons e ruins durante toda a jornada.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade e pelo apoio acadêmico e institucional.

À UFOP e a CAPES pelo incentivo à capacitação e ao desenvolvimento da ciência através de apoio financeiro.

À Ariane e minha filha Melina, por terem compreendido meus finais de semana de trabalho. Te amo! À minha família, pelo apoio fundamental.

Ao meu pai Luiz, minha mãe Amélia e meu irmão Wiliam pelo apoio e carinho eternos!

SUMÁRIO	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 QUADRILÁTERO FERRÍFERO	1
1.2 REGIÕES DE CANGA	2
1.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	4
1.3.1 Mecanismos diretos.....	4
1.3.1.1 Produção de auxinas.....	4
1.3.1.2 Fixação de nitrogênio.	4
1.3.1.3 Solubilização de Fosfato	5
1.3.1.4 Aquisição de ferro.....	5
1.3.2 Mecanismos indiretos.....	6
1.4 ARSÊNIO : CARACTERÍSTICAS E DISTRIBUIÇÃO	7
1.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana ao arsênio.....	8
2.JUSTIFICATIVA	11
3.OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GERAL.....	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4. 1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE SOLOS E PLANTAS.....	13
4. 2 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	13
4.3 CONSTRUÇÃO DE UMA PLACA MATRIZ PARA OS ENSAIOS BIOQUÍMICOS	13
4. 4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	13
4. 5 PRODUÇÃO DE AMILASE E CELULASE	14
4. 6 PRODUÇÃO DE SIDERÓFORO	14
4. 7 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	14
4. 8 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA A ANTIBIÓTICOS	15
4. 9 TOLERÂNCIA A ARSÊNIO	15
4.10 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	15

4. 11 CURVAS DE CRESCIMENTO	15
4. 12 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORA DE COLÔNIA.....	15
4.13 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	16
4.14 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	16
4.15 ENSAIO DE ESTABILIDADE PLASMIDIAL	16
4.16 ENSAIO DE CRESCIMENTO VEGETAL	17
4.17 ENSAIO DE AUTOAGREGAÇÃO.....	17
4.18 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE BIOFILME.....	17
4.19 QUANTIFICAÇÃO DE ARSÊNIO TOTAL POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X.	18
4.20 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ANÁLISE POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)	18
4.21 ENSAIO DA ATIVIDADE DE ARSENITO OXIDASE	18
4. 22 DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS INTRACELULAR	19
4. 23 AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE PERÓXIDO	19
4. 24 VERIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	20
4.25 INTEGRIDADE DO DNA.....	20
4. 26 ENSAIO DE MOTILIDADE	21
4. 27 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AO ARSÊNIO	21
4.28 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S RIBOSSOMAL.....	21
4.29 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA.....	22
4.30 ANOTAÇÃO DO GENOMA E ANÁLISES COMPARATIVAS	22
4.31 ANÁLISES FILOGENÔMICAS.....	23
4.32 INSERÇÃO DE FAGOS.....	23
4.33 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À LUZ ULTRA VIOLETA (UV).....	23
4.34 FOSFOROTILAÇÃO DO DNA.....	24
4.35 PRODUÇÃO DE CELULOSE.....	24
4.36 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	24
4. 36 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
5. RESULTADOS	26
5.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS ISOLADOS	26
5. 2 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DOS ISOLADOS.....	32

5.3 ANÁLISE DO POTENCIAL DOS PLASMÍDEOS	34
5.4 ANÁLISE QUANTO AO PERFIL DE TOLERÂNCIA AO ÁRSÊNIO	37
5.5 INDUÇÃO DE PROCESSOS REDOX	42
5.6 MOTILIDADE NA PRESENÇA DE ÁRSÊNIO	45
5.7 ESTRUTURAS E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GENOMA DA CEPA FG3.....	45
5.8 COMPARAÇÃO DOS GENOMAS DA ESPÉCIES DE SERRATIAS E FILOGENÔMICA	47
5.9 COMPARAÇÃO GENÔMICA DO CLADO QUE AGRUPA AS CEPAS SERRATIA LIQUEFACIENS	54
4.10 CARACTERIZAÇÃO DAS DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE SERRATIA LIQUEFACIENS FG3 EM CATEROGIAS ESPECÍFICAS.	55
5.11 ILHAS GENÔMICAS E INSERÇÃO DE FAGOS	56
5.12 RESISTÊNCIA A METAIS	60
5.13 DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS	60
5.14 AQUISIÇÃO E METABOLISMO DE FERRO.....	62
5.15 SÍNTESE DE HORMÔNIOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	63
5.16 ACC DESAMINASE.....	64
5.17 PRODUÇÃO DE CELULOSE	64
5.18 METABOLISMO DE ENXOFRE	65
5.19 FOSFOROTIOLAÇÃO DO DNA	66
5.20 GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	67
5.21 RESISTÊNCIA AO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	69
5.22 GENES RELACIONADOS AO REPARO DE DNA	70
5.23 BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	72
6.DISSCUSSÃO	76
6.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS	76
6.2 ANÁLISES GENÔMICAS DA CEPA SERRATIA LIQUEFACIENS FG3	81
6.2.1 Genes associados com adaptação a estresse abiótico.....	83
6.2.2 Genes associados com adaptação ao tecido vegetal	87
6.2.3 Genes associados com competição.....	89
7.CONCLUSÕES	91
8.PERSPECTIVAS.....	92
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
10.ANEXOS	104

Lista de abreviaturas

AIA- Ácido indol acético

BPCP- Bacteria Promotora de Crescimento de Planta

dNTP- Desoxirribunucleotídeo

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra actético.

ER- Espécies reativas

g- Aceleração da gravidade

H₂DCFDA- Diacetato de 2,7-diclorodihidofluoresceína

kV- kilovolts

mA- Miliampere

mM- Milimolar

NCBI- Nacional Center for Biotchenology and information

ng- Nanograma

nm- Nanômetro

OD- Densidade ótica

pb - Pares de bases

PBS- Solução tampão fosfato

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pH- Potencial hidrogeniônico

QF- Quadrilátero Ferrífero

rpm- Rotações por minuto

SEM- Standart error minor (Erro do desvio padrão)

TE- Tampão Tris- EDTA

TLC- Thin Layer chromatography (Cromatografia em Camada Delgada)

ul- Microlitros

UV- Raios ultra violeta

TAE- Tampão Tris- Acetato- EDTA

TAEa- Tampão Tris- Acetato- EDTA ativado

TBE- Tampão Tris- Borato-EDTA

ug- micrograma

Lista de Figuras

Figura 1. Localização e extensão do Quadrilátero Ferrífero.

Figura 2. Vegetação de canga.

Figura 3. Mecanismos de resistência ao arsênio.

Figure 4. Localização das áreas de coleta das amostras.

Figura 5. Características bioquímicas e morfológicas dos 65 isolados obtidos.

Figura 6. Comparação do perfil de curva de crescimento de diferentes isolados de plantas e solos em comparação ao controle *E. coli*.

Figura 7. Avaliação do potencial de três isolados bacterianos em atuarem como BPCP.

Figura 8. Caracterização dos plasmídeos obtidos a partir dos isolados C25 e FG3.

Figura 9. Estabilidade dos plasmídeos extraídos da cepa FG3.

Figura 10. Análise de produção de biofilme.

Figura 11. Perfil de agregação celular (A) e análise microscópica (B) das cepas.

Figura 12. Resistência da cepa selvagem FG3 e das cepas transformantes frente à diferentes concentrações de arsenito de sódio.

Figura 13. Curvas de crescimento do isolado FG3 (A) e *E.coli* selvagem e transformada (B) em diferentes concentrações de arsenito de sódio.

Figura 14. Contagem de Unidades formadoras de colônia das cepas FG3 e *E. coli*:pFG3B submetidas á diferentes concentrações de arsenito de sódio.

Figura 15. Dosagem de arsênio total.

Figura 16. Verificação de atividade da enzima arsenito oxidase.

Figura 17. Análise da morfologia celular examinada por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 18. Verificação de indução de processos redox.

Figura 19. Integridade do DNA genômico de *E. Coli* controle e transformada *E.coli*::pFG3B em gel de agarose após tratamento com concentrações crescentes de arsênio.

Figura 20 Amplificação de região genômica compreendida entre os genes *arsB-arsC*.

Figura 21. Análise da motilidade celular induzida por arsenito e arsenato de sódio.

Figura 22. Mapa circular do cromossomo (A) e plasmídeos (B) de *Serratia liquefaciens* FG3.

Figura 23. Diagrama de Venn destacando os números de genes únicos de cada cepa e *core genome* todos os genomas analisados.

Figura 24. Análise filogenômica determinada a partir das 417 proteínas que fazem parte do *core genome* entre todas as cepas investigadas. Figura 25 Análise de *bidirectional best hit* (BBH) entre os genes que compõe o genoma de SIFG3 em relação aos outros genomas de *S. liquefaciens* e *Serratia proteamaculans* 568.

Figura 25. Diagrama de Venn destacando os genes singletons, flexible e core para os genomas presentes no clado das *S. liquefaciens* (SIATCC27592, SIFDAARGOS e SIHUMV21 e Sp568).

Figura 26. Análise comparativa dos genes de *Serratia liquefaciens* FG3 em relação aos genomas de *Serratia liquefaciens* ATCC27592, *Serratia liquefaciens* FDAARGOS125, *Serratia liquefaciens* HUMV21e *Serratia proteomaculans* 568 de acordo com as classificações funcionais do programa RAST.

Figura 27. Análise de *bidirectional best hit* (BBH) entre os genes que compõe o genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 em relação aos outros genomas de *S. liquefaciens* e *Serratia proteamaculans* 568.

Figura 28. Análise dos genes e vias metabólicas associadas com metabolismo de compostos fenólicos no genoma de SIFG3.

Figura 29. Análise dos sistemas relacionados com internalização de ferro no genoma de SIFG3.

Figura 30. Análise da composição do agrupamento gênico associado com síntese de celulose.

Figura 31. Análise comparativa das vias de metabolismo de enxofre

Figura 32. Degradação do DNA de *Serratia liquefaciens* FG3 quando submetido à condições de estresses induzidas por arsenito de sódio e peróxido de hidrogênio

Figura 33. Provável metabolismo de enxofre em *Serratia liquefaciens* FG3, culminando na síntese de cisteína, servindo de fonte proteínicas dependentes de enxofre.

Figura 34. Análise comparativa referente aos genes relacionados ao estresse oxidativo.

Figura 35. Análise de resistência frente ao peróxido de hidrogênio.

Figura 36. Resistência de *Serratia liquefaciens* FG3 aos danos induzidos por UV.

Figura 37. Análise da composição dos agrupamentos gênicos associados com síntese de metabólitos secundários no genoma de SIFG3.

Lista de tabelas

Tabela 1. Amostras de plantas, solos e isolados bacterianos obtidos.

Tabela 2. Lista de cepas do gênero *Serratia* utilizadas para análises comparativas.

Tabela 3. Caracterização das ilhas genômicas encontradas no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3

Tabela 4. Clusters de genes relacionados a metabolismos secundários preditos no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3.

Resumo

Bioprospecção de bactérias de regiões de canga do Quadrilátero Ferrífero: estratégia de busca de alvos com potencial biotecnológico.

O extrativismo mineral na região do Quadrilátero Ferrífero brasileiro destruiu grandes áreas de terra, dizimando espécies vegetais e sua microbiota associada. Pouco se sabe sobre a microbiota da região. Assim bactérias cultiváveis associadas a plantas e de solos foram investigadas por seu potencial biotecnológico. Amostras foram coletadas de nove espécies de plantas e seis amostras de solos, sendo 65 isolados bacterianos cultiváveis obtidos. Estes representam predominantemente bacilos gram-positivos (70%) capazes de produzir amilases (55%), proteases (63%), celulasas (47%), ácido indolacético (AIA) (46%), sideróforos (26%) e solubilizar fosfato (9%). Além disso, 65% destes foram resistentes à ampicilina, 100% eram sensíveis à tetraciclina e 97% tolerantes a altas concentrações de arsênio. Três isolados foram estudados ainda: o isolado FOB3 (*Rosenbergiella sp.*) produziu altas concentrações de AIA in vitro na ausência de triptofano, demonstrado pela melhora na germinação de planta e taxa de crescimento onde o isolado estava presente. Os isolados C25 (*Acinetobacter sp.*) e FG3 (*Serratia sp.*), tiveram plasmídeos extraídos e inseridos em células de *E. coli*, onde modificaram o perfil fisiológico das cepas transformadas. A cepa *E. coli* :: pFG3B apresentou a maior capacidade de produção de biofilme, além de aumento na taxa de replicação, tolerância ao arsênio e atividade de catalase, além de aumentar a integridade do DNA na presença de arsênio. A cepa *Serratia sp.* teve seu genoma completo sequenciado pela plataforma PacBio sendo identificada como *Serratia liquefaciens* cepa FG3 (SIFG3). Foi identificado um cromossomo de 5,7 Mpb (5398 genes) e dois plasmídeos com 159 Kbp (179 genes) e 125 Kbp (146 genes). A análise comparativa do genoma de SIFG3 foi realizada com 33 outras espécies de *Serratia* com genomas completos e revelou a presença de 18 supostas inserções de fagos, permitindo identificar 311 genes únicos para o SIFG3 e um *core genome* de 417 famílias de proteínas. A análise filogenômica baseada no *core genome* permitiu agrupar SIFG3 em um clado com outras três linhagens de *S. liquefaciens* (FDAARGOS125, HUMV21 e ATCC27592) e *Serratia proteamaculans* 568 (Sp568), que compartilham um *core* de 3998 famílias de proteínas ortólogas. Entre esses cinco genomas, 75 genes são compartilhados apenas em SIFG3 e *S. proteamaculans* 568, ambos isolados de plantas, e 643 famílias de proteínas são exclusivas de SIFG3. A análise desses genes revelou a presença de uma via completa relacionada à degradação de protocatecuato e compostos cloroaromáticos. Além disso, SIFG3 possui um repertório diversificado de genes associados a NRPs / PKS, um conjunto completo de síntese de celulose e metabolismo oxidativo completo e reparo de DNA. Finalmente, SIFG3 ainda possui genes relacionados à tioração de RNA e DNA, inserida em uma região de fago que pode proteger os ácidos nucleicos contra diferentes condições de estresse. Esses achados resumem que o SIFG3 parece estar bem adaptada à diferentes situações de estresse impostas por condições extremas além de ser extremamente interessante no estudo de mecanismos moleculares e composição gênica que pode ser melhor explorado com alto potencial biotecnológico.

Abstract

Bioprospecting of bacteria from canga regions of the Quadrilátero Ferrífero: strategy for searching for targets with biotechnological potential.

The mineral extractivism in the region of the Brazilian Iron Quadrangle destroyed large areas of land, decimating plant species and its associated microbiota. Little is known about the region's microbiota. Thus cultivable bacteria associated with plants and soils were investigated for their biotechnological potential. Samples were collected from nine plant species and six soil samples, of which 65 cultivable bacterial isolates were obtained. These predominantly represent gram-positive (70%) bacilli capable of producing amylases (55%), proteases (63%), cellulases (47%), indoleacetic acid (IAA) (46%), siderophores (9%). In addition, 65% of these were resistant to ampicillin, 100% were sensitive to tetracycline and 97% tolerant to high concentrations of arsenic. Three isolates were also studied: the FOB3 isolate (*Rosenbergiella sp.*) Produced high concentrations of IAA in vitro in the absence of tryptophan, demonstrated by the improvement in plant germination and growth rate where the isolate was present. The isolates C25 (*Acinetobacter sp.*) And FG3 (*Serratia sp.*), had plasmids extracted and inserted in *E. coli* cells, where they modified the physiological profile of the transformed strains. The *E. coli* :: pFG3B strain had the highest biofilm production capacity, as well as increased replication rate, arsenic tolerance and catalase activity, and increased DNA integrity in the presence of arsenic. The strain *Serratia sp.* had its complete genome sequenced by the PacBio platform being identified as *Serratia liquefaciens* strain FG3 (SIFG3). A 5.7 Mpb chromosome (5398 genes) and two plasmids with 159 Kbp (179 genes) and 125 Kbp (146 genes) were identified. The comparative analysis of the genome of SIFG3 was performed with 33 other *Serratia* species with complete genomes and revealed the presence of 18 phage inserts, allowing to identify 311 genes unique to SIFG3 and a core genome of 417 protein families. Phylogenetic analysis based on the core genome allowed to group SIFG3 in a clade with three other strains of *S. liquefaciens* (FDAARGOS125, HUMV21 and ATCC27592) and *Serratia proteamaculans* 568 (Sp568), which share a core of 3998 families of orthologous proteins. Among these five genomes, 75 genes are shared only in SIFG3 and *S. proteamaculans* 568, both isolated from plants, and 643 families of proteins are unique to SIFG3. The analysis of these genes revealed the presence of a complete pathway related to the degradation of protocatechuatus and chloroaromatic compounds. In addition, SIFG3 has a diverse repertoire of NRPs / PKS-associated genes, a complete set of cellulose synthesis and complete oxidative metabolism and DNA repair. Finally, SIFG3 still has genes related to the thioation of RNA and DNA, inserted in a region of phage that can protect the nucleic acids against different conditions of stress. These findings summarize that SIFG3 seems to be well adapted to the different stress situations imposed by extreme conditions besides being extremely interesting in the study of molecular mechanisms and gene composition that can be better explored with high biotechnological potential.

1. Introdução

1.1 Quadrilátero ferrífero

O Quadrilátero Ferrífero (QF) localiza-se na porção centro-sudeste do Estado de Minas Gerais, ocupando uma área aproximada de 7.000 km² (Figura 1). A designação “Quadrilátero” é função do arranjo geométrico de sua morfoestrutura e foi utilizada em 1933 pelo geólogo Luiz Flores de Moraes Rego, para definir a área onde estão concentradas as jazidas de ferro do centro de Minas Gerais (Ataide *et al.*, 2011)

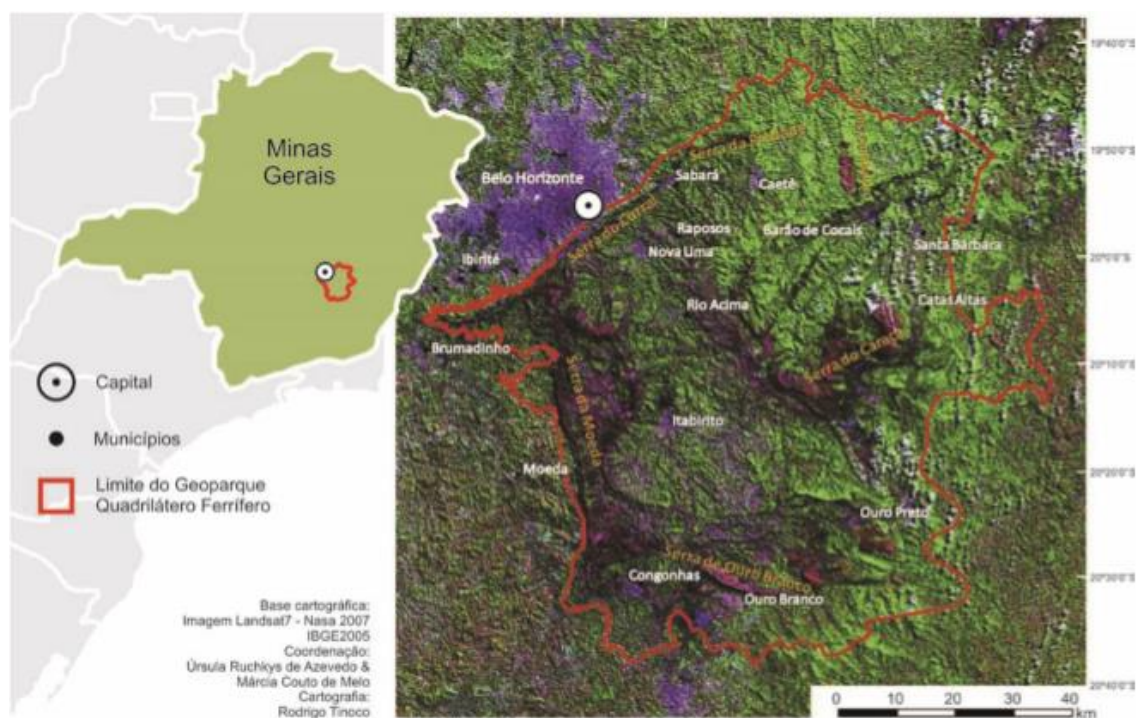


Figura 1. Localização e extensão do Quadrilátero Ferrífero (Fonte: Adptado de Tarso *et al.*, Geoparques do Brasil).

Sua geologia heterogênea fornece uma série de minerais, destacando-se entre eles, principalmente, o minério de ferro, manganês, ouro, topázio imperial, esmeraldas entre outros. Integra, total ou parcialmente, 35 municípios abrangendo uma população estimada em 4.135.951 pessoas (Silva, 2007), sendo estes: Barão de Cocais, Belo Horizonte, Belo Vale, Betim, Brumadinho, Caeté, Catas Altas, Congonhas, Conselheiro Lafaiete, Ibirité, Igarapé, Itabira, Itabirito, Itatiaiaçu, Itaúna, Jeceaba, João Monlevade, Mariana, Mário Campos, Mateus Leme, Moeda, Ouro Branco, Ouro Preto, Raposos, Rio Acima, Rio Manso, Rio Piracicaba, Sabará, Santa

Bárbara, Santa Luzia, São Gonçalo do Rio Abaixo, São Joaquim de Bicas, Sarzedo e Nova Lima (Silva, 2007).

Geologicamente o QF é formado por antigos e complexos terrenos, apresentando uma heterogeneidade de paisagens. De acordo com Jacobi e Carmo (2008) esta heterogeneidade é muito bem demonstrada uma vez que é possível encontrar nesta área, por exemplo, campos cerrados, florestas montanas ou “capões de altitude”, campos rupestres quartizíticos, graníticos e campos rupestres ferruginosos.

Estas áreas, por serem isoladas, de difícil acesso, e por recobrirem importantes depósitos de minério de ferro, os afloramentos ferruginosos estão entre os ecossistemas mais ameaçados e menos estudados (Jacobi e Carmo, 2008). Estes fatos fazem esta área ser considerada de importância biológica especial, pela presença dos campos ferruginosos e de espécies vegetais de ocorrência endêmica desta região (Drummond, 2005).

A atividade mineralógica, apesar de importante, é sem dúvida uma das atividades que mais causa impacto ao meio ambiente, pois consiste fundamentalmente na extração de substâncias minerais do subsolo, sendo, portanto, a principal responsável pelo lançamento de cargas poluidoras. Na região do QF, por apresentar o maior contingente populacional do estado de Minas Gerais, já que agrega os municípios de Belo Horizonte e cidades próximas, os danos causados ao meio ambiente são ainda mais intensos, quando estes córregos e rios que abastecem as bacias que irrigam a região (Nunes, 2012). Dentre as áreas que estão sendo perdidas devido á atividade mineralógica estão as regiões de canga, regiões estas onde foram coletadas as amostras alvos deste estudo.

1.2 Regiões de Canga

As cangas são afloramentos formados há milhões de anos resultante do intemperismo de rochas ferríferas subjacentes (itabiritos e diamititos ferruginosos) e posterior enriquecimento de ferro, resultando em couraças que podem atingir dezenas de metros de espessura e se estender por milhares de hectares (Carmo e Jacobi, 2013).

Nestas regiões, substratos desenvolvidos de itabiritos ricos em ferro mostram o desenvolvimento dos chamados “campos ferruginosos, ou vegetações de canga” (Figura 2). Tais vegetações se distribuem nos platôs mais elevados, principalmente

entre 900 a 1800. Estas áreas de vegetação de canga são colonizadas por plantas que apresentam adaptações a ambientes limitantes como solos rasos, déficit hídrico, baixa fertilidade, alta concentração de ferro oxidado, além de amplitudes térmicas diárias acentuadas, alta incidência de incêndio, e alta exposição solar e ventos constantes (Vincent, 2004; Jacobi, 2007).

A vegetação apresenta inúmeras adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que permitem estas se desenvolverem em tais regiões (Vincent, 2004; Jacobi, 2007). Modificações como a presença de folhas coreáceas ou suculentas, modificações de órgãos em estruturas de reserva e presença de pilosidade densa na folhas e ramos, demonstram a adaptação destas plantas a um ambiente que se mostra tão inóspito à primeira vista (Pereira, 2010).

Além das adaptações intrínsecas das plantas para sua sobrevivência e conseqüentemente seu desenvolvimento e fixação no substrato, a composição microbiana associadas às plantas tem se mostrado um fator contribuinte importante para manutenção destas. Isto porque muitos desses microrganismos contribuem no crescimento e adaptação das plantas, e para tanto são denominadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP).



Figura 2. Vegetação de canga. Fonte: Adaptado de Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil.

1.3 Bactérias promotoras de crescimento de plantas

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (Mariano *et al.*, 2004). As BPCP, podem contribuir para as plantas de através de mecanismos diretos ou indiretos.

1.3.1 Mecanismos diretos

1.3.1.1 Produção de auxinas

Os hormônios vegetais ou fitormônios desempenham um papel de crescimento e desenvolvimento. Quando as plantas encontram condições ambientais limitadoras do crescimento, muitas vezes estas tentam ajustar seus níveis endógenos de fitormônios para diminuir os efeitos negativos exercidos pelo estresse ambiental (Mahanty *et al.*, 2016). Observou-se que os microrganismos da rizosfera também são capazes de produzir ou modular os níveis/síntese de fitormônio em plantas hospedeiras/associadas (Glick, 2012).

Destes, o hormônio produzido mais importante é o ácido indol acético (AIA), sendo o principal precursor para sua biossíntese é o aminoácido o triptofano. Em geral, o AIA afeta a divisão celular de plantas, extensão, e diferenciação, estimula a germinação de sementes e tubérculos, aumenta a taxa de xilema e desenvolvimento da raiz; controla os processos de crescimento vegetativo; Inicia a formação de raízes laterais e adventícias, medeia respostas à luz dentre outros (Mahanty *et al.*, 2016).

1.3.1.2 Fixação de nitrogênio.

O nitrogênio é um dos nutrientes mais vitais para o crescimento e produtividade das plantas. Embora 78% do nitrogênio esteja presente na atmosfera na forma gasosa (N₂), ele permanece indisponível para uso das plantas. Para usar o nitrogênio atmosférico, este deve ser convertido em nitratos ou íon amônio, os quais podem ser facilmente assimilados pelas plantas (Manhaty *et al.*, 2016; Bulgarelli, 2013)

O processo de fixação de nitrogênio é realizado por meio do complexo enzimático nitrogenase, que consiste em duas proteínas, dinitrogenase redutase possuindo ferro como cofator e dinitrogenase possuindo ferro e molibdênio como cofator (Smith *et al.*,2013). A dinitrogenase redutase fornece elétrons e a dinitrogenase utiliza esses elétrons para reduzir nitrogênio para amônia (Santi *et al.*, 2013). Este último por sua vez pode ser protonado a íon amônio dependendo do pH do meio.

1.3.1.3 Solubilização de Fosfato

Outra forma da bactérias atuarem como promotoras de crescimento de plantas, é por meio da solubilização de fosfatos inorgânicos. Apesar de a presença de fósforo estar em grandes quantidades no solo, a maior parte deste é insolúvel e, portanto, se torna inviável na absorção e no crescimento das plantas, uma vez que estas só o absorvem de duas formas solúveis, monobásica e dibásica, ambas hidratadas (Glick, 2012; Manhaty *et al.*, 2016).

A solubilização inorgânica do fósforo ocorre por meio da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, tais como ácido cítrico e ácido glicônico que são sintetizados por diferentes bactérias do solo (Glick, 2012), ou muitas vezes exudados pelas raízes das plantas. Estes pequenos ácidos possuem em sua composição grupos carboxil e hidroxil os quais podem quelar com cátions de fosfato o que resulta na conversão da forma de fósforo insolúvel para fósforo solúvel e disponível (Manhaty *et al.*,2016).

1.3.1.4 Aquisição de ferro.

O ferro é um dos elementos vitais para quase todas as formas de vida; plantas, animais e microrganismos o requerem essencialmente. No ambiente aeróbio, o ferro predominantemente existe como Fe^{3+} e é susceptível a formar hidróxidos e óxidos insolúveis. Assim, a maior parte do ferro não está disponível para assimilação de bactérias e plantas (Rajkumar *et al.*,2010; Manhaty *et al.*,2016).

Em geral, as bactérias adquirem ferro por meio de pequenas moléculas de baixo peso molecular denominadas de sideróforos, os quais possuem grande afinidade pelo íon (Cabaj, 2009). Tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, o ferro é reduzido de Fe^{3+} para Fe^{2+} no citosol e na presença destes sideróforos, que posteriormente são internalizados por meio de complexos contendo

receptores e transportadores especializados, até enfim serem liberados no interior célula. Assim, os sideróforos atuam como agentes solubilizantes de ferro inorgânico ou compostos orgânicos em condições limitantes de ferro disponível para as bactérias (Manhaty *et al.*,2016).

1.3.2 Mecanismos indiretos

Além dos mecanismos com os quais as BPCP contribuem diretamente para o crescimento das plantas, outros compostos também poder ser produzidos, vindo a atuarem como moléculas biocontroles, portanto de maneira indireta no crescimento vegetal.

Um dos mecanismos é a síntese de uma série de diferentes compostos e antibióticos cujo objetivo quando secretados é prevenir a proliferação de outros organismos não ecologicamente adaptados aos nichos específicos, exemplo dos patógenos (Hermosa *et al.*,2012; Mahanty *et al.*,2016; Mariano *et al.*, 2004). Muitos destes compostos têm se mostrados bastante interessantes, pelo mecanismo biológico e espectro de ação e para tanto tem sido exaustivamente estudados e em alguns casos comercializados, como por exemplo o produto Actinovate, fabricado pela Natural Ind. (EUA), tendo como fonte o organismo *Streptomyces lydicus*, sendo utilizado para patógenos habitantes do solo (Hermosa *et al.*,2012; Mariano *et al.*, 2004)

Além da produção destes antibióticos, bactérias que atuam como biocontroladoras, podem produzir enzimas líticas tais como quitinases, celulasas, proteases e lipases, as quais podem as quais podem provocar danos às estruturas celulares de uma série de organismos, em especial fungos, como *Fusarium oxysporum*, por exemplo (Glick, 2012)

Para além disso, os próprios sideróforos previamente descritos, também atuam como mecanismos de biocontrole. Neste sentido, sideróforos produzidos por BPCP previnem que bactérias patogênicas adquiram ferro suficiente para seu crescimento e proliferação. Este se mostra um eficiente mecanismo, uma vez que sideróforos produzidos por BPCP possuem alta afinidade por ferro em relação aos organismos patogênicos (Mahanty *et al.*, 2016; Glick, 2012). Desse modo, a proliferação de patógenos fica prejudicado pela insuficiência de ferro por competição molecular.

As BPCP possuem grande papel na biorremediação em relação aos metais pesados (Dixit *et al.*, 2015). Alguns organismos como *Achromobacter xylosoxidans*, *A. chroococcum*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacillus sp.*, entre outros são alguns exemplos de bactérias que desempenham um papel fundamental na biorremediação de metais pesados. Dois isolados de regiões contaminadas por arsênio na região da Índia se mostraram altamente eficientes em acumular arsênio no interior de suas células (Pandey *et al.*, 2015), sendo este metalóide encontrado em elevadas concentrações na região do QF (Costa *et al.*, 2015)

1.4 Arsênio : Características e distribuição

Arsênio (As) é um metalóide amplamente distribuídos por toda a crosta terrestre, geralmente encontrado em pequenas quantidades em natureza em torno de 5 ug/g (ppm) (Shen *et al.*, 2013). Este metalóide pode ser encontrado em mais de 245 espécies minerais, associado a outros metais como cobre, ouro, chumbo, zinco, prata e antimônio, sendo a forma mineral mais abundante encontrada de arsênio a arsenopirita (Shen *et al.*, 2013).

Sua concentração pode ser muito elevada em certas áreas devido à presença de depósitos geológicos, porém a atividade antropogênica como a mineração, produção industrial de vidro, pigmentos, pesticidas tem elevado a disponibilização deste metal no meio (Morgante e Pastor, 2013; Pandey e Bhatt, 2015). Pesquisas recentes descrevem elevadas concentrações de arsênio na região do QF (Costa *et al.*, 2015; Vicq *et al.*, 2015). A maior das áreas, com elevadas concentrações de arsênio, está localizada na região centro-norte do QF, que por possuir substratos geológicos ricos em arsênio, também é caracterizada por possuir elevado número de mineradoras exploradoras de ouro e ferro nas cidades de Nova Lima, Sabará, Caeté, Ouro Preto, Itabirito, Sabará, Santa Bárbara (Costa *et al.*, 2015; Vicq *et al.*, 2015).

Quimicamente o arsênio pode existir em diferentes formas químicas e estados de valência (As^{-3} , As^0 , As^{+3} , As^{+5}). As duas formas inorgânicas mais comumente encontradas no ambiente são a forma trivalente (As^{+3}), arsenito, a qual é mais predominante em ambientes redutores, e a forma pentavalente (As^{+5}), arsenato, a qual se encontra em maior abundância em condições oxidantes (Morgante e Pastor, 2013), embora não possa ser descartada a presença de suas

formas orgânicas monometiladas (MMA), dimetiladas (DMA) e trimetiladas (TMA). A toxicidade das espécies de arsênio trivalente é considerada superior à das espécies pentavalentes do mesmo elemento (Hughes *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2015).

Já é bem descrito que a exposição ao arsênio pode levar a uma série de problemas respiratórios, cardiovascular, neurológico, dérmicos, reprodutivos e carcinogênicos (Pandey e Bhatt, 2015; Hughes *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de ser um composto altamente tóxico, este foi muito utilizado para o tratamento de sífilis, malária, asma, psoríase, até mesmo para o tratamento de câncer de pele e mama em baixas concentrações (Hughes *et al.*, 2011).

Assim como outros metais, o arsênio e suas diferentes formas, podem exercer efeitos tóxicos deletérios que incluem danos às proteínas, material genético e membranas biológicas, interferência em funções enzimáticas, processos celulares e estresse oxidativo, através de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Silva *et al.*, 2012).

1.4.1 Mecanismos de resistência bacteriana ao arsênio.

A exposição natural de bactérias a metais biodisponíveis essenciais e tóxicos, ocorre a bilhões de anos, e esta exposição tem sido provavelmente o motivo da evolução da capacidade dos microrganismos de controlar níveis celulares destes íons metálicos (Barkay *et al.*, 2010). Desse modo, as bactérias desenvolveram mecanismos para adquirir metais essenciais, controlar os níveis intracelulares e eliminar aqueles que são deletérios (Hobman e Crossman, 2014).

Já é bem descrito na literatura que vários microrganismos possuem uma série de mecanismos moleculares envolvidos na regulação da especiação e na mobilização do arsênio (Sarkar *et al.*, 2013). O arsenato (As^{+5}) entra na célula via transportadores de fosfatos enquanto arsenito (As^{+3}) entra via aquagliceroporinas (Watanabe e Hirano, 2013).

O mecanismo de resistência mais difundido em bactérias estão relacionados com a presença funcional dos operons *ars*, os quais pode estar associados tanto ao DNA cromossomal como plasmidial (Bachate *et al.*, 2009; Kaur e Rosen, 1992) (Figura 3).

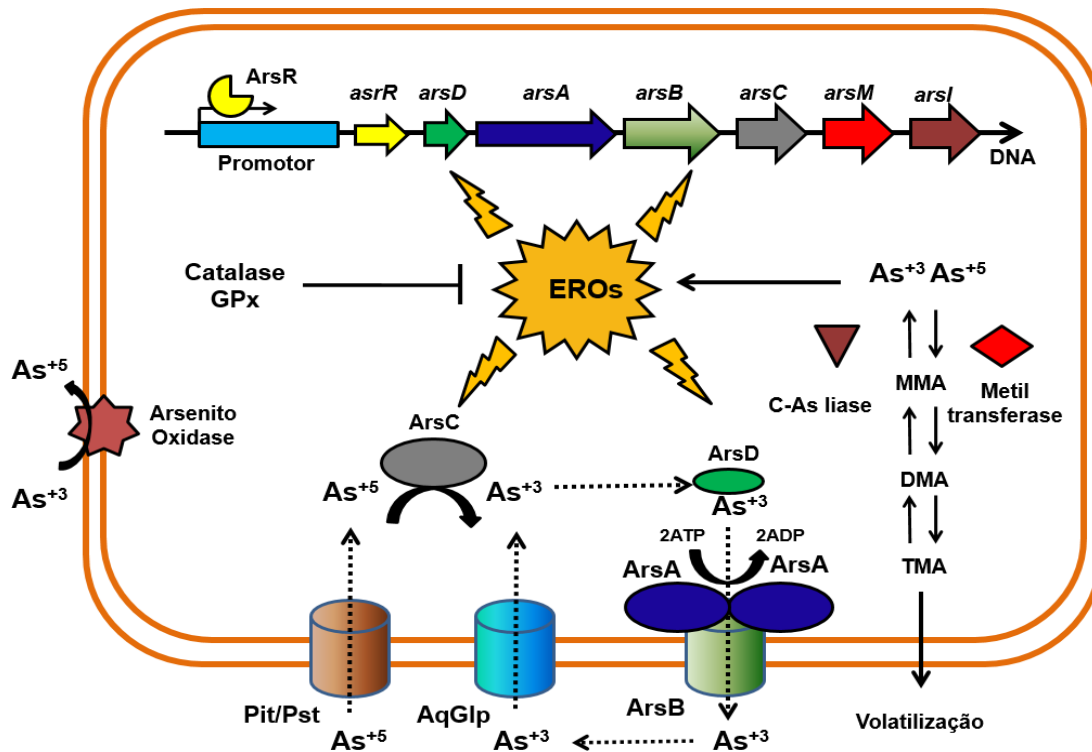


Figura 3. Mecanismos de resistência ao arsênio. Arsênio pode entrar na célula através de transportadores de fosfato ou aquaporinas. Dentro da célula arsênio ativa uma sequência de genes, relacionados á detoxificação deste.

Os dois operons mais comumente encontrados possuem 3 (*arsRBC*) e 5 (*arsRDABC*) genes, respectivamente. O gene *asrR* codifica para um regulador transcricional; *asrB* codifica para um carreador de arsenito membranar; *asrC* codifica para uma redutase que converte arsenato em arsenito; *asrA* codifica para uma subunidade ATPase que aumenta a eficiência da proteína carreadora de arsenito e por fim, o gene *asrD* codifica para uma metalochaperona que direciona o arsenito para a proteína ArsA (Bachate *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2013). Como pode ser percebido, os dois operons citados acima tem como mecanismo base a redução de arsenato em arsenito, com o posterior efluxo de arsenito para fora da célula.

Além desse mecanismo descrito, existem outros pelos quais os microrganismos fazem uso para detoxificação do arsênio. Um destes mecanismos se baseia na oxidação de arsenato em arsenito pela enzima arsenito oxidase, além da metilação do arsênio por uma metiltransferase codificada pelo gene *arsM*, no qual consiste na formação de composto mais voláteis, facilitando a sua eliminação (Zhao *et al.*, 2015).

Pesquisa realizada por Pandey e Bhatt (2015), demonstrou que bactérias isoladas de solos contaminados com arsênio da Índia foram capazes de remover e acumular eficientemente arsênio do meio de cultura dentro de suas células. A literatura demonstra que as bactérias possuem vários artifícios para conviver com arsênio presente no meio, sendo através de reações de oxidação, redução, metilação (Figura 3) e até por bioacumulação (Pandey, 2015).

Descobertas recentes continuam por aparecer quanto aos mecanismos de detoxificação de arsênio. Um novo mecanismo de resistência ao arsenato foi descrito, onde dois genes, *gapdh* e *arsJ* que codificam respectivamente para as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e uma proteína da superfamília facilitadora (MFS), ocorrem juntos como um par na resistência ao arsênio em operons em muitos organismos. Quando os dois genes de *Pseudomonas aeruginosa* são expressas em *Escherichia coli*, estes conferem resistência à As^{+5} mas não às espécies As^{+3} , indicando que a resistência é específica para a forma pentavalente.

2. Justificativa

As vegetações associadas aos afloramentos rochosos no Brasil apresentam-se como formações únicas, com diversas peculiaridades e altas taxas de endemismos e de raridade. Vale ressaltar que é uma região do Quadrilátero Ferrífero com grandes quantidades de metais no solo, o que o torna o ambiente mais inóspito para aqueles organismos que nestes locais se encontram.

Devido às intensivas atividades de mineração, as regiões de canga vêm sendo devastadas, não só espécies vegetais únicas como também possivelmente microrganismos ainda não estudados, que possam vir a contribuir com peculiaridades em seu metabolismo e composição gênica.

A prospecção de microrganismos nessas áreas se mostra um excelente ambiente alvo de estudo para possíveis novas descobertas, como também um melhor entendimento dos processos adaptativos destes microrganismos nestes ambientes inóspitos, e possivelmente, tirar proveito de suas características genéticas para o uso biotecnológico. Desse modo a hipótese deste trabalho é que existem microorganismos com características genéticas e fisiológicas peculiares que possam ter proveito no âmbito da biotecnologia.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Realizar triagem de microrganismos de regiões de canga da Serra da Moeda, Nova Lima, na tentativa de compreender o potencial uso biotecnológico destes recursos biológicos negligenciados em estudos moleculares.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Isolar bactérias cultiváveis de amostras de solo e associadas a plantas das regiões de canga.

3.2.2 Caracterizar os isolados por meio de ensaios bioquímicos,

3.2.3 Avaliar a resistência dos microrganismos em crescer na presença de arsênio e antibióticos.

3.2.4 Realizar ensaios de resistência e remoção de arsênio.

3.2.4 Realizar a identificação de isolados através de sequenciamento da região 16S ribossomal.

3.2.5 Obter o sequenciamento completo do genoma do microrganismo que se destacar entre os demais.

3.2.6 Analisar a composição gênica do isolado sequenciado e realizar análises genômicas comparativas entre outras espécies do mesmo gênero.

3.2.7 Propor ao final dos testes e análises genômicas, genes alvos de futuras pesquisas e aplicações biotecnológicas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Área de estudo e coleta de solos e plantas.

As amostras foram realizadas em cangas localizadas na Serra da Moeda, QF, Nova Lima e Jardim Canadá, Minas Gerais (latitude 20°15'83''S, longitude 43°97'41''W) . Foram coletadas 6 amostras de solos e de nove espécies de plantas: *Lychnophora pinaster* Mart., *Stachytarpheta glabra* Cham., *Baccharis reticularia* DC., *Gomphrena arborescens* L.f., *Symphyopappus compressus* (Gardner) B.L.Rob., *Lagenocarpus rigidus* Nees, *Pleroma heteromallum* D. Don (D.Don), *Peixotoa tomentosa* A.Juss., *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. & Schult.f.. (Figura. 1; Tabela 1).

4.2 Isolamento e preservação dos microrganismos

As amostras vegetais (caules, raízes e folhas) foram lavadas inicialmente com água destilada seguidas de lavagem em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 2 min, e lavagem em etanol 70% por 2 min. Finalmente as amostras foram lavadas com água destilada estéril e colocadas em placas contendo LB sólido (10 g/l NaCl, 10 g/l peptona, 5 g/l extrato de levedura, 15 g/l ágar, pH 7.0) contendo 0,03 mg/l do antifúngico tiofanato metílico. As amostras foram incubadas à 28 °C por 3 a 4 dias para crescimento bacteriano. Colônias isoladas foram coletadas com hastes de madeiras estéreis e posteriormente crescidas em meio LB líquido. Após o isolamento, as suspensões bacterianas foram suplementadas com 30% de glicerol seguida da estocagem a -80 °C.

4.3 Construção de uma placa matriz para os ensaios bioquímicos

Para os ensaios em larga escala foi construída uma placa matriz de 96 wells, na qual todos os isolados foram crescidos em meio líquido LB por 48h a 28 °C, e em seguida transferidos utilizando multi-inoculador para placas de Petri ou de 96 poços de acordo com ensaio bioquímico proposto.

4.4 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

Para analisar a produção de AIA foi utilizado o método colorimétrico adaptado de BRIC *et al.* (1991). Os isolados foram crescidos em placa de 96 poços fundo em U (Costar™) contendo meio de cultura LB enriquecido com 5 mM de L-triptofano por

2 dias a 28 °C. As placas foram centrifugadas a 0,7 x g e 100 µl do sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços. Em seguida, em cada poço foi adicionado 100 µl de solução Salkowski (2 ml FeCl₃.6H₂O 0,5 M/litro de HClO₄) e deixado em repouso por 2 horas. Após este período foi verificada a mudança de coloração de amarelo para avermelhado, indicando a produção do hormônio. Curva de calibração com diferentes concentrações de AIA foi construída e absorvâncias de cada amostra foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro com absorvância a 530 nm.

4. 5 Produção de amilase e celulase

Para determinação da produção de amilase e celulase foram utilizados meio YNB ágar contendo respectivamente 6,7 g/l de yeast nitrogen base, 2,0 g/l de amido solúvel, 0,5 g/l de celubiose, 1 g/l de carboximetilcelulose e 20 g/l de ágar. Os reagentes foram solubilizados em água morna e o pH foi ajustado para 7.0, em seguida autoclavado por 15 min a 120 °C e em seguida vertidos em placas de Petri de 150 x 20 mm. Com uso de multi-inoculador os isolados foram crescidos nesse meio por 24 h a 28 °C. Para revelar a produção de amilases, cobriu-se a placa com uma solução de lugol por 5 min. Após esse tempo, lugol foi descartado e avaliado a produção de alo transparente no meio de cultura (STRAUSS *et al.*,2001). Para revelar a produção de celulases foi adicionado sobre o meio de cultura uma solução de vermelho de congo 0,03% por 10min, seguido de lavagem com uma solução de NaCl 1 M. As bactérias produtoras de celulase formam um alo transparente em fundo vermelho (STRAUSS *et al.*,2001).

4. 6 Produção de sideróforo

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 de sideróforo.

4. 7 Solubilização de fosfato

Para os ensaios de solubilização de fosfato, foi utilizado o meio de cultura NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) (Nautiyal,1999). Os isolados foram crescidos previamente em uma placa matriz contendo meio LB

líquido seguida da inoculação do meio de cultura NBRIP. A avaliação de formação de halo transparente no meio indica a capacidade do isolado solubilizar fosfato inorgânico.

4. 8 Avaliação da tolerância a antibióticos

Os isolados bacterianos foram plaqueados em meio LB sólido contendo ou não 100 µg/ml de ampicilina ou 30 µg/ml de tetraciclina. Após 24 h foi avaliado a capacidade das cepas bacterianas em crescer nos respectivos antibióticos.

4. 9 Tolerância a arsênio

Os isolados foram crescidos em placas de petri (90 x 15 mm) em meio LB sólido contendo arsenito de sódio (NaAsO_2) nas concentrações de 1, 2, e 10 mM.

4.10 Caracterização morfológica

Os isolados foram crescidos em meio LB líquido à 28 ± 2 °C e 150 rpm por 24h e em seguida foi realizada coloração de Gram. Os isolados foram observados em microscópio óptico com aumento de 100 X, sendo então caracterizados com base em sua morfologia e coloração.

4. 11 Curvas de crescimento

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio LB líquido por 12h a 28 ± 2 °C e rotação de 150rpm. A densidade bacteriana foi padronizada para todos os isolados em OD igual 1 (aproximadamente 10^8 células/ ml). Em seguida a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:500 em LB e incubadas à 28°C e 150 rpm, sendo a densidade ótica monitorada ao longo do tempo no comprimento de onda 600 nm.

4. 12 Contagem de Unidades formadora de colônia.

As células foram crescidas em meio LB líquido por 12h a 28 ± 2 °C e agitação de 150 rpm. A densidade celular bacteriana foi padronizada para todos os isolados em OD igual 1 (aproximadamente 10^8 células/ ml). Em seguida a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:500 em meio LB e incubadas à 28°C e 150 rpm em diferentes concentrações de arsenito de sódio sendo monitorada a densidade óptica até alcançar valor igual ou próximo a 1. A suspensão bacteriana foi diluída até

10^{-6} , seguida do plaqueamento de 100 μ l em LB sólido. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por 24 horas e avaliada o número de unidades formadoras.

4. 13 Extração de DNA plasmidial

Uma colônia de um isolado puro foi inoculada em meio LB líquido e incubado a 28 ± 2 °C a 150 rpm por 12h. A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit de extração QIAprep Spin Miniprep Kit. Para visualização do DNA plasmidial extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7%.

4. 14 Transformação bacteriana por eletroporação

Escherichia coli da linhagem Stbl2 (F- endA1 glnV44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 Δ (lac-proAB) mcrA Δ (mcrBC-hsdRMSmrr) λ -) foi inoculada em meio LB líquido a 28 ± 2 °C com rotação de 150 rpm por 12 horas. Foram inoculados 100 ml de LB líquido com 1ml da cultura crescida e a densidade óptica monitorada em 600 nm até alcançar densidade óptica aproximadamente de 0,5. As células foram coletadas e centrifugadas a $1,957 \times g$ por 5 min à 4 °C. Em seguida, o precipitado de células foi ressuspensionado em 50 ml de água destilada estéril gelada e centrifugada como descrito anteriormente por duas vezes. As células foram ressuspensionadas em 10 ml de glicerol 10% estéril gelado, incubadas no gelo por 5 min e centrifugadas como descrito, seguida da adição de 300 μ l de glicerol estéril 10%. Foram utilizados 40 μ l da suspensão de células para cada reação de transformação. Quatro microlitros de DNA plasmidial na concentração de 30 ng/ μ l foi adicionado à suspensão de células e incubado no gelo por 5 min. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida à um pulso de 1,8 kV. Imediatamente 1 ml de meio SOC (2 g/l triptona, 0,5 g/l extrato de levedura, 0,058 g/l NaCl, 0,02 g/l KCl, 0,8 g/l glicose, 40 mM MgCl₂) foi adicionado à suspensão de células e incubado à 28 ± 2 °C overnight. Cem microlitros de suspensão de células de cada reação foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100 μ g/ml ampicilina.

4. 15 Ensaio de estabilidade plasmidial

Ensaio de estabilidade plasmidial foi realizado com base no método de Yao (2015). Células de *E. coli* Stbl2 contendo plasmídeo foram inoculadas em meio LB suplementado com 100 μ g/ml de ampicilina e incubados à 28 ± 2 °C e 150 rpm por 24h. Alíquotas da suspensão bacteriana foram retiradas e normalizadas para

densidade ótica aproximadamente igual a 1 (10^8 células/ ml) seguida de diluições seriadas até 10^{-6} . Cem microlitros da última diluição foram plaqueadas em meio LB sólido, suplementado ou não com antibiótico e após 24h de crescimento as colônias foram contadas. Procedimentos foram repetidos durante 6 dias consecutivos.

4.16 Ensaio de crescimento vegetal

Vinte sementes de tomate Santa Clara 5800 foram semeadas no solo e colocadas a 4 °C durante 3 dias, na ausência de luz para quebra de dormência. Após esse período, foi inoculado no solo 10 ml de água contendo o isolado de interesse em densidade ótica igual a 1. As sementes de tomate foram semeadas em solo preparado com composto, perlita, vermiculita e água nas proporções de 6:4 e transferidas para o Horto Botânico da Universidade Federal de Ouro Preto por 20 dias em condições controladas (26 °C e humidade de 60%). Após esse período, a taxa de germinação foi avaliada e as partes aéreas das plantas foram medidas.

4.17 Ensaio de autoagregação

Ensaio baseado no protocolo de Alamure et al (2010). Culturas dos isolados bacterianos crescidas por 12 horas à 28 ± 2 °C em meio LB líquido foram ajustadas para a mesma densidade ótica igual a 1 e 10 ml de cada cultura foram transferidas para tubos de 20 ml estéreis. Inicialmente todas as culturas foram agitadas vigorosamente por 15 segundos. Os tubos permaneceram estáticos durante todo o tempo do experimento e amostras de 100 µl de cada tubo foram retiradas de aproximadamente 1 cm do topo da cultura e a densidade óptica foi avaliada em 600 nm a cada hora.

4.18 Ensaio de produção de biofilme

Ensaio baseado no protocolo de O'toole (2011). Os isolados bacterianos foram crescidos em meio líquido LB por 12 horas à 28 ± 2 °C. A densidade bacteriana foi padronizada para todos os isolados aproximadamente igual a 1. Em seguida as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em LB líquido e transferidos 100 µl para placa de 96 poços e incubados por 12 h à 28 °C. Após 12h de crescimento, a placa foi lavada com água destilada para retirar as células e deixada secar por 2 h. Em seguida foram transferidos 125 µl de solução de cristal violeta 0,1 % em cada poço e deixado em repouso por 45 min. Após o tempo de

incubação a placa foi lavada novamente com água destilada e deixada secar. Foram adicionados 125 µl de álcool 95% em cada poço deixado em repouso por 45 min para dissolução completa do cristal violeta. A leitura de absorvância foi realizada em leitor de placa (Perkin Elmer VICTOR X3, MA, USA) com comprimento de onda de 550nm. Para cada isolado foram realizadas 7 replicatas.

4.19 Quantificação de arsênio total por Espectroscopia de Fluorescência de Raios X.

Para avaliar se os isolados estariam removendo arsênio do meio de cultura, as células foram crescidas em meio XVM2 (NaCl 1,16 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1,32 g/l, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 5 mM, KH₂PO₄ 0,021 g/l, K₂HPO₄ 0,055 g/l, FeSO₄ 0,0027 g/l, frutose 1,8 g/l, sacarose 3,432 g/l, casaminoácido 0,003 g/l, pH 7,0) suplementado com 1 mM arsenito de sódio por 7 dias. Alíquotas de 1 ml foram coletadas e centrifugadas por 15 min a 5 x g e 500 µl do sobrenadante foram coletados. Para dosagem de arsênio total, foi utilizado a metodologia de Fluorescência de Raio X por reflexão total (S2 PicoFox, Bruker). Dez microlitros da amostra foram colocadas em placas de quartzo e a leitura realizada com 600 segundos de tempo de leitura, corrente de 700 mA e voltagem de 50 kV.

4.20 Microscopia Eletrônica de Varredura e análise por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

As células foram crescidas em meio XVM2 por 72h à 28 ± 2 °C e 150 rpm contendo ou não 1 mM de arsenito de sódio. As células foram coletadas e lavadas com tampão fosfato (pH 7,2) três vezes com centrifugação a 1,957 x g por 5 min. O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato suplementado com 1 % paraformaldeído e 2 % glutaraldeído. Em seguida 100 µl da suspensão bacteriana foram colocados em lâminas e deixado secar por 2 h. As lâminas foram desidratadas em série de etanol 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100 %. As células foram revestidas com ouro para condução elétrica e visualizadas ao microscópio eletrônico (Q150RES, Quorum).

4.21 Ensaio da atividade de Arsenito Oxidase

Ensaio realizado baseado no protocolo de Dey et al., (2016). As células foram cultivadas em meio líquido XVM2 contendo diferentes concentrações de arsenito de sódio à 28 ± 2 °C e agitação de 150 rpm. Ao longo de 7 dias, 500 µl da

cultura bacteriana foram coletados e centrifugados a $5 \times g$ por 15min e 100 μ l do sobrenadante foram misturados a 100 μ l de solução de AgNO_3 0,1 M. A formação de precipitado amarelo indica a formação Ag_3AsO_3 (arsenito de prata (As^{3+})), enquanto a formação de precipitado marrom indica a formação do composto Ag_3AsO_4 (arsenato de prata (As^{5+})).

4. 22 Dosagem de Espécies Reativas Intracelular

Ensaio realizado baseado no protocolo de Kim e colaboradores (2017). As células foram cultivadas até a fase de densidade óptica igual a 1 (10^8 células/ml). Um ml da cultura bacteriana foi coletado e centrifugado a $1,957 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas três vezes com tampão PBS (8,0 g/l NaCl, 200 mg/l KCl, 1,19 g/l Na_2HPO_4 , 200 mg/l KH_2PO_4 , pH 7,2) e centrifugadas como descrito anteriormente. O precipitado de células foi ressuscitado em 1 ml de PBS com concentração final de 20 μ M da sonda Diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). As amostras foram incubadas por 1 h à 37 °C ao abrigo da luz. Em seguida as células foram lavadas com PBS três vezes e ressuscitadas no mesmo tampão com concentração final de 5 mM arsenito de sódio por 1 hora à 37 °C. Posteriormente, 150 μ l da suspensão bacteriana foram colocados em placas de 96 poços e avaliada a emissão de fluorescência em leitor de placa (Perkin Elmer VICTOR X3, MA, USA) com excitação em 485 nm e emissão 535 nm.

4. 23 Avaliação da Redução de Peróxido

Ensaio baseado no método de Aebi (1984). As células foram cultivadas em LB líquido à 28 ± 2 °C e agitação 150 rpm até alcançar densidade óptica aproximadamente igual a 1. Em seguida a cultura bacteriana foi exposta ou não a 5 mM arsenito de sódio por 1h. As células foram coletadas e centrifugadas a $1,957 \times g$ por 15 min, lavadas três vezes com tampão PBS pH 7,2 e o precipitado de células ressuscitado em 3 ml do mesmo tampão. Foram adicionados à suspensão de células pérolas de vidro e o tubo agitado no vórtex 7 vezes por 30 segundos, com intervalos de 30 segundos de repouso no gelo. Um ml do extrato preparado foi coletado e centrifugado a $5 \times g$ por 15 min. Vinte microlitros do sobrenadante foi adicionado à solução de PBS com concentração final de 1 mM H_2O_2 . A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP -220) em

comprimento de onda de 240 nm por 3 min. A dosagem de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4. 24 Verificação da resistência ao peróxido de hidrogênio

As células foram incubadas em meio LB líquido por 12 h a 28 ± 2 °C e agitação de 150 rpm. A densidade celular foi padronizada para todos os isolados em OD igual 1 (aproximadamente 10^8 células/ml). Em seguida a suspensão de células foi diluída na proporção de 1:500 em LB e incubadas à 28°C e 150 rpm com diferentes concentrações de H₂O₂ sendo a densidade ótica monitorada ao longo do tempo no comprimento de onda 600 nm.

Para verificar se a resistência das células ou efeito deletério se dá exclusivamente pela presença de H₂O₂, as células foram crescidas conforme previamente descrito, e as células foram centrifugadas a 1,957 x g por 5 minutos e lavadas com tampão PBS pH 7,2 ou meio líquido LB por 3 vezes. Em seguida as células foram expostas à 1 mM por 45 minutos em LB e Tampão PBS. Em seguida, as células expostas ou não ao peróxido foram incubadas em meio LB líquido por 24 h a 28 ± 2 °C e agitação de 150 rpm. Após tempo de incubação as densidades óticas de cada tratamento foi verificada em comprimento de onda de 600 nm.

4. 25 Integridade do DNA

As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultura LB líquido a 28 ± 2 °C e agitação de 150 rpm até atingirem a densidade ótica aproximadamente igual a 1. Em seguida as culturas foram expostas ou não a uma concentração final de 0,5, 1, 2 e 5 mM de arsenito de sódio por 12 h. Após o tempo de exposição, a densidade ótica foi normalizada para 1. Volume de 1,5 ml de cada suspensão foi coletado e centrifugado a 13,22 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µl de solução contendo 50 mM glicose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0. Foram adicionados 5 µl de proteinase K (20 mg/ml) e 30 µl de SDS 10% (duodecilsulfato de sódio). As misturas foram incubadas a 37°C por 2 h. Em seguida, foi adicionado igual volume de clorofórmio, misturados e centrifugados a 13,22 x g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e adicionado igual volume de clorofórmio e repetido o passo anterior de centrifugação. O sobrenadante foi coletado e adicionado 0,1 volume de NaCl 3 M e 1 volume de isopropanol gelado. A mistura foi deixada em repouso por 3 horas no freezer, e centrifugada por 15 min a

13,22 x g. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi lavado com álcool 70 %. O precipitado foi deixado secar a temperatura ambiente e em seguida ressuspensionado em 100 µl de tampão TE (pH 8,0). A integridade do DNA genômico foi avaliada em gel de agarose 1%.

4. 26 Ensaio de Motilidade

Ensaio baseado no protocolo de Farasin e colaboradores (2017). As culturas bacterianas foram crescidas em meio de cultura LB líquido a 28 ± 2 °C com rotação de 150 rpm até atingirem a densidade óptica igual a 1. Em seguida 10 µl da suspensão bacteriana foram colocados em meio de cultura LB semissólido (0,3 %) contendo ou não 0,2 mM de arsenito ou arsenato de sódio. Após 24 horas de incubação 28 ± 2 °C as placas foram avaliadas e os diâmetros das respectivas colônias foram medidos.

4. 27 Reação em cadeia da polimerase para amplificação de genes de resistência ao arsênio

Cada reação de PCR continha 5 µl de DNA (10 ng/ul), 2,5 µl tampão de reação (10X), 1,5 µl dNTP (10 mM), 2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM), 0,25 µl enzima Taq polimerase (5 unidades/µl), 8 µl da mistura primers Forward (GCTTGGGCATAGGTTGGAGT) and Reverse (GGCTCGACGTTTTTACGCAG) (10 pmol/µl) e quantidade de água suficiente para 25 µl. Os ciclos de PCR foram precedidos de 1 ciclo de desnaturação à 94 °C por 3 min, seguidos de 35 ciclos consecutivos com 45 segundos à 94°C para desnaturação, 45 segundos à 60°C para anelamento e 45 segundos à 72 °C para extensão, seguido por um último passo de extensão à 72 °C por 3 minutos utilizando termociclador Biocycler (Biosystems Ltda).

4. 28 Identificação das cepas por sequenciamento da região 16S ribossomal

Para identificação molecular das cepas FG3, C25 e FOB3, o DNA genômico foi extraído pelo Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega). Para identificar as cepas, um amplicon foi gerado pela técnica de PCR para a região V4-V5 do gene ribossômico 16S. Um volume total de 30 µl de reação foi utilizado 50 ng modelo DNA, 2,5 µl de reação tampão (10 X), 1,5 µl dNTP (10 mM), 2,5 µl $MgCl_2$ (25 mM), 0,25 µl Taq polimerase enzima (5 unidades / µl), 4 µl da mistura de primers

Forward (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e Reverse (CCGTCAATTTYTTTTRAGTTT) (10 pmol / μ l). Os ciclos de PCR foram precedidos por desnaturação a 94 durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos consecutivos com 45 segundos a 94 para desnaturação, 45 segundos a 57 para emparelhamento e 45 segundos a 72 para extensão, seguidos por um passo de extensão final a 72 ° C durante 3 minutos, utilizando 2720 ThermalCycler™ (Applied Biosystems). Os amplicons gerados por PCR foram verificados em géis de agarose a 1% e purificados usando PEG-8000 a 20% em NaCl a 2,5 M (Arbeli e Fuentes, 2007). O produto obtido foi quantificado por espectrofotometria utilizando o NanoDrop ND 1000™ (NanoDrop Technologies). A sequenciação foi realizada com o kit DYEnamic™™ (Amersham Biosciences, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE 1000™ (Amersham Biosciences, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas com 100-150 ng de DNA purificado e os reagentes no kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, EUA), utilizando as recomendações do fabricante. O programa consistiu em 36 ciclos com uma desnaturação inicial a 95 ° C durante 25 min, seguido de 15 s de hibridização a 50 ° C e 3 min de extensão a 60 ° C. Após o ciclo, o produto da reacção foi transferido para um poço de 96 placa de sequenciamento a ser precipitada. Para a precipitação, o protocolo estabelecido foi o mesmo descrito anteriormente por Felestrino e colaboradores (Felestrino et al., 2017).

4. 29 Sequenciamento do genoma

O genoma total de *Serratia liquefaciens* FG3 foi obtido a partir de culturas de 24 horas em meio LB mediante uso do kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo as instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada por NanoDrop 8000 (Thermo Scientific™), e a qualidade foi verificada em gel de agarose 0,8%. O DNA foi armazenado em criotubos e mantidos a -80°C. O material foi enviado para Universidade de Duke (USA) e sequenciado em uma única SMART cell em plataforma PacBio RS II (Pacific Biosciences™). Um total de 188003 reads foi gerado com N50 20800 pb. O genoma foi montado usando os SMRT Analysis pipeline v 2.3.0 (protocolo de montagem RS_HGAP Assembly 2).

4. 30 Anotação do genoma e análises comparativas

Duas anotações foram estabelecidas. A primeira fazendo uso da ferramenta OrthoMCL para determinação das famílias de proteínas ortólogas, estabelecendo um banco específico, de acesso restrito, para estas análises disponíveis em <http://jau.facom.ufms.br/serratia/orthologsorter/>. Para evitar erro de comparação, todos os 33 genomas obtidos a partir do NCBI foram reanotados com o software ProKKA (Rapid Prokaryotic Genome Annotation), só então as proteínas codificadas pelos genes anotados foram então comparadas. Os genomas que compuseram um clado específico a análise comparativa foi realizada utilizando a plataforma online RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) (Azis et al.,2008).

4.31 Análises filogenômicas

Duas análises filogenômicas foram estabelecidas. A primeira comparando o genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 com outras 33 espécies de *Serratia* que apresentavam o genoma completamente sequenciados até novembro de 2016 (Dataset) utilizando da plataforma <http://jau.facom.ufms.br/serratia/orthologsorter/>. A segunda a partir das famílias de proteínas que faziam parte do *core genome* entre as espécies investigadas. Os genomas de *E. coli* K12 cepa MG1655 e *Yersinia enterocolitica* cepa 8081 foram utilizadas como *outgroups*.

4.32 Inserção de Fagos

Para verificar a possível inserção de fagos no genoma em estudo, foi utilizado o programa online PHAST (<http://phast.wishartlab.com>)

4.33 Avaliação da resistência à luz ultra violeta (UV)

As células foram crescidas em meio LB líquido à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação de 150 rpm até atingir densidade óptica aproximadamente igual a 1 (10^8 células/ml). Cem microlitros da suspensão bacteriana foi espalhada em placa de LB sólido e expostas ou não à 30, 60 e 90 segundos de UV. Em seguida, as placas foram incubadas à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e avaliada o crescimento de colônias referente à cada tempo de exposição de UV.

4.34 Fosforotilação do DNA

A células foram crescidas em meio LB líquido à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação de 150 rpm até alcançar a densidade ótica aproximadamente igual 1. Em seguida as células foram tratadas com diferentes concentrações de arsenito de sódio e H_2O_2 por 40 minutos. As células foram centrifugadas a $8000 \times g$ e lavadas duas vezes com LB líquido. O DNA genômico foi extraído pelo kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Oitocentos nanogramas de DNA foram adicionados à 500 ul de tampão TAE 1 X ativado ou não. A ativação do TAE 1X foi realizada aplicando sob ele uma tensão de 65 Volts por 1 hora em cuba eletroforética, sendo o volume coletado bem próximo ao fio de platina do polo positivo (anodo). As amostras foram incubadas à 37°C por 1 hora. Em seguida, 500 ul de isopropanol gelado e 100 ul de NaCl 5 M foram adicionados para precipitação do DNA. Os tubos foram vertidos 3 vezes e deixados em repouso no freezer por 1 hora. As amostras foram centrifugadas por 15 min à 12000 rpm e o sobrenadante descartado. Uma etapa de lavagem foi realizada adicionando 1000 ul de etanol 70 % e descartando o sobrenadante e deixados secar em temperatura ambiente. Os DNA foram ressuspensos em 15 ul de tampão TE e submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 0,5 X e tensão de 65 Volts.

4.35 Produção de Celulose

As células foram crescidas em 25 ml LB líquido por 12 horas à 28°C e agitação de 150 rpm. Cinco ul da suspensão bacteriana foram colocados em LB sólido sem sal (10 g/l peptona, 5 g/l de extrato de levedura, 15 g/l ágar, pH 7.0) suplementado com 40 mg/l de vermelho congo e 20 mg/l de azul brilhante de Comassie (Milavov et al., 2015). Outros 5 ul de suspensão bacteriana foram colocados em LB ágar suplementado com 0,02% de calcoflúor e a fluorescência das colônias foi verificada sob luz UV 365 nm (Gonzales et al., 2016; Leigh, Singer e Walker, 1985)

4.36 Cromatografia em camada delgada

Os isolados foram cultivados em 10 ml de meio M9 mínimo (Na_2HPO_4 12,8 g/l, $7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4Cl 1,0 g/l, MgSO_4 0,24 g/l, CaCl_2 0,01 g/l, e 4 g/l de glicose) a um pH inicial de 7,4. Após 12 horas de incubação a 28°C , as

células foram removidas por centrifugação (8000 x *g*, 10 min). Os sideróforos foram extraídos com 10 ml de acetato de etila, secos e ressuspensos com 10 µl de solução aquosa 50 % de etanol. Os sideróforos foram separados em placas de TLC (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), revestidos com uma camada de 0,25 mm de sílica gel. Antes do uso, as placas foram completamente desenvolvidas com metanol e secas ao ar. Em seguida, foram colocados 10 µl de amostra na placa de TLC em alíquotas de 2 µL. Foi utilizado metanol/acetonitrila (7:3, v/v) como fase móvel e o tanque de desenvolvimento foi acondicionado durante 30 minutos antes da placa ser desenvolvida. Após desenvolvimento, as placas foram secas ao ar. Os compostos de ligação ao ferro foram identificados aspergindo sob as placas de TLC de cloreto férrico 0,05 % em etanol.

4. 36 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote estatístico *GraphPad Prism* versão 5.00 (San Diego, CA). Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Smirnov Kolmogorov e representados como a média ± SEM (erro padrão da média). O teste t de Student foi utilizado para comparar pares de grupos paramétricos enquanto análise de variância One Way ANOVA foi usado para comparar três ou mais grupos com pós teste de Tukey para dados paramétricos, enquanto teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's para dados não paramétricos, considerando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e para $p < 0,001$ (***).

5. Resultados

5.1 Caracterização geral dos isolados

Duas regiões de canga foram selecionadas para a coleta das amostras vegetais e de solo, Canga Mãe d'água e Canga Jardim Canadá, localizadas respectivamente na Serra da Moeda e em Nova Lima. A escolha foi baseada no fato de estarem inseridas em região de proteção extrema para a biodiversidade de flora do estado de Minas Gerais (Figura 4).

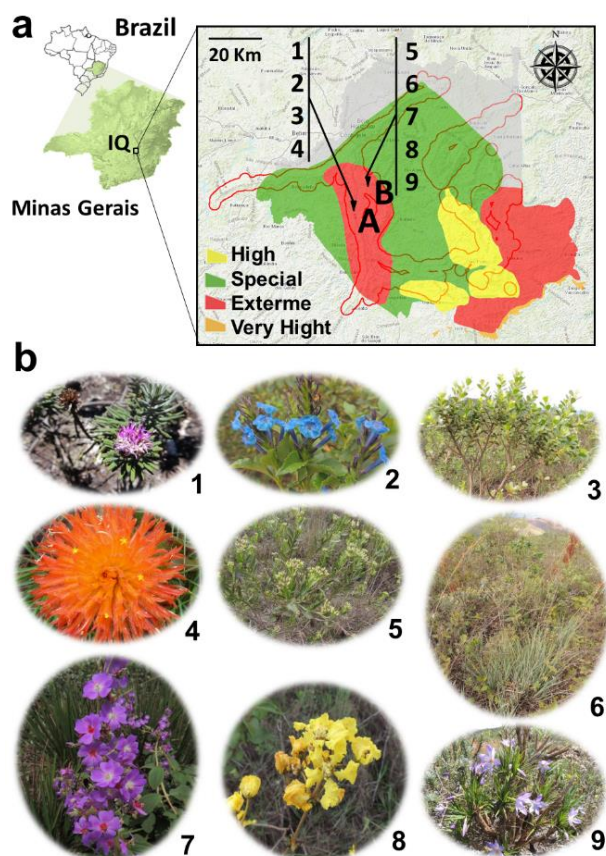


Figure 4. Localização das áreas de coleta das amostras (A) para a caracterização morfológica e bioquímica dos isolados bacterianos obtidos a partir das espécies vegetais e solos da região do Quadrilátero Ferrífero (MG). Os números de 1 a 9 (B) indicam as espécies vegetais amostradas e identificadas na Tabela 1.

A partir de amostras de nove plantas, algumas das quais restritas de canga, dos campos rupestres ferruginosos, e 6 amostras de solos, 65 isolados foram obtidos (Tabela 1).

Tabela 1. Amostas de plantas e solos e isolados bacterianos obtidos.

Amostras de plantas				
ID	Nome científico	Localização da canga	Fonte	Nome dos isolados
1	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FA1
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RA1
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rais	RA2
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RA3
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RA4
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RA5
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rizosfera	RizA1
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rizosfera	RizA2
2	<i>Stachytarpheta glabra</i> Cham.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FG1
	<i>Stachytarpheta glabra</i> Cham.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FG2
	<i>Stachytarpheta glabra</i> Cham.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FG3
3	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FB1
	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FB2
	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FB3

	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	FB4
	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Folha	FoB1
	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Folha	FoB2
	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Folha	FoB3
4	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Folha	FPT1
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	IPT1
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	IPT2
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flor	IPT3
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RPT1
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RPT2
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Raiz	RPT3
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rizosfera	RizPT1
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rizosfera	RizPT2
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rizosfera	RizPT3
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Tuberculo	TPT1
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Tuberculo	TPT2
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Tuberculo	TPT3
	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Tuberculo	TPT4
<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Tuberculo	TPT5	

	<i>Gomphrena arborescens</i> L.f.	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Tubercle	TPT6
5	<i>Symphyopappus compressus</i> (Gardner) B.L.Rob.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RS1
	<i>Symphyopappus compressus</i> (Gardner) B.L.Rob.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RS2
6	<i>Lagenocarpus rigidus</i> Nees	Jardim Canadá (Nova Lima)	Folha	LR1
7	<i>Pleroma heteromallum</i> D. Don (D.Don)	Jardim Canadá (Nova Lima)	Folha	TH1
8	<i>Peixotoa tomentosa</i> A.Juss.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Flor	P1
	<i>Peixotoa tomentosa</i> A.Juss.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Flor	P2
9	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Folha	FCE
	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RCE1
	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RCE2
	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RCE3
	<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RCE4
Amostras de solo				
1	Canga 1	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C11
	Canga 1	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C12
	Canga 1	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C13
2	Canga 2	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C21
	Canga 2	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C22
	Canga 2	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C23

	Canga 2	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C24
	Canga 2	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C25
3	Canga 3	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C31
	Canga 3	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C32
	Canga 3	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C33
4	Canga 4	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C41
	Canga 4	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C42
	Canga 4	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C43
	Canga 4	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C44
	Canga 4	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C45
5	Canga 5	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C51
6	Canga 6	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C61
	Canga 6	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C62
	Canga 6	Jardim Canadá (Nova Lima)	Solo	C63
Total de isolados				65

Uma vez isolados e armazenados em uma placa matriz de 96 poços, uma série de ensaios bioquímicos qualitativos e de caracterização morfológica destes isolados foi realizada. Para estes ensaios, 38 (58,46 %) isolados foram capazes de secretar amilases, 31 (47,69 %) em secretar celulases, 41 (63,07%) em secretar proteases, 30 (46,15%) em produzir AIA, 17 (26,15%) foram aptos a produzirem sideróforos e somente 6 (9,23%) destes isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico. Nenhum dos isolados foi resistente ao antibiótico tetraciclina, embora 44 (64,61%) isolados apresentaram tolerância à ampicilina. Finalmente, 45 (69,61 %) isolados foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1 mM de arsenito de sódio (Figura 5). Em relação à morfologia, 46 (71 %) isolados foram classificados como bacilos, 10 (15%) como cocos e 9 (13,20%) como estreptobacilos, e dentre estes, 53 (81,13%) isolados foram identificados como bactérias gram-positivas e 12 (18,86%) como gram-negativas (Figura 5).

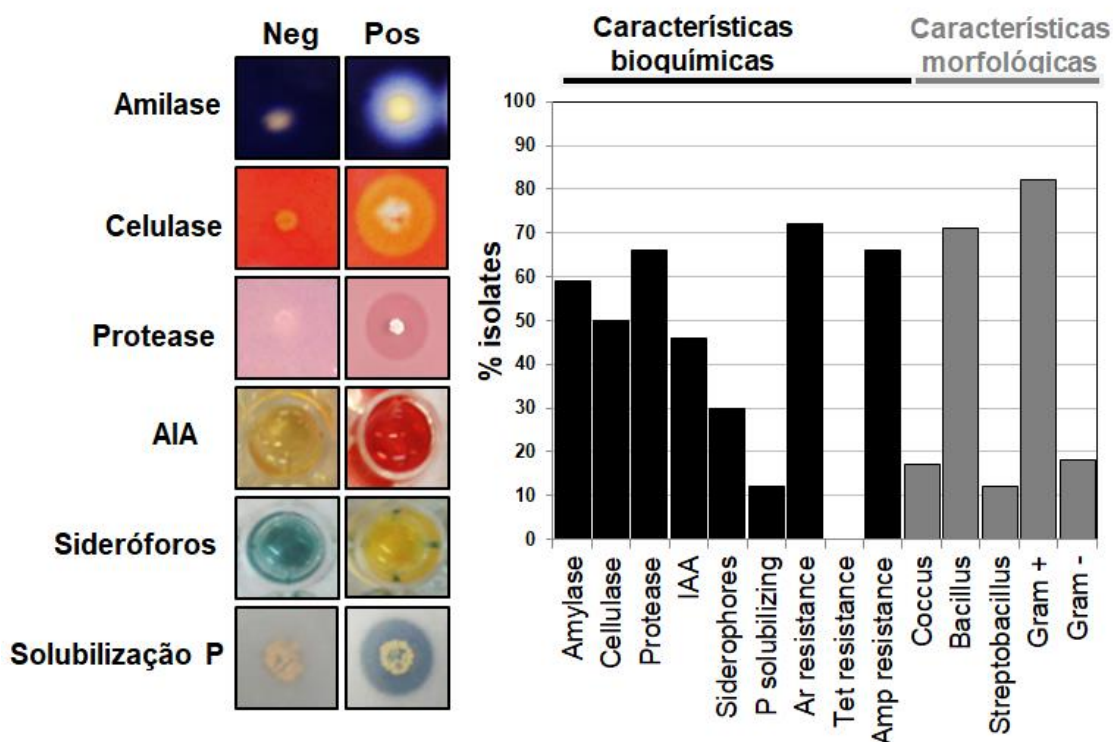


Figura 5. Características bioquímicas e morfológicas dos 65 isolados obtidos.

Com o intuito de verificar o perfil de crescimento *in vitro* destes isolados, 11 foram aleatoriamente selecionados. A partir de uma mesma concentração celular (10^8 células/ml), 10 destes isolados (C25, C33, FOB1, FOB2, FOB3, FG1, FG2,

FG3, FA1, RPT1), apresentaram um perfil de crescimento superior a *E. coli* quando submetidas às mesmas condições de crescimento. Somente o isolado IPT1 apresentou perfil de crescimento igual ou inferior a *E. coli* (Figura 6).

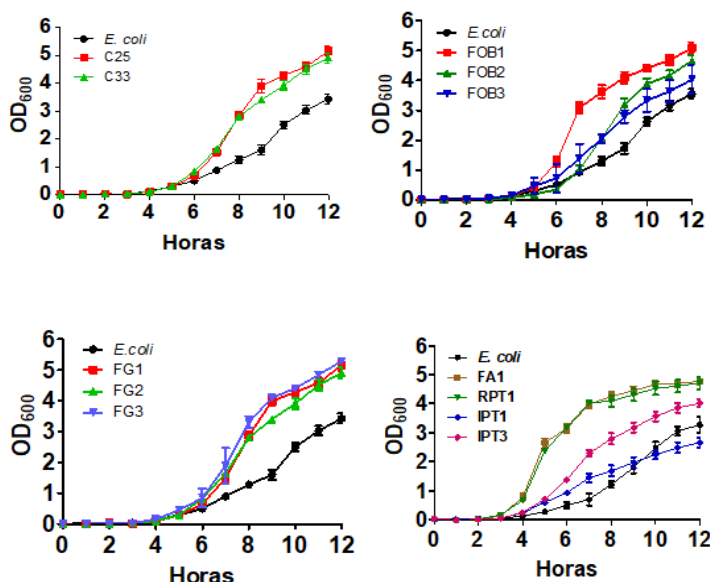


Figura 6. Comparação do perfil de curva de crescimento de diferentes isolados de plantas e solos em comparação ao controle *E. coli*. Os dados foram expressos como a média \pm SEM.

5. 2 Caracterização do potencial biofertilizante dos isolados

Dentre os 30 isolados que apresentaram potencial biofertilizante, 3 isolados (C25, FOB3 e FG3) foram selecionados por apresentarem simultaneamente a capacidade de produzirem sideróforos e AIA. Análise da sequência do gene 16S correspondente para a região V4-V5, mostrou que FG3, C25 e FOB3 correspondem, respectivamente, a *Serratia* não pigmentada (ID MH424466), *Acinetobacter* (ID MH424467) e *Rosenbergiella* (ID MH424468). Estes foram submetidos a ensaios de promoção do crescimento vegetal. Inicialmente foi verificado se a produção de AIA e a taxa de crescimento destes isolados era dependente de triptofano. Foi verificado que os três isolados não apresentaram variação na taxa de crescimento, na presença ou ausência de triptofano (Figura 7A). Ao mesmo tempo, foi constatado que a produção de AIA atingiu um pico de cerca de 30 $\mu\text{g/ml}$ após 96h nos isolados C25 e FOB3, enquanto o isolado FG3 produziu neste mesmo período cerca de 20 $\mu\text{g/ml}$ de AIA na presença de triptofano. Entretanto, na ausência de triptofano, foi verificado que apenas o isolado FOB3

produziu quantidades significativas de AIA (10 µg/ml) com 20 h de cultivo estabilizando sua produção até 96 h. Já os isolados C25 e FG3 produziram apenas 2 µg/ml ao longo de todo o período de cultivo investigado (Figura 7A). Com base nestes resultados o isolado FOB3 foi selecionado como sendo o mais promissor em ensaio de promoção de crescimento vegetal.

Para tal, 20 sementes de tomate foram semeadas na presença e ausência do isolado FOB3 conforme metodologia. As taxas de germinação e alongação de partes aéreas foram verificadas ao longo de 20 dias. Foi observado durante todos os períodos de aferição que o desenvolvimento das plantas de tomate na presença do isolado FOB3 foi mais precoce e se manteve mais eficiente durante todo o período investigado (Figura 7B). Plantas inoculadas com o isolado FOB3 apresentaram 100% de taxa de germinação e 5,81cm de alongação de partes aéreas contra respectivamente 36,7% de germinação e 3,12cm de alongação de partes aéreas nas plantas não inoculadas com este isolado (Figura 7C).

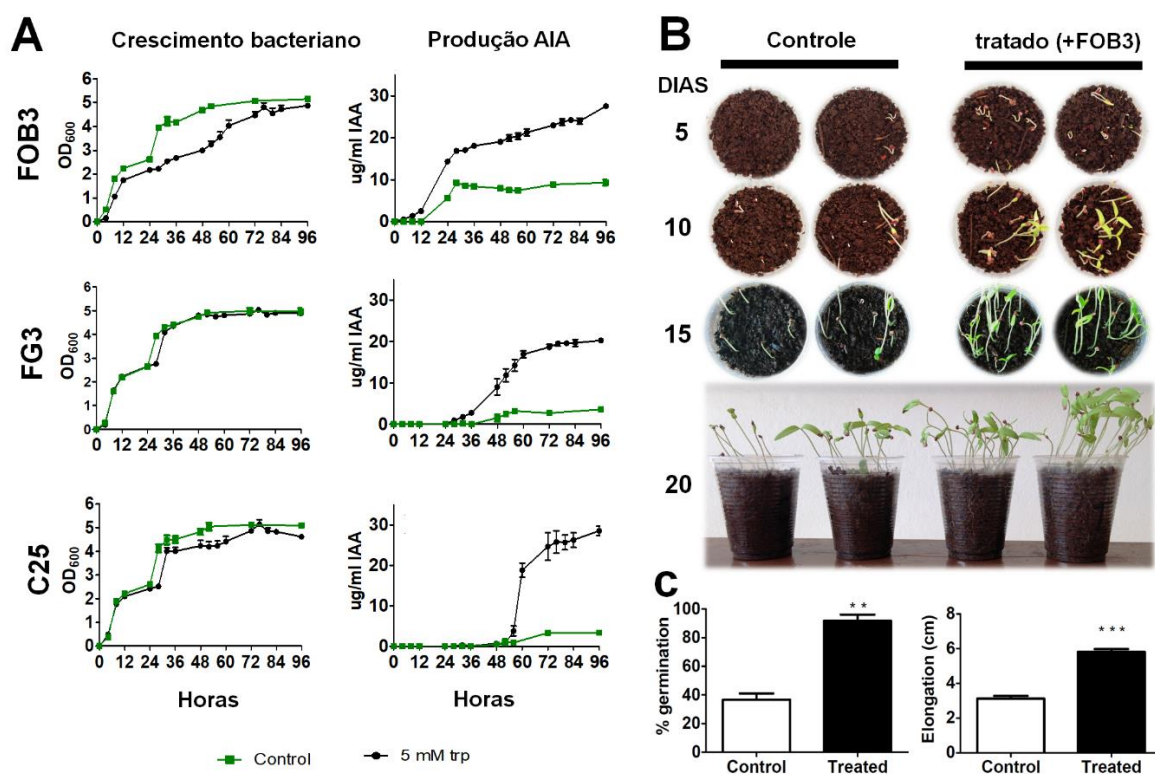


Figura 7. Avaliação do potencial de três isolados bacterianos em atuarem como BPCP. (A) Relação entre curva de crescimento e dosagem AIA na presença e ausência de triptofano (Trp). (B) Sementes de tomate foram crescidas na ausência e presença do potencial bioinoculante FOB3 e avaliadas durante 20 dias. (C) A taxa de germinação e o crescimento

de partes aéreas foram avaliados ao final de 20 dias de incubação. Os valores de p foram determinados por teste t' student e os grupos foram significativamente diferentes quando $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***)).

5.3 Análise do potencial dos plasmídeos

Sabendo que plasmídeos estão relacionados tanto com tolerância à antibióticos quanto a metais pesados, foi avaliado para os isolados FOB3, C25 e FG3 a possível presença de plasmídeos. Foram identificados plasmídeos nos isolados C25 e FG3, mas não em FOB3 (Figura 8A). Na tentativa de compreender potenciais biológicos associados a estes plasmídeos, estes foram inseridos em *E. coli* por meio de eletroporação. As cepas transformadas foram incubadas em meio rico contendo ampicilina e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), e após 24 horas de crescimento foi constatado que o transformante carreando plasmídeo do isolado C25 (*E. coli*::pC25) foi resistente à ampicilina, porém incapaz de degradar X-gal (Figura 8B). O mesmo procedimento foi realizado para o plasmídeo de FG3, no qual foi constatado a presença de colônias brancas e azuis, indicando a possibilidade de existência de dois possíveis plasmídeos. Após isolamento destas colônias, foi verificado dois transformantes diferenciados, que foram nomeados respectivamente de *E. coli*::pFG3A (β -gal⁺ e Amp⁺) e *E. coli*::pFG3B (β -gal⁻ e Amp⁺) (Figure 8C).

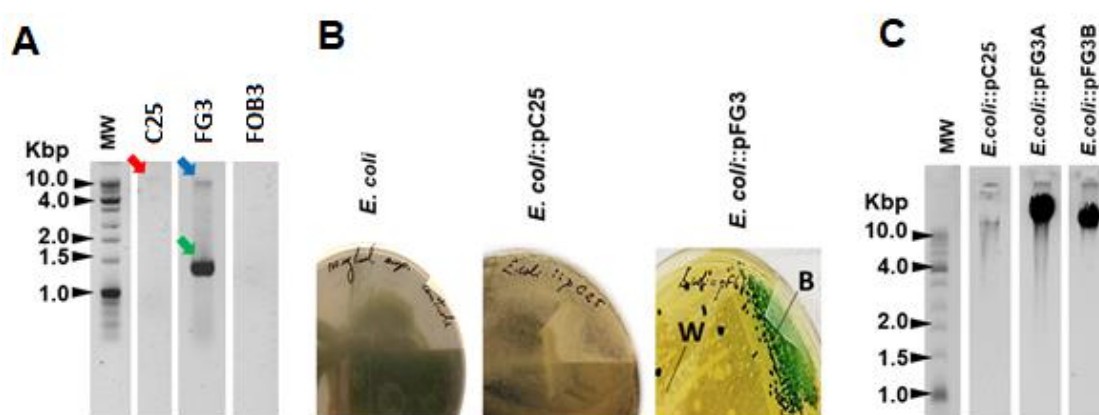


Figura 8. Caracterização dos plasmídeos obtidos a partir dos isolados C25 e FG3. (A) Análise do perfil eletroforético de plasmídeos extraídos de cepas selvagens C25 (seta vermelha) e FG3 em duas condições, relaxado (seta azul) e *coiled* (seta verde). (B) Resultados fenotípicos de *E. coli* transformada com os plasmídeos de C25 e FG3, e incubadas em meio LB suplementado com X-gal e ampicilina. Dois perfis fenotípicos foram

observados para *E.coli*::pFG3, colônias brancas (B) e azuis (W) que sugere a presença de dois plasmídeos distintos na cepa selvagem. (C) Perfis eletroforéticos dos plasmídeos oriundos das cepas de *E. coli* transformadas.

Para avaliar a estabilidade dos plasmídeos nas células transformadas, *E.coli*::pFG3A e *E.coli*::pFG3B foram cultivadas em meio LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/ml), e a cada 24 horas uma amostra destas culturas foi plaqueada em LB sólido contendo ou não antibiótico. Foi observado que mesmo após 6 dias de cultivo (~450 replicações) cerca de 98 e 99% das células transformadas de *E. coli*::pFG3A e *E. coli*::pFG3B, respectivamente, mantiveram os respectivos plasmídeos (Figura 9A). Na tentativa de verificar se a presença dos plasmídeos poderia interferir na taxa de crescimento de *E. coli*, curvas de crescimento com as cepas transformadas foram realizadas. Foi observado que a presença do plasmídeo pFG3B nas células de *E. coli* foi capaz de alterar a taxa de crescimento, atingindo a fase *log* de crescimento mais rapidamente em comparação a *E. coli* controle, resultados estes não observados para a cepa *E. coli*::pFG3A (Figura 9B).

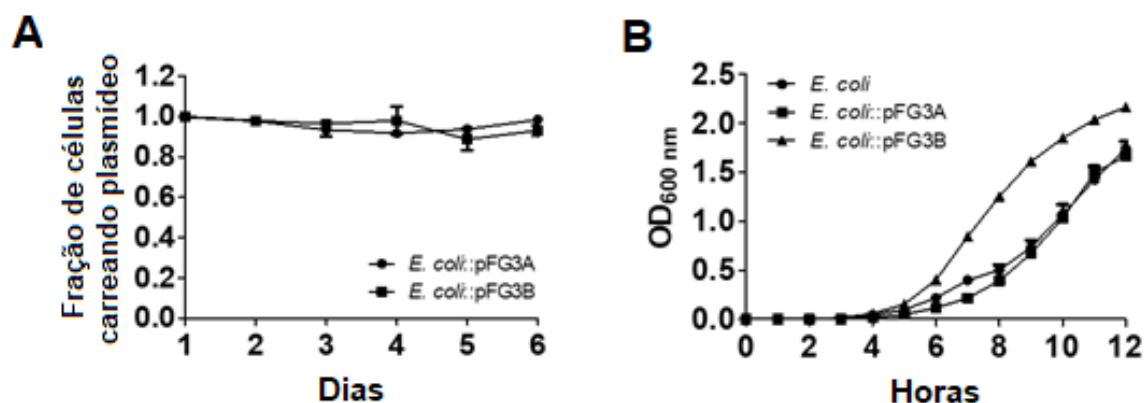


Figura 9. Estabilidade dos plasmídeos extraídos da cepa FG3. (A) Cepas transformadas resistentes à ampicilina e crescidas em meio LB líquido e avaliadas ao longo de 6 dias de repiques. (B) Perfil de curva de crescimento das cepas transformadas em comparação a *E.coli* sob condições normais. Os dados foram expressos como a média \pm SEM.

Ainda objetivando caracterizar o potencial destes plasmídeos, as células transformadas foram avaliadas quanto à produção de biofilme e autoagregação em comparação às cepas selvagens C25, FG3 e *E. coli*. O isolado C25 selvagem e a

cepa transformante *E. coli*::pC25 não produziram quantidades significativas de biofilme (Figura 10A). Em contrapartida, foi observado que o isolado FG3 produz quantidade significativamente superior às cepas selvagens C25 e *E. coli*. Curiosamente, este efeito está associado à presença do plasmídeo pFG3B, uma vez que o transformante *E. coli*::pFG3B apresentou níveis similares ao isolado FG3 selvagem, efeito este não observado para a cepa *E. coli*::pFG3A (Figura 6B).

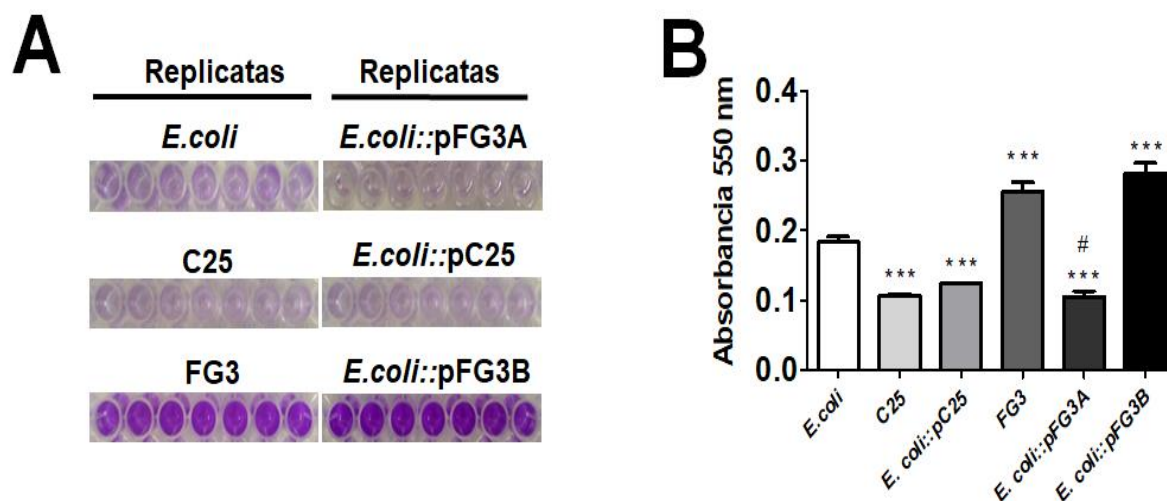


Figura 10. Análise de produção de biofilme. (A) Análise da produção e (B) mensuração da produção de biofilme das cepas selvagens e transformadas incubadas por 12 h e seguida com revelação com cristal violeta (sete réplicas). A produção de biofilme foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda 550 nm. Os valores de p foram determinados por OneWay ANOVA seguido do pós teste de Tukey e os grupos foram significativamente diferentes quando $p < 0,001$ (***) quando comparados com *E. coli* selvagem e $p < 0,05$ (#) quando comparado com FG3 selvagem.

Quanto ao perfil de autoagregação, as cepas *E. coli*::pFG3A e *E. coli*::pFG3B não foram capazes de formar precipitados. Contudo, *E. coli*::pC25 apresentou 73% de suas células agregadas e formou precipitado após 12 horas de repouso (Figura 11A). A produção de biofilme e o potencial de autoagregação foram confirmados através de microscopia, permitindo a observação de uma camada de biofilme na colônia *E. coli*::pFG3B não observada nas outras cepas, e uma maior rugosidade nas extremidades da colônia de *E. coli*::pC25 (Figura 11B).

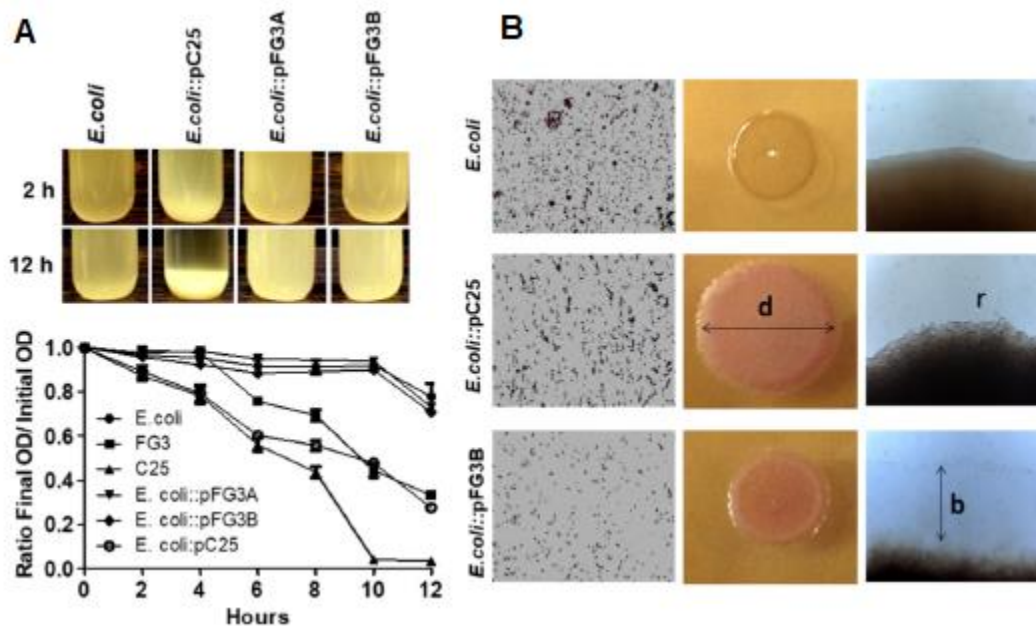


Figura 11. Perfil de agregação celular (A) e análise microscópica (B) das cepas.

5.4 Análise quanto ao perfil de tolerância ao Arsênio

Devido às altas taxas de metais no solo onde os isolados foram coletados, todos os 65 isolados foram desafiados quanto à tolerância ao arsênio. FG3 foi um dos que apresentou maior tolerância à presença deste metalóide (5 mM). Na tentativa de compreender se esta adaptação era dependente de plasmídeo, as cepas transformadas *E. coli::pFG3A* e *E. coli::pFG3B* foram incubadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de arsenito de sódio. Foi verificado que *E. coli* selvagem, bem como *E. coli::pFG3A*, não apresentaram tolerância a altas concentrações de arsenito. Contrastando a estes resultados, a cepa transformada *E. coli::pFG3B* apresentou perfil de tolerância semelhante à cepa selvagem FG3 (Figura 12).

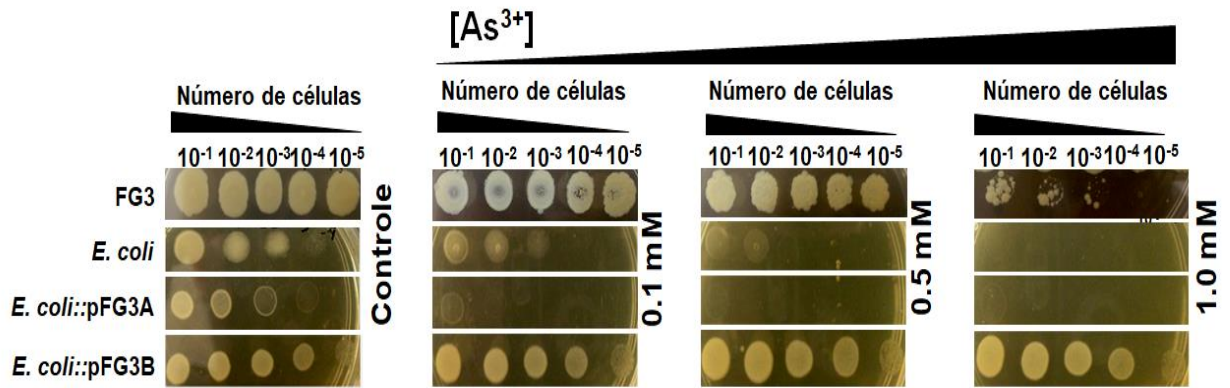


Figura 12. Resistência da cepa selvagem FG3 e das cepas transformantes frente à diferentes concentrações de arsenito de sódio.

Afim de melhor avaliar esta tolerância ao metalóide, curvas de crescimento em diferentes concentrações de arsenito foram realizadas. O isolado FG3 se mostrou capaz de crescer nas concentrações de 1, 2 e 5 mM. É interessante destacar que na dose de 5 mM a cepa apresentou fase *lag* mais longa que nas demais doses testadas e em seguida um perfil de crescimento bastante elevado em comparação com as demais culturas (Figura 13A). A cepa *E. coli*::pFG3B se mostrou mais resistente quando comparado seu perfil de crescimento nas mesmas concentrações de arsenito com o isolado FG3 (Figura 13B). Nota-se que, a cepa *E. coli*::pFG3B apresentou perfil de crescimento praticamente idêntico quando exposta à 1mM de arsenito enquanto *E. coli* selvagem não foi capaz de crescer em nenhuma concentração de arsenito testada (Figura 13B).

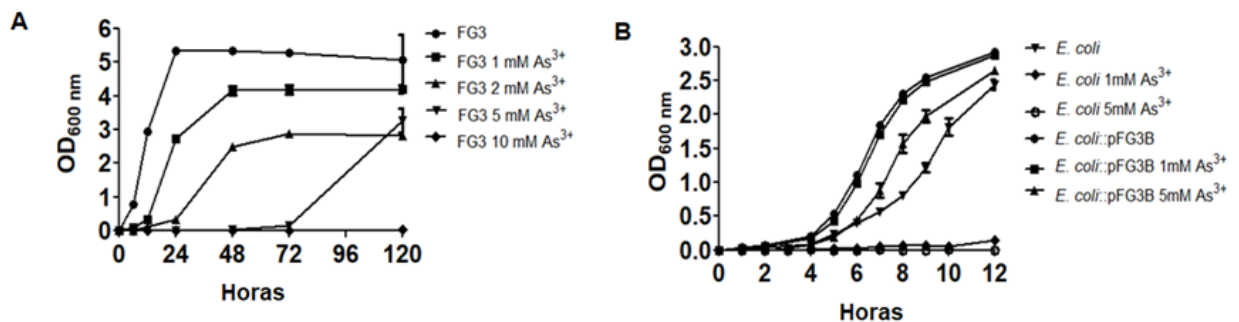


Figura 13. Curvas de crescimento do isolado FG3 (A) e *E. coli* selvagem e transformada (B) em diferentes concentrações de arsenito de sódio.

Para verificar a viabilidade das células, estas foram expostas a diferentes concentrações de arsenito de sódio, e quando atingiram a concentração aproximada de 10^8 células/ ml, as suspensões foram diluídas, plaqueadas e a formação de unidades formadoras de colônia foi avaliada. Foi verificado que FG3 tem a mesma proporção de células viáveis em comparação com o controle nas concentrações de 1 e 2 mM. Entretanto na concentração de 5 mM, esta proporção reduz para aproximadamente metade das células viáveis. No entanto, observou-se que em todas as concentrações de arsenito testado, a proporção de células viáveis permaneceu constante para *E. coli*::pFG3B (Figura 14).

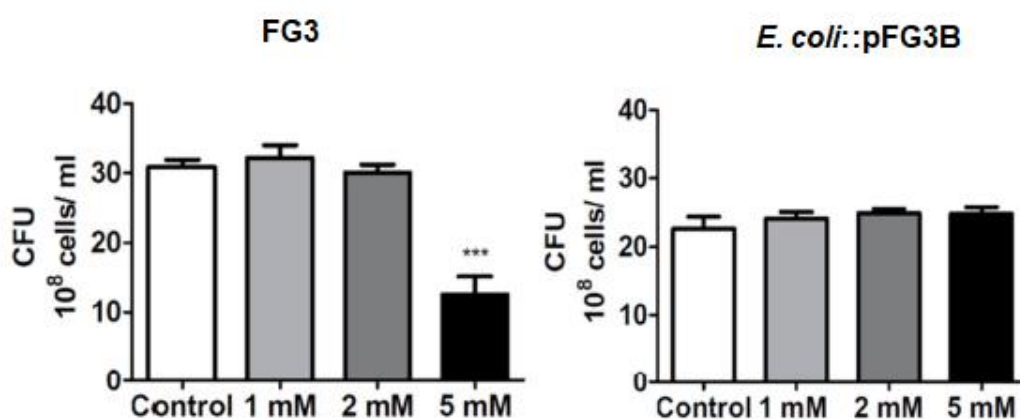


Figura 14. Contagem de Unidades formadoras de colônia das cepas FG3 e *E. coli*::pFG3B submetidas á diferentes concentrações de arsenito de sódio.

Objetivando compreender melhor a relação entre tolerância e capacidade de remoção de arsênio no meio, as cepas FG3 selvagem e *E. coli*::pFG3B foram cultivadas em meio XVM2 suplementado com 1 mM de arsenito. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a dosagem de arsênio total pelo método de Espectroscopia de Fluorescência de Raio X (Figura 15). Os meios de cultura contendo ou não 1 mM de arsenito foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Ao final de sete dias de crescimento a porcentagem de remoção deste metalóide em solução foi quantificada, onde foi constatada uma baixa eficiência na remoção para as cepas FG3 (5,78%) e *E. coli*::pFG3B (2,82 %).

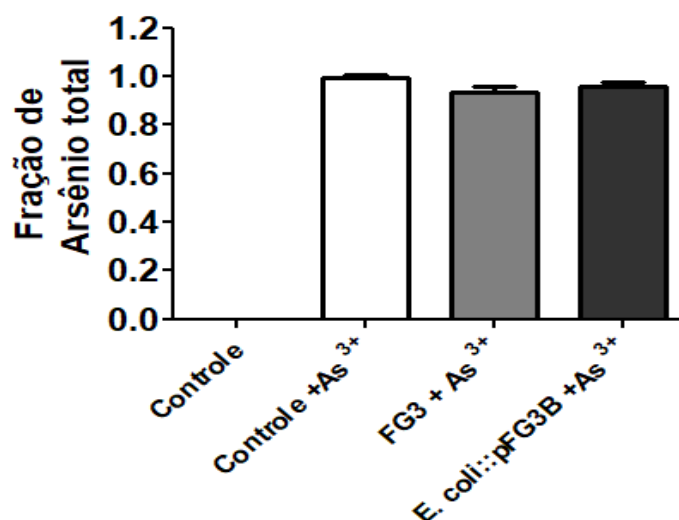


Figura 15. Dosagem de arsênio total. As cepas foram crescidas em meio XVM2 suplementado com 1 mM arsenito de sódio de sódio por 7 dias e a dosagem do arsênio total no sobrenadante foi realizada por espectroscopia de Fluorescência de Raio X. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM.

Uma vez que as cepas são resistentes, mas não removem arsênio, possivelmente podem atuar como biotransformadoras do metalóide em questão. Para verificar esta hipótese, culturas de células FG3 foram crescidas em meio XVM2 contendo diferentes concentrações de arsenito e arsenato. A formação de precipitado de coloração amarela na presença de nitrato de prata indica formação de arsenito de prata (Ag_3AsO_3), enquanto a formação de precipitado marrom, indica a presença de arsenato de prata (Ag_3AsO_4). A figura 16 mostra que com 12 horas de experimento não há a formação de arsenito de prata para a concentração de 1 mM de arsenito, demonstrando que esta espécie sofreu algum processo de transformação. Com 48 horas este resultado se repete para concentração de 2 mM de arsenito, e a partir de 96 horas mais uma vez isso se repete para concentração de 5 mM. Após decorridos 168 horas de cultivo há o completo desaparecimento do precipitado referente à formação de arsenito de prata. Contrastando esta biotransformação de arsenito, nenhuma modificação foi percebida quando FG3 foi crescida na presença de arsenato de sódio, no qual foi observado a presença de precipitado marrom, referente à formação de arsenato de prata, ao longo de todo o experimento.

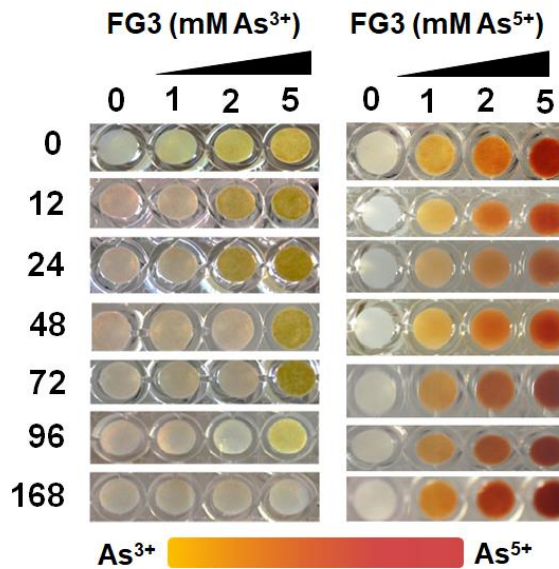


Figura 16. Verificação de atividade da enzima arsenito oxidase. A cepa FG3 foi crescida em meio XVM2 suplementado com diferentes concentrações de arsenito e arsenato de sódio. Ao longo do tempo, amostras foram coletadas e o sobrenadante misturado com solução de 0,1 M de Nitrato de Prata na proporção 1:1.

Para averiguar se a presença de arsênio induz mudança na morfologia das células, as cepas FG3 e *E. coli*::pFG3B foram crescidas em meio de cultura contendo ou não 1 mM arsenito e sua morfologia foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como pode ser verificado na figura 17, nenhuma mudança aparente na morfologia de FG3 ou *E. coli*::pFG3B foi observada. Da mesma forma, análise por Energia Dispersiva de Raio X (EDX) não detectou a presença de arsênio na composição celular de ambas as cepas. Tais resultados corroboram que tanto FG3 quanto *E. coli*::pFG3B não bioacumulam ou adsorvem arsênio em sua membrana.

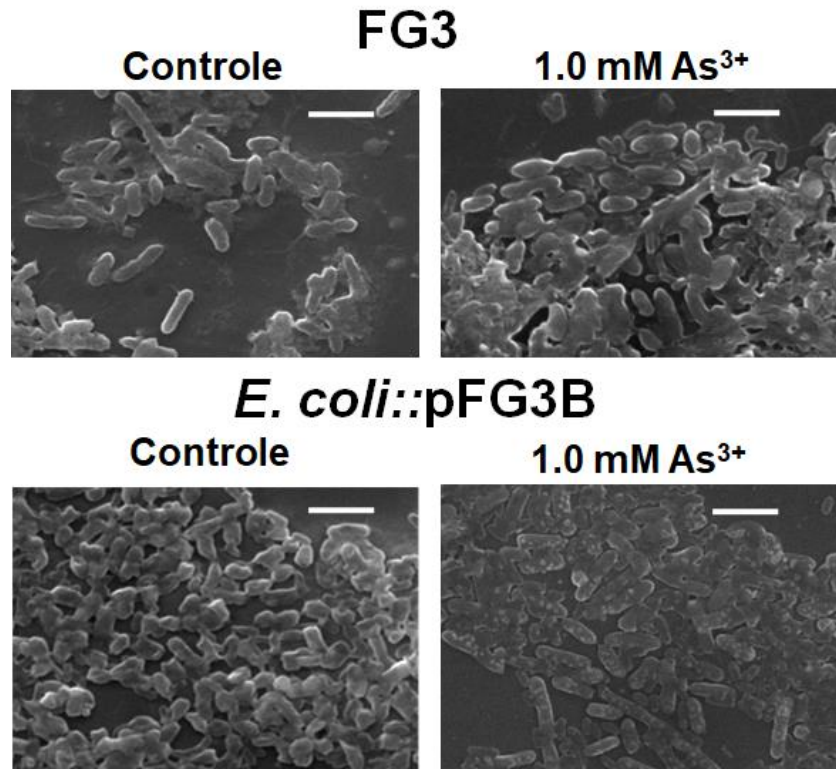


Figura 17. Análise da morfologia celular examinada por microscopia eletrônica de varredura. As cepas foram crescidas em meio XVM2 suplementado com 1 mM arsenito de sódio por 7 e a morfologia celular examinada por microscopia eletrônica de varredura.

5.5 Indução de processos redox

Com o propósito de verificar se a exposição o arsênio induz processos redox nas cepas investigadas, dosagem de espécies reativas, consumo de peróxido (atividade de catalase) e integridade do DNA foram investigadas. Como pode ser observado na figura 18A, a produção de espécies reativas (ERs) se dá em todas as cepas testadas quando expostas ao arsenito de ssódio, no entanto este aumento é mais proeminente (cerca de 2,5 vezes) em *E. coli* em relação nas cepas FG3 e *E. coli*::pFG3B (Figura 18B). Estes dados são corroborados pela avaliação da atividade de catalase nas mesmas condições estabelecidas para os experimentos de dosagem de espécies reativas, indicando que em *E.coli* a indução de processos redox é mais alta do que na cepa FG3 e em *E. coli* transformante (Figura 18B).

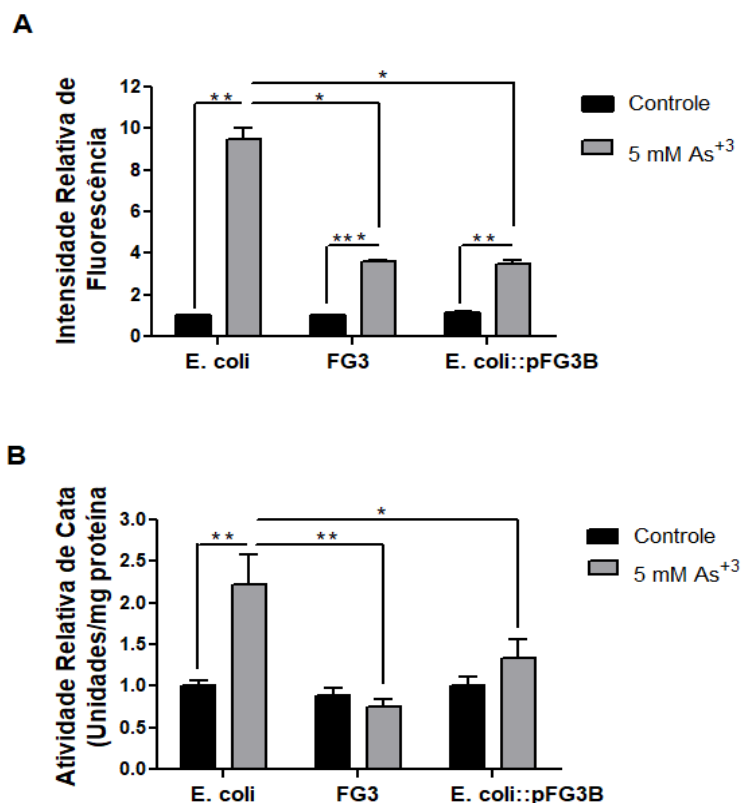


Figura 18. Verificação de indução de processos redox. (A) Produção de espécies reativas oxigênio e (B) atividade de catalase. É possível observar que o perfil de atividade de catalase é proporcional à produção de ERs nas cepas investigadas. Os resultados foram expressos como a média \pm SEM considerando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) pelo teste OneWay ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

Para verificar se ERs intracelulares estariam causando danos à molécula de DNA, a integridade deste ácido nucléico foi investigada em *E. coli* e na cepa *E. coli*::pFG3B quando submetidas à diferentes concentrações de arsenito de sódio. Como demonstrado na figura 19, a exposição de *E. coli* a diferentes concentrações de arsenito elevou progressivamente a degradação do DNA genômico. Por outro lado, em relação a cepa *E. coli*::pFG3B é observado que o DNA se mantém íntegro, mesmo nas concentrações mais elevadas de arsenito.

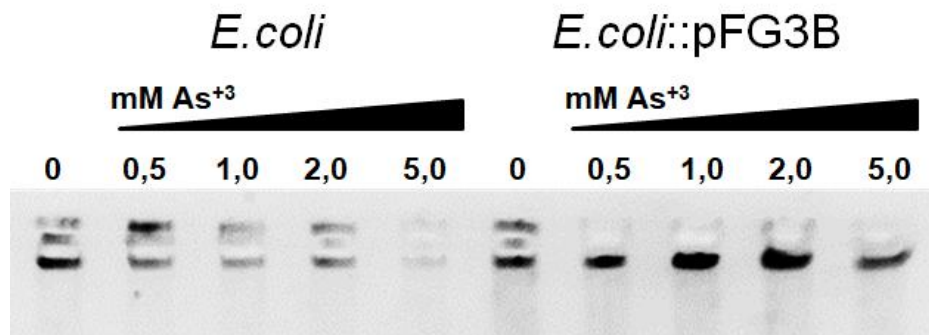


Figura 19. Integridade do DNA genômico de *E. Coli* controle e transformada *E.coli*::pFG3B em gel de agarose após tratamento com concentrações crescentes de arsênio.

Tais resultados anteriores sugerem que a tolerância observada pelas cepas está relacionada com a presença de genes que conferem resistência ao arsênio a tolerância a arsênio conferida pelo plasmídeo pFG3B está relacionado com a presença dos genes *ars*, as cepas de *E. coli* e FG3 selvagens e os plasmídeos das cepas transformantes *E. coli*::pFG3A e *E. coli*::pFG3B foram investigados. Foi detectado produto de amplificação correspondente ao *amplicon* teórico de 1436 pb no DNA genômico de *E. coli* e no plasmídeo pFG3B. Porém, nenhum produto de amplificação foi observado para o DNA genômico de FG3 e no plasmídeo pFG3A, demonstrando que a presença dos genes pertencentes ao operon *ars* está envolvida na tolerância das cepas ao arsênio (Figura 20).

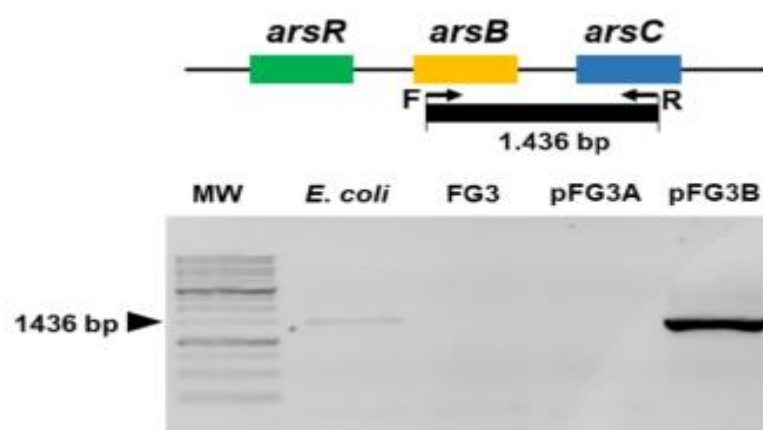


Figura 20. Amplificação de região genômica compreendida entre os genes *arsB-arsC*.

5.6 Motilidade na presença de arsênio

Outra estratégia de sobrevivência das bactérias ao estresse imposto pelo meio é a motilidade celular. As cepas resistentes ao arsênio e *E. coli* foram avaliadas quanto à sua motilidade tipo *swimming* em meio semissólido contendo arsenito ou arsenato de sódio. A motilidade foi avaliada quanto à área de expansão da colônia observada em meio de cultura. Foi constatado que tanto *E. coli* quanto *E. coli*::pFG3B expostas a ambos os sais de arsênio não apresentaram motilidade (Figura 21A). Entretanto foi observado que sob condições normais, FG3 apresentou área superior em relação à *E. coli*, e quando exposta ao arsenito e arsenato aumentou a sua motilidade em relação ao respectivo controle (Figura 21A e 21B).

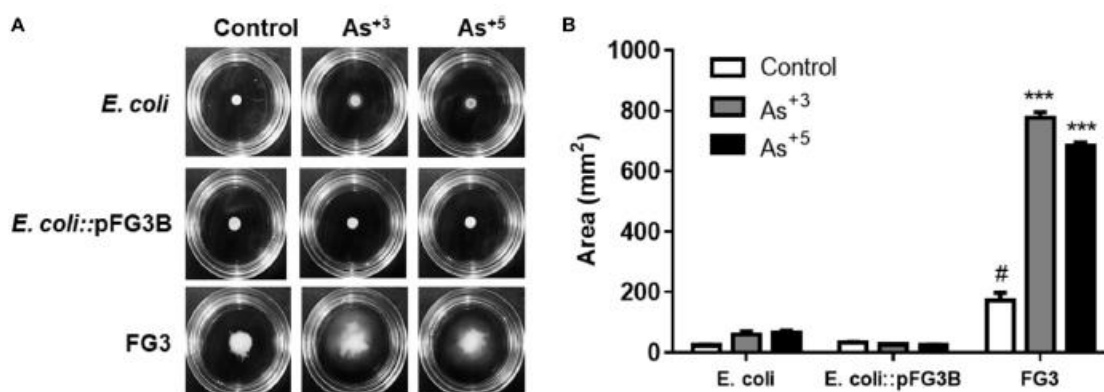


Figura 21. Análise da motilidade celular induzida por arsenito e arsenato de sódio. (A) Imagem ilustrando a motilidade da cepas na presença dos sais de arsênio, seguida da (B) mensuração da área da colônia de cada cepa exposta ao arsenito e ao arsenato de sódio.

5.7 Estruturas e características gerais do genoma da cepa FG3.

O genoma da cepa FG3, identificada previamente como sendo do gênero *Serratia* foi sequenciado a partir de uma única SMART cell por tecnologia de PacBio gerando 188003 reads. O tamanho médio dos reads foi de 13074 (N50 de 20,800 pb, Mean Read Score 0.86 and Average Reference Consensus Concordance 99.99%) Os reads foram montados com uma cobertura de 300 X e resultou num genoma circular de 5706987 pb que codifica para 5398 putativos genes Além disso 2 plasmídeos completos foram obtidos, um contendo 159042 (pFG3A) e outro

contendo 125113 pb (pFG3B) que codificam para 179 e 146 genes, respectivamente (Figura 22). Os dados de sequenciamento corroboram a presença de dois plasmídeos de alto peso molecular descritos anteriormente neste trabalho. As sequências do cromossomo e dos respectivos plasmídeos foram depositados no National Center for Biotechnology and Information (NCBI), registrado sob o código de submissão SUB4782503.

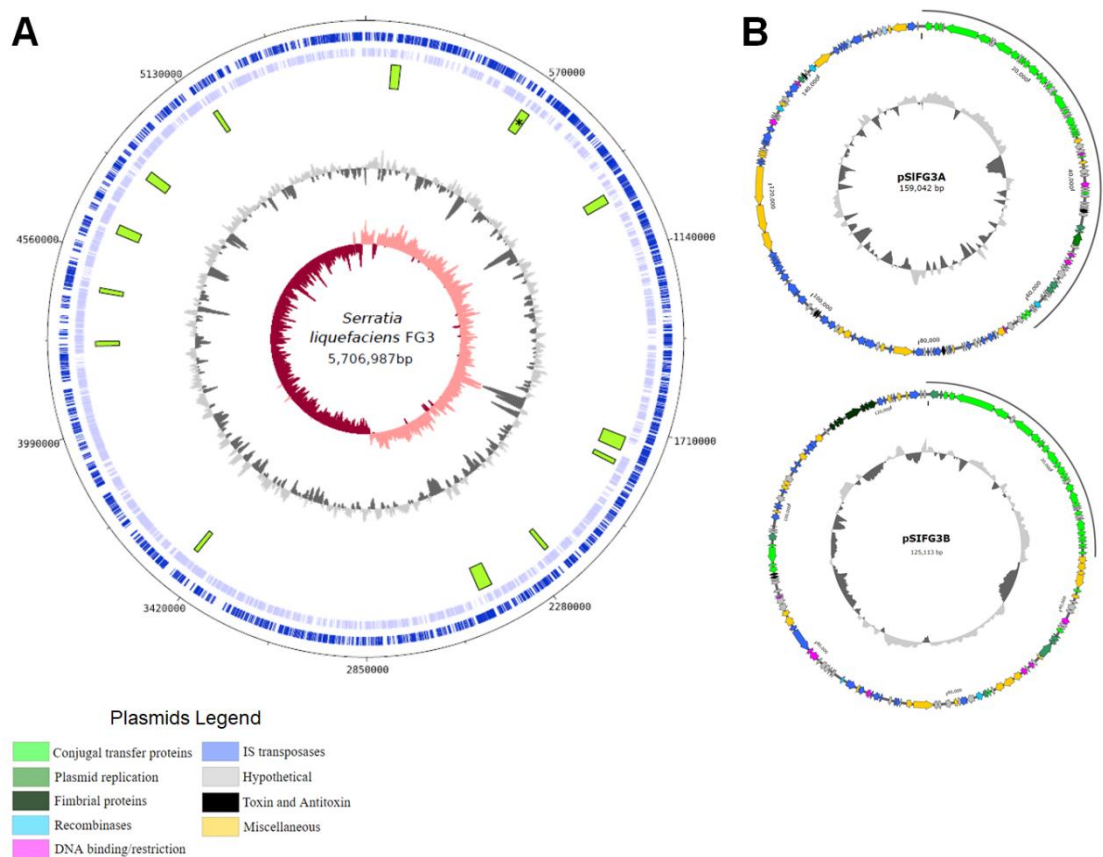


Figura 22. Mapa circular do cromossomo (A) e plasmídeos (B) de *Serratia liquefaciens* cepa FG3. No cromossomo as barras azuis escuras e azuis claras representam os genes anotados respectivamente na fita positiva e negativa. Os blocos em verde determinam as regiões que apresentam intensas variações no conteúdo de GC (cinza escuro) e no conteúdo cumulativo de GC (variação positiva em salmão e negativa em vinho).

5.8 Comparação dos genomas da espécies de *Serratias* e Filogenômica

A comparação genômica foi realizada utilizando outras 33 espécies de *Serratia* com genoma completo disponível nos bancos de dados do NCBI (tabela 2). A partir da determinação de família de proteínas ortólogas, a análise demonstrou que a cepa FG3 possui 311 *singletons* ou genes únicos, representando a sexta maior somatória destes ficando atrás somente de, *S. multitudinisentens* RB25 (652), *S. fonticola* GS2 (497) and DSM4576 (391), *S. odoriphera* DSM4582 (381) e *S. marcences* CAV1492 (362), entretanto a mais representativa no clado das *S. liquefaciens*. Além disso, FG3 compartilha 417 famílias de proteínas com todos os outros genomas analisados, representando o *core* de *Serratia*. Outras 4670 famílias de proteínas ortólogas foram compartilhados entre 1 e os outros genomas (figura 23).

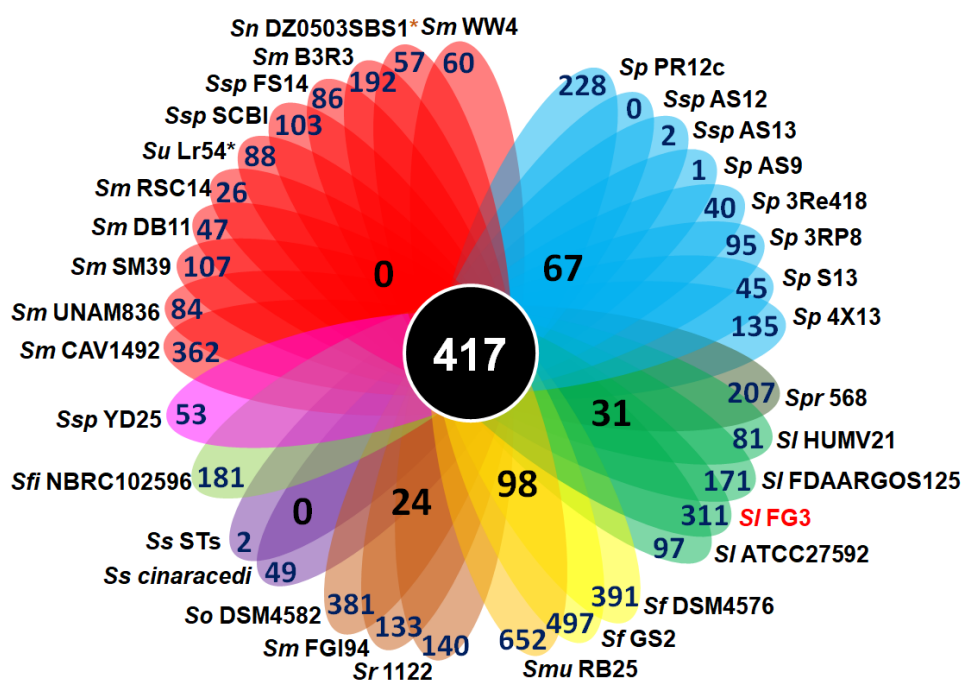


Figura 23. Diagrama de Venn destacando os números de genes únicos de cada cepa e *core genome* todos os genomas analisados.

Tabela 2. Lista das cepas do gênero *Serratia* utilizadas para análises comparativas.

Cepa	Abreviatura	Fonte	Status	Replicon	tamanho (pb)	Proteína	%GC	Referência	Genbank Assembly
<i>Serratia liquefaciens</i> FG3	FG3	Planta	complete	chr	5700987	5.398	0.55	Este trabalho	-
				pFG3A	159042	179	0.54		
				pFG3B	125113	146	0.52		
<i>Serratia ficaria</i> NBRC102596	NBRC102596	Humano	contig	chr	5261721	4.830	0.60	Brouillard <i>et al.</i> , 1984	GCA_001590885.1
<i>Serratia fonticola</i> DSM4576	DSM4576	Água	complete	chr	6000511	5.356	0.54	Lyn <i>et al.</i> , 2015	GCA_001006005.1
<i>Serratia fonticola</i> GS2	GS2	Planta	complete	chr	6100511	5.46	0.54	Jung <i>et al.</i> , 2016	GCA_001514455.1
				pSF001	131551	167	0.50		
				pSF002	93737	118	0.53		
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC27592	ATCC27592	Leite	complete	chr	5238612	4.858	0.55	Tan <i>et al.</i> , 2001	GCA_000422085.1
				p1	44107	35	0.53		
<i>Serratia liquefaciens</i> FDAARGOS125	FDAARGOS125	Humano	complete	chr	5284740	4.954	0.55	-	GCA_001559135.1
<i>Serratia liquefaciens</i> HUMV21	HUMV21	Humano	complete	chr	5326657	4.907	0.55	Lazaro-Diez <i>et al.</i> , 2015	GCA_000975245.1

Cepa	Abreviatura	Fonte	Status	Replicon	tamanho (pb)	Proteína	%GC	Referência	Genbank Assembly
<i>Serratia marcescens</i> B3R3	B3R3	Planta	complete	chr	5471721	5.078	0.59	Xiao-Qiang Wang <i>et al.</i> , 2015	GCA_0014178 65.2
				p1	123171	122	0.52		
<i>Serratia marcescens</i> CAV1492	CAV1492	Clinica (<i>Homo sapiens</i>)	complete	chr	5477084	5.019	0.59	Vicente <i>et al.</i> , 2016	GCA_0010222 15.1
				p199	199444	212	0.51		
				p3223	3223	4	0.56		
				p6393	6393	6	0.53		
				p73	73100	94	0.53		
				pKPC	69158	79	0.49		
<i>Serratia marcescens</i> Db11	Db11	Inseto	complete	chr	5113802	4.680	0.60	Iguchi <i>et al.</i> , 2014	GCA_0005132 15.1
<i>Serratia sp</i> FGI94	FGI94	Fungo	complete	chr	4858216	4.365	0.59	Aylward <i>et al.</i> , 2013	GCA_0003308 65.1
<i>Serratia marcescens</i> RSC14	RSC14	Planta	complete	chr	5127030	4.684	0.60	Kham <i>et al.</i> , 2017	GCA_0012803 65.1
<i>Serratia marcescens</i> SM39	SM39	Humano	complete	chr	5225577	4.779	0.60	Iguchi <i>et al.</i> , 2014	GCA_0008287 75.1
				pSMC1	41517	54	0.61		
				pSMC2	58929	67	0.52		

Cepa	Abreviatura	Fonte	Status	Replicon	tamanho (pb)	Proteína	%GC	Referência	Genbank Assembly
<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	SmUNAM836	Humano	complete	chr	5207023	4.769	0.60	Miranda <i>et al.</i> , 2016	GCA_0012945 65.1
				pSmUNAM836	26346	36	0.44		
<i>Serratia marcescens</i> WW4	WW4	Paper machine aggregates	complete	chr	5241455	4.827	0.60	Chung <i>et al.</i> , 2013	GCA_0003364 25.1
				pSmWW4	3248	3	0.48		
<i>Serratia multitudinisentens</i> RB25	RB25	Landfill	complete	chr	5488183	4.902	0.51	Lim <i>et al.</i> , 2015	GCA_0005200 15.2
<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	DZ0503SBS1	Nematode	contig	chr	5538942	2717	0.60	Zhang <i>et al.</i> , 2009	GCA_0007386 75.1
<i>Serratia odorifera</i> DSM4582	DSM4582	Sputum	scaffold	chr	5267389	4.596	0.56	Tan <i>et al.</i> , 2001	GCA_0001635 95.1
<i>Serratia plymuthica</i> 3Re418	3Re418	Plant	complete	chr	5439574	4.941	0.56	Berg <i>et al.</i> , 2005	GCA_0016631 35.1
<i>Serratia plymuthica</i> 3RP8	3RP8	Rizosphere	complete	chr	5546041	5.024	0.56	Adam <i>et al.</i> , 2016	GCA_0016631 15.1
<i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	4Rx13	Plant	complete	chr	5328010	4.917	0.56	Weise <i>et al.</i> , 2014	GCA_0001768 35.2

Cepa	Abreviatura	Fonte	Status	Replicon	tamanho (pb)	Proteína	%GC	Referência	Genbank Assembly
<i>Serratia plymuthica</i> AS9	AS9	Field samples of rapeseed roots	complete	chr	5442880	4.973	0.56	Neupane <i>et al.</i> , 2012	GCA_0002142 35.1
<i>Serratia plymuthica</i> PRI2c	PRI2c	Maize rhizosphere soil	complete	chr	5474685	5.012	0.56	Garbeva <i>et al.</i> , 2012	GCA_0002610 45.2
<i>Serratia plymuthica</i> S13	S13	<i>Styrian pumpkin</i> anthrosphere	complete	chr	5467306	4.963	0.56	Muller <i>et al.</i> , 2013	GCA_0004388 25.1
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	568	Root endophyte from <i>Populus trichocarpa</i>	complete	chr	5448853	4.997	0.55	Purushotham <i>et al.</i> , 2012	GCA_0000180 85.1
				pSPRO01	46804	75	0.49		
<i>Serratia rubidaea</i> 1122	1122	Sputum	complete	chr	4922834	4.450	0.59	Bonnin <i>et al.</i> , 2015	GCA_0015727 25.1
<i>Serratia sp.</i> AS12	AS12	Rape seed roots	complete	chr	5443009	4.972	0.56	Neupane <i>et al.</i> , 2012	GCA_0002141 95.1
<i>Serratia sp.</i> AS13	AS13	Rape seed roots	complete	chr	5442549	4.974	0.56	Neupane <i>et al.</i> , 2012	GCA_0002148 05.1
<i>Serratia sp.</i> FS14	FS14	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz plant	complete	chr	5249875	4.778	0.59	Li <i>et al.</i> , 2015	GCA_0006959 95.1
<i>Serratia sp.</i> SCBI	SCBI	Nematode <i>Caenorhabditis briggsae</i>	complete	chr	5034688	4.647	0.60	Petersen <i>et al.</i> , 2014	GCA_0007475 65.1
				p1	67208	77	0.55		

Cepa	Abreviatura	Fonte	Status	Replicon	tamanho (pb)	Proteína	%GC	Referência	Genbank Assembly
<i>Serratia sp.</i> YD25	YD25	Rizosphere tabacco farm	complete	chr	5117644	4.724	0.60	Su <i>et al.</i> , 2017	GCA_001642805.2
<i>Serratia symbiotica</i> <i>Cinara cedri</i>	Cinara cedri	Insect <i>Cinara cedri</i>	complete	chr	1762765	739	0.29	Lamelas <i>et al.</i> , 2011	GCA_000238975.1
<i>Serratia symbiotica</i> STs	STs	Insect <i>Tuberolachnus salignus</i>	complete	chr	650317	498	0.21	Lamelas <i>et al.</i> , 2008	GCA_900016775.1
<i>Serratia ureilytica</i> Lr5/4	Lr5/4	Geothermal spring water	contig	chr	5391360	4.982	0.59	-	GCA_000988045.1

Chr –cromossomo; p-plasmídeo

Análise filogenômica estabelecida sob duas metodologias permitiu agrupar a cepa FG3 no mesmo clado das cepas de *Serratia liquefaciens*, seja por concatenação e alinhamento múltiplo das proteínas que representam o *core genome* seja pela sequência consenso dos genomas, organização sustentada pelos valores de bootstrap (Figura 24). É possível observar que as cepas *S. liquefaciens* estão mais próximas de *S. phymuthica* que se distanciam de todas as outras cepas investigadas. O clado que compreende *S. fonticola* e *S. multitudinisentens* RB25 representa o clado ancestral do gênero *Serratia*, e isto corrobora o fato de estes três genomas estarem entre os que apresentam maiores números de *singletons* e ao mesmo tempo o maior número de genes core específico por clado (98).

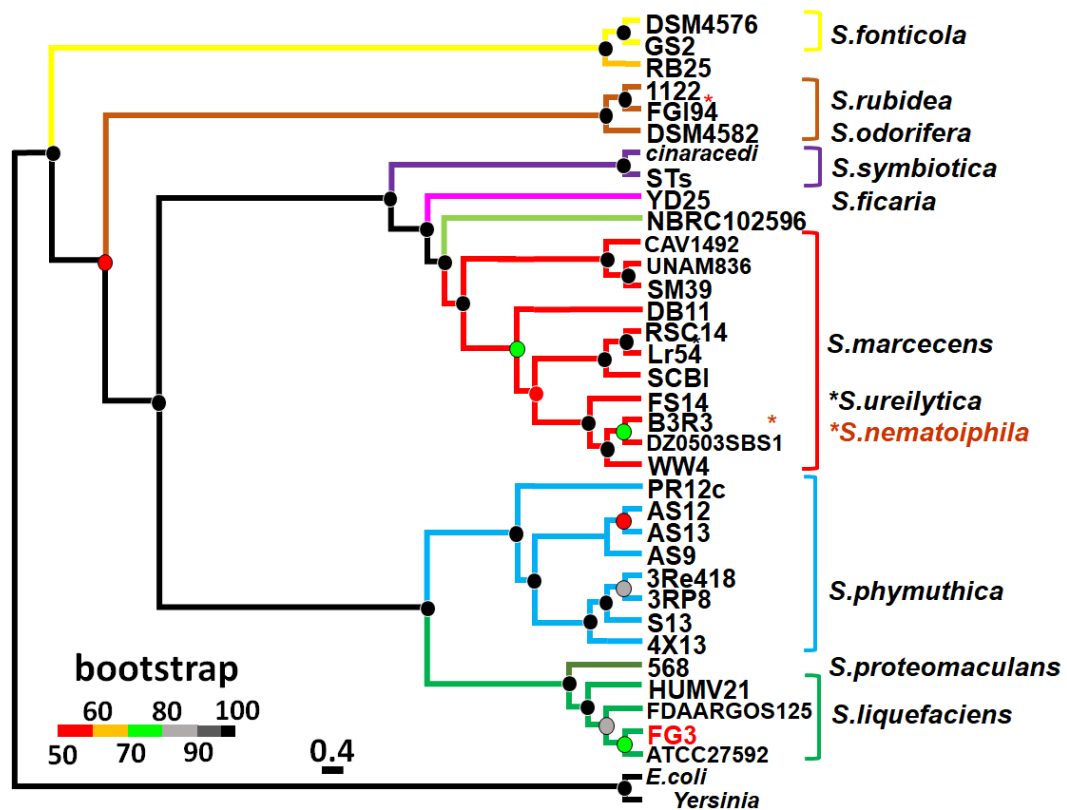


Figura 24. Análise filogenômica determinada a partir das 417 proteínas que fazem parte do *core genome* entre todas as cepas investigadas. Os genomas de *Yersinia enterocolitica* cepa 8081 e *Escherichia coli* K12 cepa MG1655 foram usados como grupos externos de comparação.

Esta análise permitiu visualizar inconsistências na organização taxonômica de outras espécies de *Serratia*, como é o caso de *S. nematoiphila* DZ0503SBS1 e *S. ureilytica* Lr54 agrupando-se no clado das *S. marcescens*, enquanto *S. marcescens* FGI94 se agrupou no clado das *S. odorifera* e *S. rubidea*.

5.9 Comparação genômica do clado que agrupa as cepas *Serratia liquefaciens*

Na tentativa de compreender mais sobre os genes associados ao clado das cepas *Serratia liquefaciens* identificados na figura 24, todas as descrições seguintes foram focadas na comparação entre os cinco genomas que fazem parte deste clado (*Serratia liquefaciens* FG3, *Serratia liquefaciens* ATCC27592, *Serratia liquefaciens* HUMV21, *Serratia liquefaciens* FDAARGOS125 e *Serratia proteomaculans* 568). Análise das famílias de proteínas ortólogas revelou que estes cinco genomas compartilham um *core* de 3998 famílias de proteínas ortólogas. Além disso, 317 famílias de proteínas ortólogas foram identificadas apenas nas cepas de *S. liquefaciens*, estando, portanto, ausentes em *Serratia proteomaculans* 586 (Figura 25).

Ainda com relação às outras espécies que compõe o mesmo clado, em *Serratia liquefaciens* FG3 foram identificadas 516 famílias de proteínas codificadas por uma única cópia gênica e outras 127 famílias de proteínas codificadas por cópias de genes parálogos, 53 (41,7%) das quais compartilhados exclusivamente nos plasmídeos. Além disso, 64 famílias de proteínas são exclusivas do plasmídeo pFG3A, 44 exclusivas do plasmídeo pFG3B, sendo 479 famílias de proteínas exclusivas do cromossomo, das quais 68 associadas com proteínas de fagos.

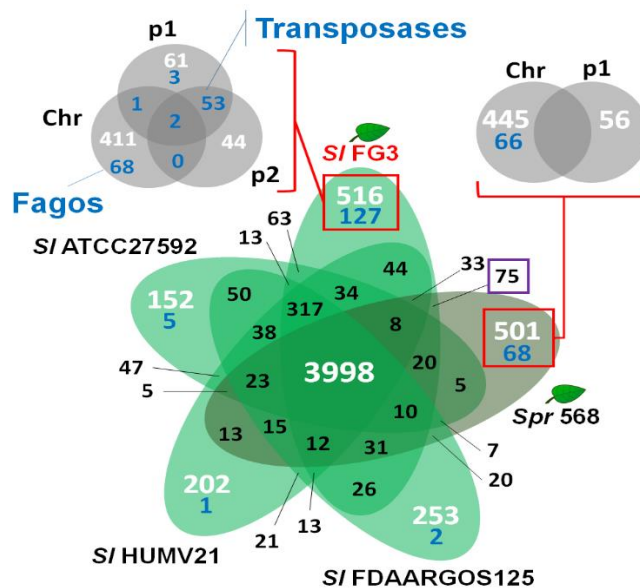


Figura 25. Diagrama de Venn destacando os genes singletons, flexíveis e core para os genomas presentes no clado das *S. liquefaciens* (SIATCC27592, SIFDAARGOS e SIHUMV21 e Sp568).

4.10 Caracterização da distribuição dos genes de *Serratia liquefaciens* FG3 em categorias específicas.

Através da plataforma online RAST, ferramenta capaz de categorizar os genes presentes em um genoma foi possível analisar a distribuição dos genes da cepa *Serratia liquefaciens* FG3, além de ser possível realizar uma comparação entre as outras cepas do clado que a compreende. Como é possível se verificar na figura 26, os genes foram agrupados de acordo com sua funcionalidade em 27 categorias específicas, sendo Categorias: 1 - Aminoácidos e Derivados (531); 2 - Carboidratos (693); 3 - Divisão e ciclo celular (42); 4 - Parede celular e cápsula (193); 5 - Cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos (292); 6 - Metabolismo de DNA (128); 7 - Dormência e esporulação (3); 8 - Ácido graxos, lipídeos e isoprenóides (162); 9 - Metabolismo e aquisição de ferro (110); 10 - Transporte membranar (183); 11 - Metabolismo de compostos aromáticos (95); 12 - Miscellaneous (50); 13 - Motilidade e quimiotaxia (86); 14 - Metabolismo de nitrogênio (44); 15 - Nucleosídeos e nucleotídeos (149); 16 - Fagos, profagos, elementos transponíveis e plasmídeos (148); 17 - Metabolismo de fósforo (73); 18 - Fotossíntese (0); 19 - Metabolismo de potássio (37); 20 - Metabolismo de proteína (295); 21 - Regulação e sinalização celular (168); 22 - Respiração (171); 23 - Metabolismo de RNA (252);

24 – Metabolismo secundário (8); 25 – Resposta ao estresse (183); 26 – Metabolismo de enxofre (68); 27 – Virulência e defesa (126). Em 24 categorias não foram observadas substanciais diferenças na distribuição dos genes, entretanto, foi verificado que para as categorias específicas de Metabolismo de DNA, Metabolismo de Compostos Aromáticos e para Inserção de Fagos existe notória diferença entre as cepas avaliadas. Cada categoria em evidência será melhor descrita e avaliada a seguir.

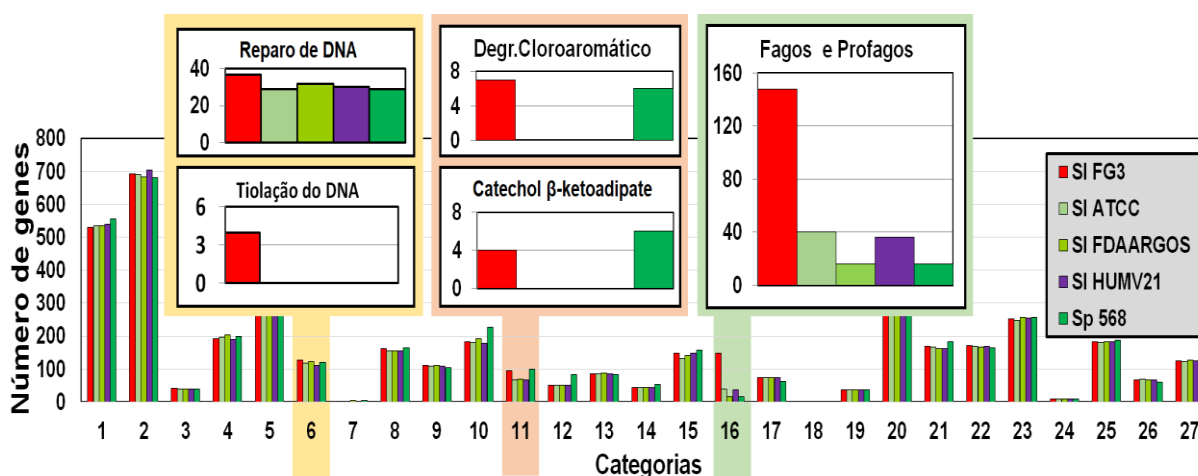


Figura 26. Análise comparativa dos genes de *Serratia liquefaciens* FG3 em relação aos genomas de *Serratia liquefaciens* ATCC27592, *Serratia liquefaciens* FDAARGOS125, *Serratia liquefaciens* HUMV21e *Serratia proteomaculans* 568 de acordo com as classificações funcionais do programa RAST.

5.11 Ilhas genômicas e inserção de fagos

Análise comparativa do genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 com os outros quatro organismos que se agruparam em mesmo clado revelou que seu genoma apresenta o maior número de genes relacionados a fagos (148) em comparação com as outras cepas, sendo *Serratia liquefaciens* ATCC27529 (40), *Serratia liquefaciens* FDAARGOS125 (16), *Serratia liquefaciens* HUMV21 (38) e *Serratia proteamaculans* 568 (16). Os genes de fagos presentes na cepa FG3 foram agrupados em diferentes categorias conforme classificação do programa RAST, sendo estes baseplate (4), replicação (9), maquinaria de empacotamento (21), lise

(6), síntese de DNA (1), proteínas de cauda (63), proteínas de capsídeo (20) e proteínas de fibra de cauda (24).

Com relação às ilhas de transferência lateral 18 possíveis inserções de fagos, 13 das quais em concordância com o programa PHAST, foram localizadas no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 (Figura 27). A caracterização de cada uma destas regiões está descrita na tabela 3. Na tabela é possível observar que em cinco delas há a presença de tRNA na borda externa; que nas 18 foram encontradas integrases associadas, quatro apresentando genes de toxinas e antitoxinas, e 14 apresentando algum gene associado com reparo de DNA. Destaque se dá para as ilhas 3 e 7 que possuem uma cópia do gene *recT* cada, e para as ilhas 12, 15 e 16 que apresentam uma cópia cada do gene *radC*. No caso da ilha 15 adicionalmente estão inseridos os genes associados com fosforotilação do DNA (*dndBCDE* e *dptFGH*) (Figura 27). Análise comparativa do programa RAST permitiu demonstrar pela análise Bidirecional Best Hit (BBH) alto grau de conservação entre os genes das cepas *Serratia liquefaciens*, apresentando menor grau de conservação com a cepa *Serratia proteamaculans* 568 (Figura 27)

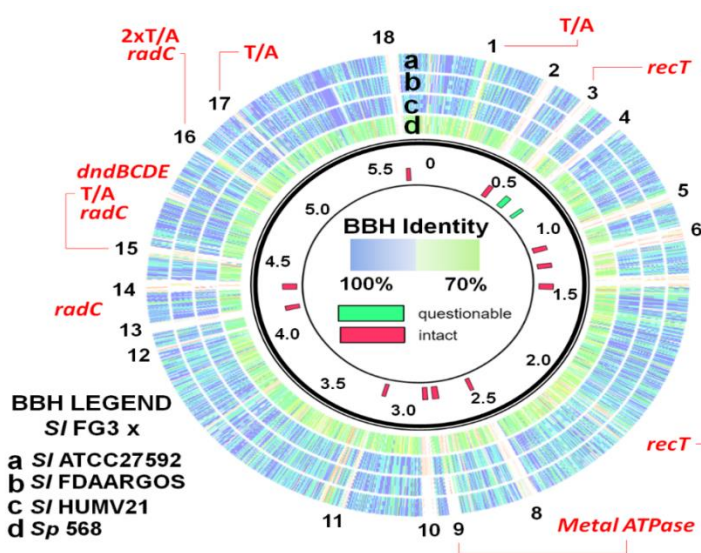


Figura 27. Análise de *bidirectional best hit* (BBH) entre os genes que compõe o genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 em relação aos outros genomas de *S. liquefaciens* e *Serratia proteamaculans* 568. As cores variam de azul escuro (100%) a verde claro (70%), sendo o grau de conservação das sequências. Os números indicam a posição de cada ilha de transferência lateral no genoma da cepa FG3.

Tabela 3. Caracterização das ilhas genômicas encontradas no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3

Ihas	Início	Fim	Genes	Único	Proteína de fago	Hip.	Localização no genoma	tRNA	Int.	Rec.	Toxina/Antitoxina	Adaptação e Virulência
1	146	161	16	6	2	11	158124 – 182328	UP	UP	UP	AntA/AntB	-
2	345	387	43	27	14	25	395013-426867	DOWN	UP	-	-	Methyl-directed Repair DNA adenine methylase
3	482	527	46	34	19	18	537838-578350	-	UP	-	-	<i>recT</i>
4	612	648	37	27	15	19	671907-701030	-	UP	-	-	Membrane protein related to metalloendopeptidases
5	926	967	42	23	24	12	1004064-1047616	-	UP	-	-	Virulence protein msgA
6	1055	1112	58	46	23	34	1146868-1189430	DOWN	DOWN	-	-	-
7	1235	1284	50	33	22	28	1317790-1362967	-	UP	-	-	<i>recT</i>
8	2229	2282	54	35	16	30	2349558-2396745	UP	DOWN	-	-	-
9*	2484	2524	41	6	28	11	2606518-2642392	-	DOWN	-	-	Methyl-directed Repair DNA adenine methylase; Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase; Copper translocating P-type ATPase
10	2561	2609	47	20	24	21	2675865-2711912	-	UP	-	-	Methyl-directed Repair DNA adenine methylase
11*	2856	2875	20	7	8	4	2972201-2987936	-	DOWN	UP/DOWN	-	Mobile element protein (4 copies)

Ihas	Início	Fim	Genes	Único	Proteína de fago	Hip.	Localização no genoma	tRNA	Int.	Rec.	Toxina/ Antitoxina	Adaptação e Virulência
12*	3719	3733	15	10	1	9	3880691-3901244	DOWN	UP/DOWN	-	-	<i>radC</i>
13	3788	3826	39	28	16	21	3963850-3995221	-	DOWN	-	-	Membrane protein related to metalloendopeptidases
14	3941	3991	51	31	26	16	4127273-4168305	-	DOWN	-	-	Virulence protein msgA
15*	4089	4114	26	17	1	12	4273216-4299766	-	DOWN	-	YpjF/YfjZ	<i>radC/dndBCDE/dptFGH</i>
16*	4500	4525	26	6	4	12	4727001-4760449	-	DOWN	-	YeeU/YeeV and YfjZ/YpjF	<i>radC</i>
17	4676	4692	17	12	3	12	4929795-4941350	-	DOWN	-	Doc/Phd	-
18	5211	5253	43	30	18	19	5514043-5546006	-	UP	-	-	Methyl-directed Repair DNA adenine methylase

Hip- Genes hipotéticos; Int- Integrase; Rec- Recombinase

5.12 Resistência a metais

Em todas as cepas de *S. liquefaciens* e *S. proteamaculans* 568 foram encontrados 11 genes associados com homeostasia de cobre, destaque para a presença do cluster *crtR-cia-copZ* que codificam respectivamente para um fator de transcrição, uma ATPase e uma chaperona. Ainda com relação a resistência ao cobre, outro cluster foi encontrado, *scsABCD*. Adicionalmente, todas as cepas possuem um cluster de resistência a cobalto, zinco e cádmio codificado pelos genes *czc-cbA-cusA*, além de quatro cópias do gene *czcD*, e um duplo componente regulatório, associado com resposta na presença de metais pesados (*cusSR*). Além do mais foi verificado em todas cepas analisadas a presença dos genes de resistência ao arsênio, sendo encontrados uma cópia de *arsR* (regulador transcripcional), *arsB* (bomba de efluxo), duas cópias de *arsC* (arsenato redutase). Entretanto somente nas cepas *Serratia liquefaciens* ATCC27592, HUMV21 e FDAARGOS125 foi encontrado uma cópia do gene *arsH*. A presença dos genes de arsênio no sequenciamento do genoma, confirma a amplificação destes genes pela técnica de PCR descrita previamente neste trabalho.

5.13 Degradação de compostos aromáticos

Foram identificados no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 95 genes associados com degradação de compostos aromáticos, sendo 31 associados com vias periféricas e 58 com vias centrais. Nas vias periféricas, cinco genes estão associados com degradação de éster de salicilato, correspondente a cinco cópias de *salA* que codifica para salicilato hidroxilase; dois estão associados com degradação de quinato (*quiA* e *quiB*); 4 associados com degradação de bifenil (*bphH*, *bphC*, *bphI*) em dupla cópia e seis cópias de *bphJ*; 1 gene associado com degradação de benzoato, especificamente o que codifica para o transportador deste composto (*benE2*); 7 genes envolvidos com degradação de *p*-hidroxibenzoato, sendo uma cópia de *pobA* e 6 cópias do gene que codifica para o transportador; 7 envolvidos com degradação de compostos cloroaromáticos, incluindo um agrupamento completo contendo os genes *catDFIJ*. Para estas duas últimas categorias embora todos os genomas possuam as mesmas cópias dos genes transportadores de *p*-hidroxibenzoato, genes envolvidos com degradação destes compostos só foram

encontrados nas cepas diretamente associadas com plantas, especificamente *Serratia liquefaciens* FG3 e *Serratia proteomaculans* 568 (Figura 28).

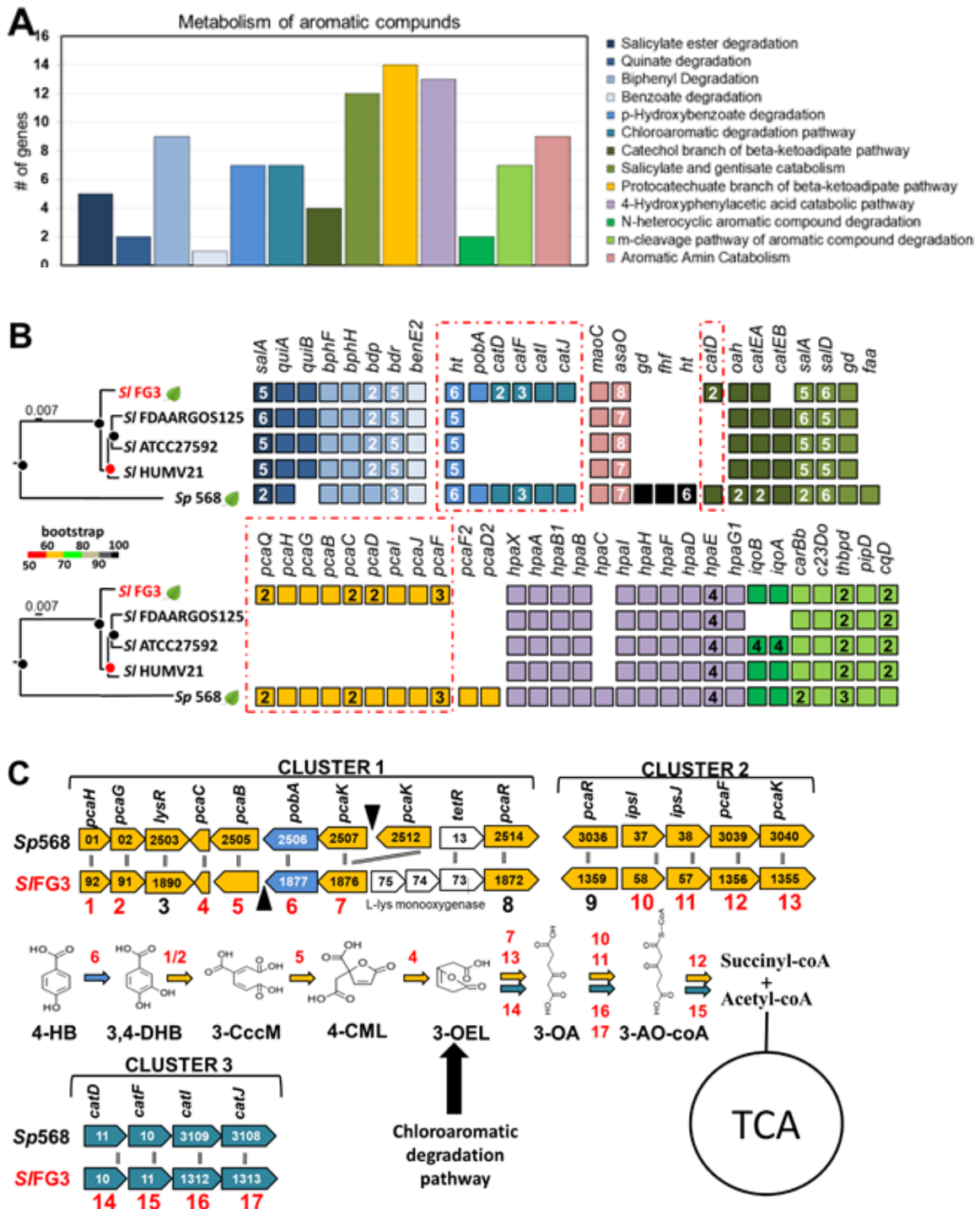


Figura 28. Análise dos genes e vias metabólicas associadas com metabolismo de compostos fenólicos no genoma de SIFG3. (A) Distribuição dos genes de *Serratia liquefaciens* FG3 nas subcategorias de vias metabólicas associadas com degradação de

compostos fenólicos. (B) Comparação dos genes quantitativamente apresentados em A em relação aos genomas das outras espécies presentes no clado das *S.liquefaciens*. Destaque para os genes *cat* e *pca* envolvidos respectivamente com via de Degradação de Cloroaromáticos Catecol B-cetoadipato, presentes exclusivamente nos genomas associados a plantas (SIFG3 e Spro568). (C) Análise da sintenia e da função de cada um destes genes no metabolismo de 4-hidroxibenzoate (4-HB) e compostos cloroaromáticos.

5.14 Aquisição e metabolismo de ferro

Um total de 110 genes foram identificados, dos quais 49 associados com biossíntese de sideróforos e internalização de ferro e os outros 61 envolvidos com metabolismo deste metal. Para a subcategoria de aquisição de ferro foram identificados genes associados com síntese dos sideróforos enterobactina e aerobactina. Os genes envolvidos com síntese de enterobactina estão localizados em uma única região no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3 (*entCEBA*) dispostos a jusante de *ybdZ* (associada com síntese deste sideróforos) em tandem com o gene que codifica para a proteína transportadora deste sideróforos (*entS*), um gene que codifica para enterobactina esterase (*fes*), o gene *entF* (componente de síntese, serine activating enzyme), e o sistema de transporte deste composto (*fepAGDCB*), uma vez secretado ao meio.

Quanto aos genes envolvidos com síntese de aerobactina foram identificados os genes *iucABCD* dispostos em tandem e à montante do gene que codifica para o receptor deste sideróforo (*iutA*). Os genes envolvidos com síntese do transportador envolvido com internalização de aerobactina também foram identificados (*fhuADCB*), também dispostos em tandem. Além disso, foram identificados no genoma de SIFG3 outros agrupamentos gênicos envolvidos com internalização de ferro, dentre eles *hmuVUTSR*, associado com transporte de hemin, *fecCDB* e *fecED-3244* envolvidos com transporte de dicitrato de ferro (III), duas cópias de transportadores ABC envolvidos com internalização do complexo cobalamina-Fe⁺³, duas cópias de ABC transportadores envolvidos com internalização de íon férrico, o agrupamento gênico *efeBUO* envolvido com transporte do íon ferroso, e um transportador ABC envolvido com internalização de ferro quelado à outros sideróforos. Quanto às proteínas envolvidas com metabolismo deste metal foram encontrados o gene *fur* (ferric uptake regulator),

duas cópias do gene *dps* envolvido com estocagem de ferro no interior da célula, além de proteínas que apresentam grupos prostéticos à base de Fe-S como *sufEDBCA*. (Figura 29A).

Foi observado em cromatografia de camada delgada, a presença de duas manchas correspondentes aos padrões utilizados, um padrão da classe hidroxamato (amarelo) e outro da classe catecol (roxo). Uma vez que foram identificados no genoma genes da via de síntese completo de aerobactina (hidroxamato) e de síntese de enterobactina (catecol), os dados sugerem a produção de ambos os compostos pela bactéria (figura 29B).

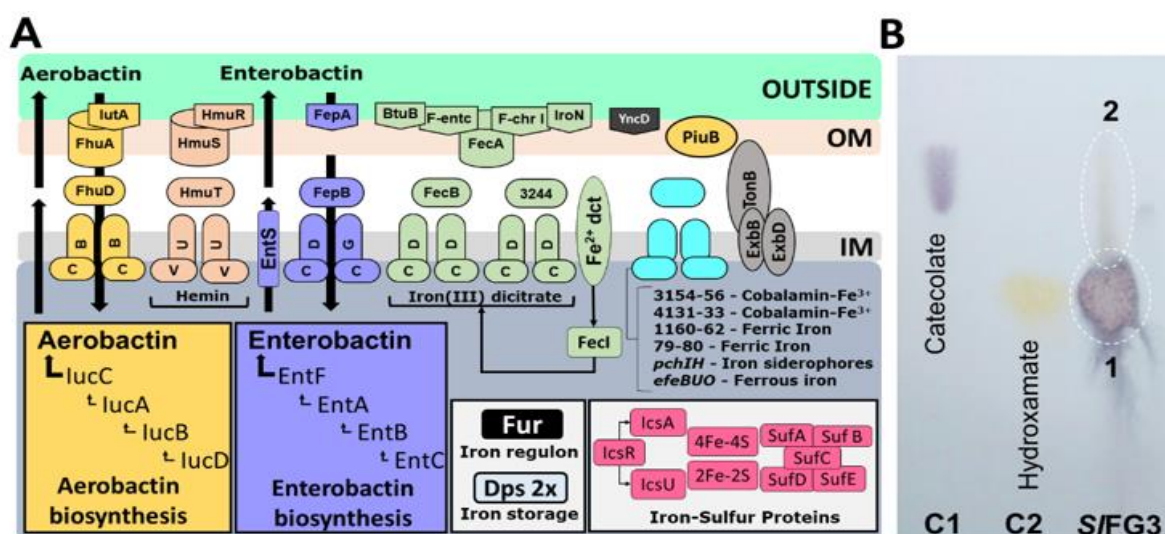


Figura 29. Análise dos sistemas relacionados com internalização de ferro no genoma de SIFG3 (A). Análise da produção de sideróforos em membranas de TLC (B). É possível observar que SIFG3 é capaz de produzir dois sideróforos, um hidroxamato (corado em amarelo) e um catecol (corado em roxo), o que corrobora a presença dos agrupamentos gênicos respectivamente associados à síntese de aerobactina e enterobactina.

5.15 Síntese de hormônios promotores de crescimento vegetal

No genoma da *Serratia liquefaciens* FG3 foram identificados quatro genes envolvidos na síntese de L- triptofano: antranilato fosforibosiltransferase (APRT), Fosforibosil-antranilato isomerase, cadeias alfa e beta de triptofano sintase (*tsa/tsb*) e Descarboxilase aminoácido L aromático. O aminoácido L-triptofano é um precursor do ácido indol acético o qual é um fitormônio produzido pelo meristema apical das plantas e também por bactérias associadas à plantas através de diferentes vias metabólicas, sendo a principal, a que utiliza o aminoácido L-

triptofano como precursor. Tal observação corrobora os dados de produção de AIA por *Serratia liquefaciens* FG3 demonstrado na figura 7A.

5.16 ACC desaminase

Ao comparar a *Serratia liquefaciens* FG3 com as outras bactérias do mesmo gênero, foi possível encontrar genes (ALS e ALDC) que codificam enzimas que participam da conversão de piruvato para acetoína, sendo que todas as bactérias analisadas possuem a acetolactato sintase e a α -acetolactato descarboxilase. A partir da acetoína, a via pode seguir para a conversão desta molécula para 2,3-butanodiol ou para a sua degradação a acetaldeído ao comando do gene *acoR*. A cepa FG3 não possui tal gene, sugerindo que se a acetoína não for degradada, haverá um maior acúmulo de 2,3-butanodiol, como já descrito para *Bacillus licheniformis* (Qiu et al., 2016).

5.17 Produção de celulose

Outro recurso genético que chamou a atenção no genoma de SIFG3 tem relação com a produção de celulose. Foi identificada a presença de um agrupamento contendo nove genes associados com síntese deste polímero, incluindo um operon de genes regulatórios (*yhjQR*), um operon de genes biossintéticos (*yhjONML*) e um operon de transdução de sinal (*yhjKIJ*), dispostos em tandem (figura 30A). Afim de comprovar a presença e a possível atividade desses genes as cepas de *E. coli* e SIFG3 foram crescidas na presença de vermelho congo, no qual somente SIFG3 apresentou coloração levemente rosa, fenótipo atribuído à enterobactereáceas produtoras de celulose. Foi verificado também que somente a cepa SIFG3 apresentou fluorescência na colônia quando exposta à luz UV no comprimento de onda de 365 nm quando crescida na presença do composto calcoflúor, corroborando os dados de que SIFG3 é produtora de celulose (Figura 30B). A figura 28C ilustra o provável processo fisiológico associado com síntese de celulose em SIFG3.

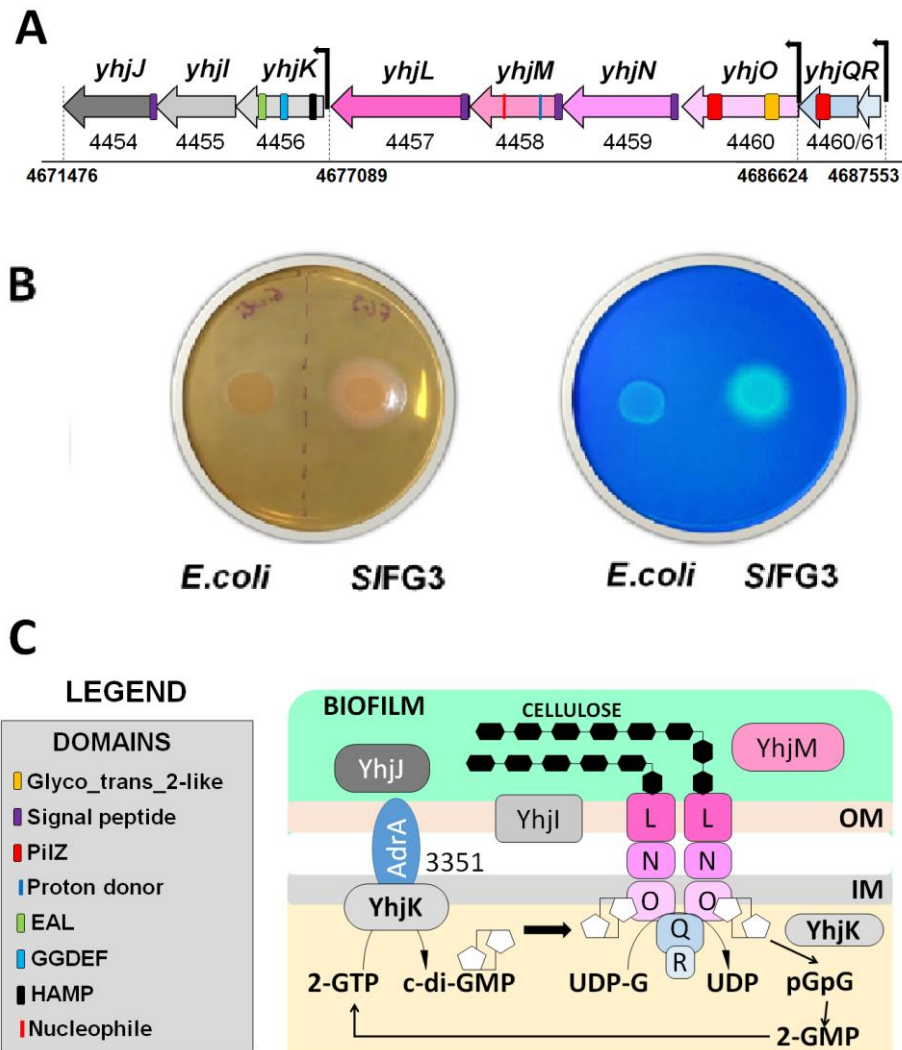


Figura 30. Análise da composição do agrupamento gênico associado com síntese de celulose. O agrupamento é composto por nove genes: 2 regulatórios (azul), 4 associados com exportação e síntese de celulose (rosa), e 3 associados com quórum sensing e modulação da resposta de síntese de celulose (verde). Em cada um dos genes que fazem parte do cluster foi verificada a presença de domínios funcionais. (D) Modelo que destaca o provável processo fisiológico associado com síntese de celulose em SIFG3.

5.18 Metabolismo de Enxofre

Dentro do metabolismo de enxofre foram encontrados genes entre as cepas comparadas relacionados à biossíntese de cisteína, utilização e assimilação de alcanosulfonato, utilização de taurina, tiolação de RNA e, encontrado somente no

genoma de SIFG3 os genes de fosforotilação do DNA, genes estes encontrados em ilha de transferência lateral (figura 29).

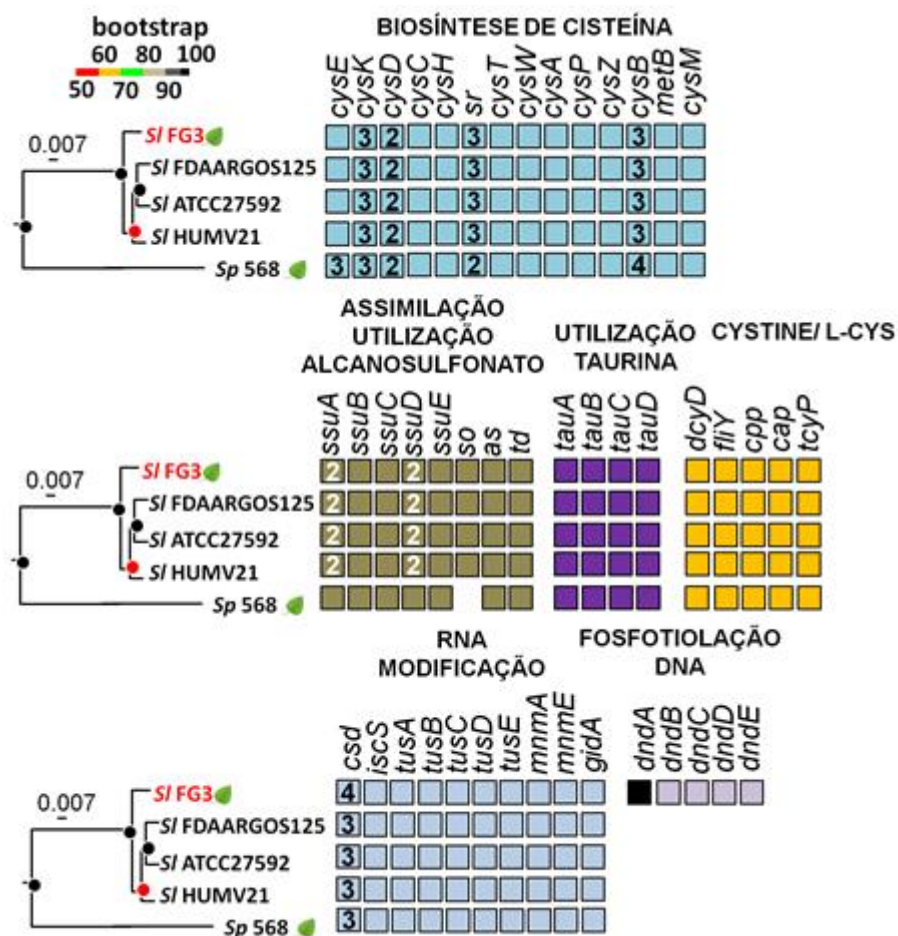


Figura 31. Análise comparativa das vias de metabolismo de enxofre. Análise evidenciando presença e ausência de genes envolvidos com Biosíntese de cisteína, assimilação e utilização de alcanosulfonato, utilização de taurina, tiolação do RNA e fosforotilação do DNA envolvendo os cinco genomas presentes no clado das *S. liquefaciens*.

5.19 Fosforotilação do DNA

Para verificar se os genes relacionados à fosforotilação encontrados na ilha de transferência lateral estão ativos, as células de SIFG3 foram expostas tanto ao arsenito de sódio quanto ao peróxido de hidrogênio. Foi verificado que, tanto DNA genômico extraído de células expostas em ambos os compostos citados, seguida da exposição ao tampão TAE ativado, apresentaram-se fragmentados quando

observados em gel agarose após eletroforese. Entretanto não foi observado fragmentação do DNA quando exposto ao tampão TAE não ativado (Figura 32). De acordo com a literatura, esses dados são confirmativos de inclusão de enxofre na estrutura do DNA. A figura 33 ilustra o provável metabolismo em *Serratia liquefaciens* FG3, culminando na síntese de cisteína, servindo de fonte para formação de proteínas dependentes de enxofre, como glutathiona, e também como fonte de enxofre para as reações de tiorilação do RNA e fosfortiorilação do DNA.

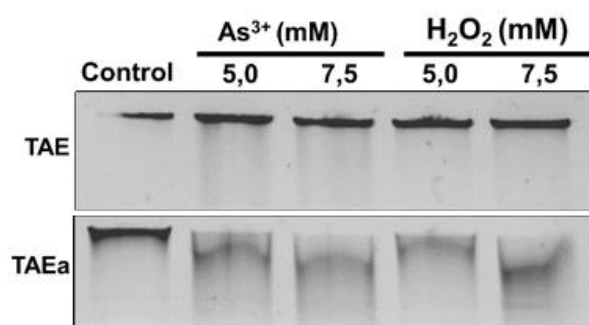


Figura 32. Degradação do DNA de *Serratia liquefaciens* FG3 quando submetido à condições de estresses induzidas por arsenito de sódio e peróxido de hidrogênio.

5. 20 Genes relacionados ao estresse oxidativo

Com relação às vias de estresse oxidativo foi possível encontrar 62 genes relacionados à esta função. Dos 62 genes, 6 foram anotados na subcategoria de enzimas associadas com proteção contra espécies reativas, dentre eles as cópias de superóxido dismutase *sodA* (Mn), *sodB* (Fe) e *sodC* (Cu-Zn), catalase, peroxidases dispostas em tandem, e citocromo c551 peroxidase. Já com relação a subcategoria de estresse oxidativo, 18 genes foram identificados. Entre estes um agrupamento composto pelos genes *bhpO-dps-fr-oxyR* que codificam respectivamente para uma bacterioferricromo oxigenase, proteína de ligação não específica ao DNA, ferroxidase e um gene denominado como ativador do gene indutível por peróxido de hidrogênio. Todas as outras cepas possuem duas cópias

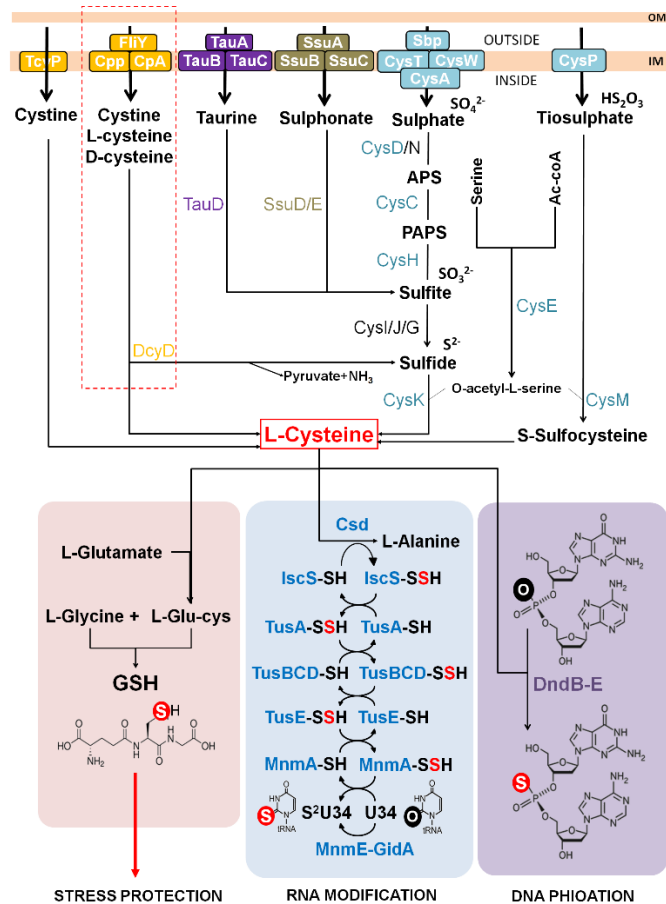


Figura 33. Provável metabolismo de enxofre em *Serratia liquefaciens* FG3, culminando na síntese de cisteína, servindo de fonte proteínas dependentes de enxofre.

deste agrupamento, estando em cópia única apenas em SIFG3. Adicionalmente foram encontrados três genes associados à regulação do metabolismo oxidativo, *furP* em dupla cópia (regulação da captação de ferro) e 3 cópias de *fnr* (regulador da redução de fumarato e nitrito), e o gene *zur* (regulador da captação de zinco) no genoma de SIFG3, além de possuir os genes *osmcl* e *osmclR* que codificam para um regulador de transcrição de resistência ao peróxido de hidrogênio e a proteína de resistência ao peróxido de hidrogênio, respectivamente. Com relação às glutarredoxinas, todas as cepas investigadas possuem uma cópia das glutarredoxinas 1, 2 e 3 e uma cópia de glutaredoxina-like *nrdH*. (Figura 34)

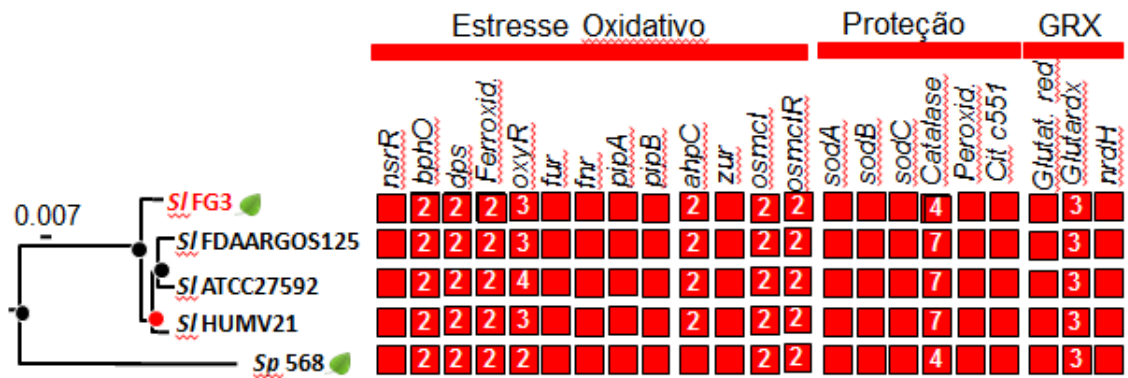


Figura 34. Análise comparativa referente aos genes relacionados ao estresse oxidativo. Análise evidenciando presença e ausência de genes envolvidos. Genes categorizados pelo programa Rast, como genes relacionados os estresse oxidativo, com proteção e genes de glutarredoxinas.

5.21 Resistência ao peróxido de hidrogênio

Uma vez que foi verificado previamente que a cepa *Serratia liquefaciens* FG3 possui a capacidade de inserir enxofre na estrutura do DNA, além de já ter sido demonstrado que a cepa possui resistência em relação ao arsênio, o próximo passo foi verificar a capacidade da cepa em crescer em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Foi observado que SIFG3 foi capaz de crescer nas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio testadas, enquanto *E. coli* se mostrou sensível às mesmas concentrações (Figura 35A). Além do mais, quando as células foram expostas somente à 1 mM peróxido de hidrogênio em tampão PBS por 30 min e em seguida incubadas em meio LB líquido, somente as células de SIFG3 se mostraram capazes de retomar o crescimento após a exposição com peróxido (Figura 35B).

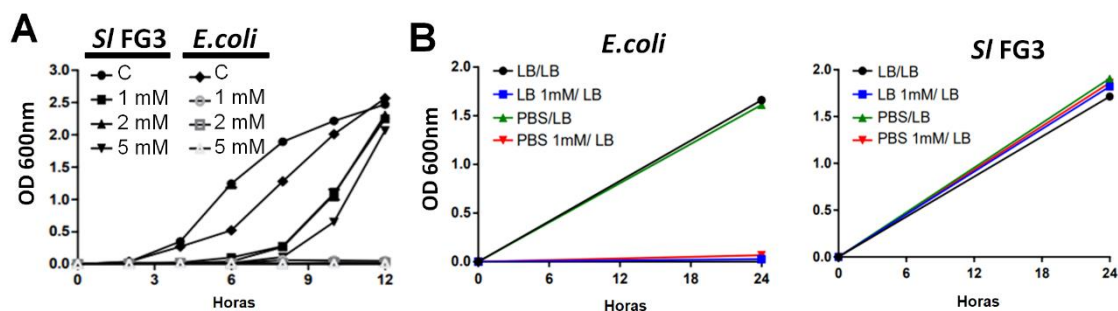


Figura 35. Análise de resistência frente ao peróxido de hidrogênio. (A) Perfil de crescimento de *Serratia liquefaciens* FG3 em comparação à *E. coli* na ausência e presença crescente de 1, 2 e 5 mM H₂O₂. (B) Avaliação da resistência à exposição aguda à 1 mM de H₂O₂ de SFG3 comparada à *E. coli*.

5. 22 Genes relacionados ao reparo de DNA

Com relação aos genes cujas funções estão associadas à eventos de reparo de DNA, foram encontradas vias completas com relação ao mau pareamento de bases (*mismatch*) apresentado 4 cópias da enzima dam metilase (*dam*), genes que codificam para MutL, MutS e MutH, endonucleases (*sbcC*, *sbcD*, *endoIV*, *endoV*), gene que codifica proteína de ligação a fita simples de DNA (*ssb*), exonucleases (*sbcC*, *sbcD*, *exoIII*). As vias de excisão de nucleotídeos compostas pelo agrupamento gênico *uvrABCD* estão completas; e a via de excisão de bases também está completa composta por 3 glicosilases (*gly1*, *gly2* e *gly3*), 2 endonucleases (*end1*, *end2*), 2 exonucleases (*exo1* e *exo2*), 4 DNA polimerases (3 cópias de *pol1* e 1 cópia de *pol2*), e 1 DNA ligase (*lig2*). Destaque para os genes *radC* (proteína de reparo de DNA) apresentando 4 cópias; *dam* (DAM metilase) 4 cópias, além de 2 cópias para *dinI* (DNA-damage inducible protein) e *recT* (proteína de reparo relacionada a recombinação do DNA - associada a profago), sendo esta última exclusiva de SIFG3, que parece estar associada com recombinação e reparo induzido por fagos. Foi verificado que todas cepas possuem uma cópia do gene *phrB* que codifica para uma fotoliase (Figura 36A).

Sabendo que raios UV são um dos fatores que causam danos diretamente à estrutura do DNA, além de já ser relatado altos níveis de radiação UV nas regiões de canga, e ter sido verificado que a cepa SIFG3 apresenta as vias de reparo de DNA completas apresentando cópias extras de elementos que a compõe (como por

exemplo DAM metilase), o nosso próximo passo de avaliar o potencial de fotoresistência de SIFG3. A cepa foi submetida à intervalos de exposição à luz ultra violeta provinda de fluxo laminar variando de 30 a 90 segundos. Foi possível observar que quando comparado à *E. coli*, usada como controle experimental, SIFG3 se mostrou bastante tolerante aos possíveis danos induzidos por UV, apresentando colônias de crescimento mesmo após 90 segundos de exposição, tanto na presença e na ausência de luz enquanto bastaram 30 segundos para eliminar qualquer possibilidade de *E. coli* crescer em todas as condições experimentais (Figura 36B).

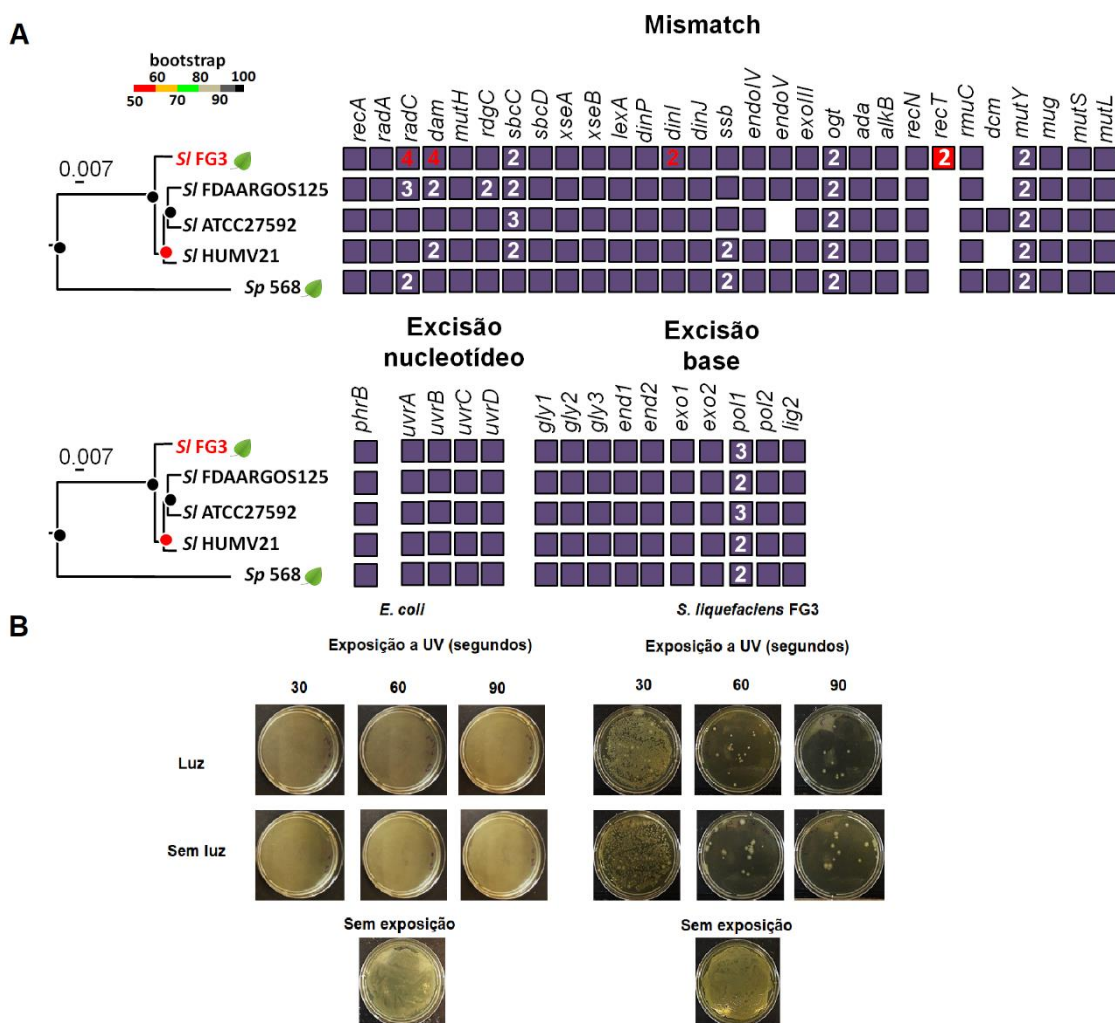


Figura 36. Resistência de *Serratia liquefaciens* FG3 aos danos induzidos por UV. (A) Análise comparativa evidenciando presença e ausência de genes envolvidos com reparo de DNA das *S. liquefaciens* e *S. proteamaculans* 568. (B) Tolerância de SIFG3 expostas à 30,60 e 90 segundos de UV comparadas à *E. coli*.

5.2.3 Biosíntese de metabólitos secundários

A análise do genoma usando o programa Antismash revelou que o genoma de SIFG3 possui 35 agrupamentos gênicos potencialmente associados à síntese de metabólitos secundários (tabela 3). Destes, quatro agregados gênicos estão associados à síntese de NRPs (non ribosomal proteins, ou melhor, proteínas de caráter não ribosomal): Turnerbactina, Pseudomonina, Maleobactina e NRPs não determinados, todas compartilhadas com outras espécies de *Serratia* (Figura 37 e tabela 4).

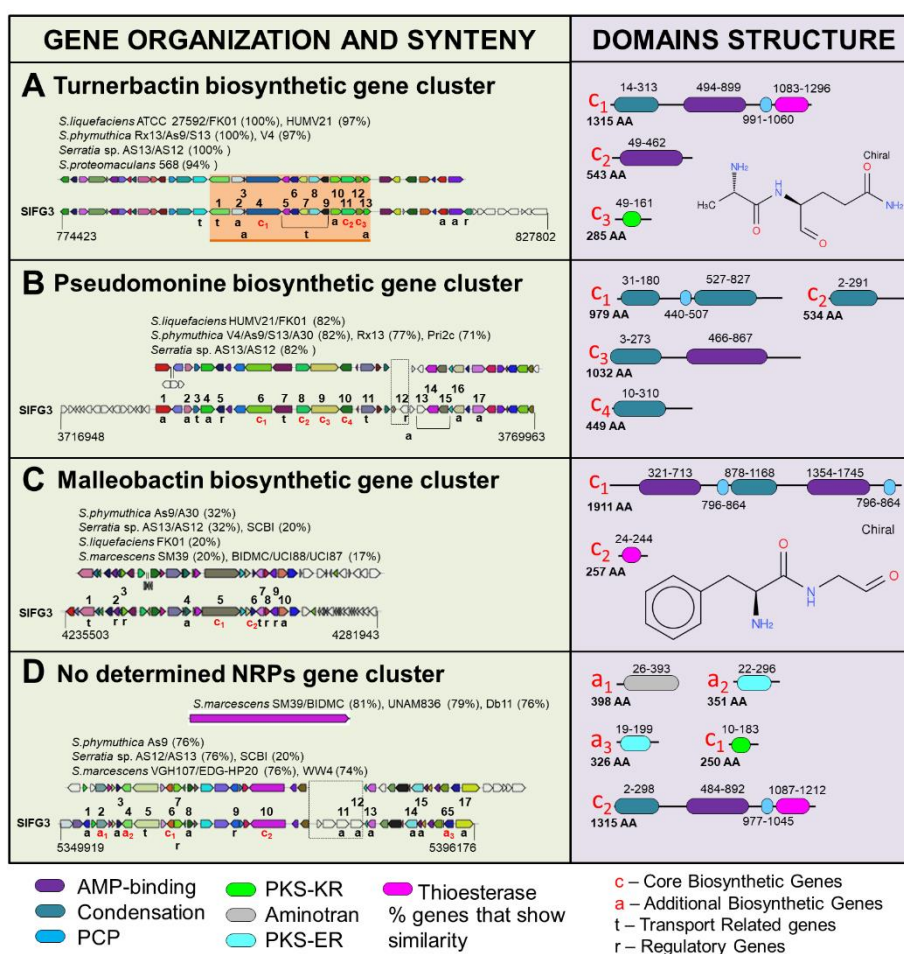


Figura 37. Análise da composição dos agrupamentos gênicos associados com síntese de metabólitos secundários no genoma de SIFG3. Dos 35 agrupamentos identificados pela ferramenta AntiSmash, quatro foram destacados dentre eles: biossíntese de turmebactin (A), Pseudomonine (B), Malleobactin (C) e um agrupamento associado a um NRPs não identificado (D). Em fundo verde destacam-se os agrupamentos gênicos e em fundo lilás os domínios funcionais inseridos nos genes que fazem parte do core biossintético (c) e nos genes acessórios (a) envolvidos com síntese destes compostos.

Tabela 4. Clusters de genes de relacionados a metabolismos secundários preditos no genoma de *Serratia liquefaciens* FG3

Cluster	Tipo	início	fim	Similaridade com cluster conhecidos	MIBiG BGC-ID
Cluster 1	Cf_putative	69531	80210	PM100117/_PM100118_biosynthetic_gene_cluster (21% of genes show similarity)	BGC0001359_c1
Cluster 2	Nrps	774158	826468	Turnerbactin_biosynthetic_gene_cluster (30% of genes show similarity)	BGC0000451_c1
Cluster 3	Cf_fatty_acid	854967	876181	-	-
Cluster 4	Cf_putative	946321	951799	-	-
Cluster 5	Cf_putative	979653	985429	-	-
Cluster 6	Cf_putative	1260337	1272919	-	-
Cluster 7	Cf_putative	1295279	1303420	-	-
Cluster 8	Cf_fatty_acid/Cf_saccharide	1506532	1543075	Marinacarboline_biosynthetic_gene_cluster (15% of genes show similarity)	BGC0001137_c1
Cluster 9	Cf_putative	1697988	1706020	Polysaccharide_B_biosynthetic_gene_cluster (6% of genes show similarity)	BGC0001411_c1
Cluster 10	Cf_putative	1932818	1942524	-	-
Cluster 11	Cf_putative	2050198	2064158	-	-
Cluster 12	Cf_putative	2135116	2144589	-	-
Cluster 13	Cf_putative	2165473	2176502	-	-
Cluster 14	Cf_fatty_acid	2711704	2732657	-	-
Cluster 15	Cf_putative	2795605	2805225	-	-
Cluster 16	Cf_fatty_acid	2836328	2857602	Taxllaid_biosynthetic_gene_cluster (33% of genes show similarity)	BGC0001133_c1
Cluster 17	Thiopeptide	2894393	2920851	O-antigen_biosynthetic_gene_cluster (14% of genes show similarity)	BGC0000781_c1

Cluster	Tipo	início	fim	Similaridade com cluster conhecidos	MIBiG BGC-ID
Cluster 18	Cf_putative	2946724	2955330	-	-
Cluster 19	Cf_saccharide	3012014	3039340	Lipopolysaccharide_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)	BGC0000774_c1
Cluster 20	Cf_saccharide	3041888	3068192	Capsular_polysaccharide_biosynthetic_gene_cluster (40% of genes show similarity)	BGC0000731_c1
Cluster 21	Cf_putative	3251406	3263762	-	-
Cluster 22	Cf_putative	3532782	3538997	-	-
Cluster 23	Cf_putative	3542378	3553817	-	-
Cluster 24	Nrps	3717689	3769630	Pseudomonine_biosynthetic_gene_cluster (20% of genes show similarity)	BGC0000410_c1
Cluster 25	Arylpolyene-Siderophore	3781438	3845994	APE_Ec_biosynthetic_gene_cluster (84% of genes show similarity)	BGC0000836_c1
Cluster 26	Cf_putative	4085879	4090846	Paerucumarin_biosynthetic_gene_cluster (40% of genes show similarity)	BGC0000923_c1
Cluster 27	Cf_putative	4223776	4231231	-	-
Cluster 28	Nrps	4235918	4281650	Malleobactin_biosynthetic_gene_cluster (7% of genes show similarity)	BGC0000386_c1
Cluster 29	Other	4305890	4348871	-	-
Cluster 30	Cf_putative	4616210	4625229	-	-
Cluster 31	Cf_putative	4652666	4662352	O&K-antigen_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)	BGC0000780_c1
Cluster 32	Cf_putative	4711603	4717750	-	-
Cluster	Cf_saccharide	4939461	4971677	Lipopolysaccharide_biosynthetic_gene_cluster (27% of genes	BGC0000776_c1

Cluster	Tipo	início	fim	Similaridade com cluster conhecidos	MIBiG BGC-ID
33				show similarity)	
Cluster 34	Nrps	5351208	5395152	-	-
Cluster 35	Cf_putative	5500683	5509483	-	-

6. Discussão

6.1 Caracterização dos isolados obtidos

As cangas são afloramentos formados há milhões de anos resultantes do intemperismo de rochas ferríferas que se estruturam em corações que podem atingir dezenas de metros de espessura e se estender por milhares de hectares (Carmo e Jacobi, 2013). Na região do Quadrilátero Ferrífero estas áreas são colonizadas por plantas que apresentam adaptações a condições limitantes como solos rasos, déficit hídrico, baixa fertilidade, além de amplitudes térmicas diárias acentuadas, alta incidência de incêndio, exposição solar e ventos constantes (Jacobi, 2007). Todas as plantas que crescem sobre afloramentos ferruginosos são metalófitas, ou especificamente pseudometalófilas, uma vez que muitas das quais são capazes de bioacumular metais como recurso anti-herbivoria (Ribeiro et al., 2016). Por estes motivos, e dadas as suas importâncias ecológicas em ambientes extremos, plantas deste ambiente tem sido bastante estudadas (Silveira et al., 2016). Entretanto, trabalhos que retratam a importância da microbiota associada a estas plantas ainda são incipientes.

Recentes trabalhos desenvolvidos por nossa equipe demonstraram que a composição microbiana associada a estas plantas tem se mostrado um fator importante para tais adaptações (Felestrino et al., 2017). Dando continuidade a estas investigações, este trabalho teve o propósito de compreender o potencial biotecnológico da microbiota bacteriana cultivável associada a plantas dos campos rupestres ferruginosos. Para isso, 65 bactérias foram isoladas de plantas e solos de regiões de canga no estado de Minas Gerais. Inicialmente foi avaliada a capacidade dos isolados deste estudo atuarem como bactérias promotoras de crescimento vegetal, uma série de ensaios exploratórios qualitativos foram propostos. Em relação à produção de enzimas hidrolíticas, cerca de 58% dos isolados se mostraram produtores de amilases, 63% de celulases e 47,69% de proteases. A secreção destas enzimas no ambiente pode desempenhar um papel fundamental no crescimento das plantas promovendo a ciclagem da matéria orgânica no solo (Choubane, Cheba, Benourrad, 2016). Se tratando de solos de canga, os quais são relatados por possuírem baixa fertilidade, estes isolados podem ser de crucial importância na ciclagem de nutrientes fundamentais para manutenção destas plantas. Além disso, indiretamente podem agir como biocontroladores para outros organismos, protegendo assim contra danos a

estruturas celulares (Glick, 2012). De forma análoga os sideróforos, moléculas de baixo peso molecular que apresentam elevada afinidade por ferro e outros metais (Manhaty *et al.*,2016; Cabaj, 2009), produzidos por cerca de 25% dos isolados, podem limitar a disponibilidade de metais à outros organismos e plantas, atuando também como promotores de crescimento vegetal indireto (Ahmed e Holmstrom, 2014; Manhaty *et al.*,2016).

Outras duas características investigadas neste trabalho foram a capacidade de solubilizar fosfato e a de produzir AIA pelos isolados cultiváveis, características desejáveis para BPCP. Uma pequena proporção dos isolados avaliados (9,23%) foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico. No entanto regiões de canga possuem baixíssimas concentrações de fósforo, normalmente encontrado na forma de fosfatos (Schaefer, 2015; Vincent e Meguro, 2008). Desta forma, embora o número de isolados com esta capacidade seja reduzido, os que o fazem podem ter fundamental importância para manutenção e estabelecimento destas plantas nestas regiões. Já em relação à capacidade de produzir AIA, 46,15% dos isolados demonstraram tal potencial, produzindo concentrações que variam de 2 a 10 µg/ml na ausência de triptofano. Como os afloramentos sobre cangas apresentam alta dureza, sendo um empecilho para o aprofundamento das raízes das plantas, a produção deste fitormônio por quase metade dos isolados devem contribuir para a fixação dessas plantas em tal ambiente, ajudando a promover a ramificação de suas raízes em busca de nutrientes.

Na tentativa de compreender empiricamente a importância destas bactérias na promoção do crescimento de plantas, três isolados (C25, FOB3 e FG3), que se mostraram mais promissores como BPCP, foram avaliados quanto a capacidade de promover crescimento em plantas de tomate. Primeiramente, foram avaliados quanto a possibilidade de produzir AIA na ausência do aminoácido L-triptofano, um precursor fundamental para a síntese do fitormônio, uma vez que o uso de BPCP dependentes de triptofano para síntese de AIA torna-se economicamente inviável para aplicação como bioinoculantes em larga escala na agricultura ou na restauração de áreas degradadas. Após 98 horas de cultivo na presença e ausência de triptofano foi possível verificar que o isolado FOB3 foi o que produziu maior quantidade de AIA na ausência do precursor, cerca de 10 mg/l após 24 horas de crescimento. Quando inoculados no solo contendo sementes de tomate este isolado foi capaz de elevar a taxa de

germinação de 40 para 100% e aumentar em 50% o crescimento das partes aéreas, de 3 para 6 cm após 20 dias de crescimento (Figura 2). Estudo realizado por Khalid *et al.*, 2004, mostrou que na ausência e presença de L-triptofano, BPCP que foram capazes de produzir entre 12 a 24,8 mg/l de AIA estimularam fortemente o crescimento de plantas de trigo. Considerando que FOB3 na ausência do precursor foi capaz de produzir quase o dobro da concentração deste mesmo fitormônio, e que o resultado se fez promissor em tomate, é possível que possa também promover crescimento de outras plantas de interesse agrônomo, com a possibilidade de serem utilizados como bioinoculantes livre de triptofano e, portanto, com menor custo de implementação.

Outras características marcantes dos isolados investigados relacionam-se à capacidade destes em crescerem em meio de cultura contendo antibiótico ampicilina e arsênio em diferentes concentrações. É bem descrito na literatura que vários plasmídeos estão relacionados com tolerância à antibióticos e a metais pesados, incluindo tolerância ao arsênio (Endo *et al.*, 1995; Rosen, 1992; Li *et al.*, 2015). Dentre os três isolados estudados, apenas em FOB3 não foi observado a presença de plasmídeo associado. Já para C25 foi obtido um plasmídeo (pC25) e para o isolado FG3 dois plasmídeos, pFG3A e pFG3B, todos conferindo tolerância à ampicilina nas cepas de *E. coli* transformadas.

Os dados de estabilidade plasmidial mostraram que esses plasmídeos são altamente estáveis, mantendo-se ao longo das gerações dentro da célula transformada, o que eleva o potencial destes plasmídeos como possíveis vetores biológicos. Outra característica peculiar observada foi a capacidade do plasmídeo pFG3B estimular o crescimento da cepa transformada, elevando sua taxa de replicação significativamente, o que sugere a existência de genes que possam atuar no controle do ciclo celular. Uma futura identificação desses genes pode permitir que novos vetores de transformação e clonagem possam ser construídos com o intuito de acelerar a produção de enzimas recombinantes de interesse biotecnológico, por exemplo.

Além disso, pesquisas recentes descrevem elevadas concentrações de arsênio na região do Quadrilátero Ferrífero (Costa *et al.*, 2015; Vicq *et al.*, 2015) principalmente localizadas na região centro-norte. Quimicamente a forma pentavalente (arsenato) é mais abundante em ambientes oxidantes, e a forma trivalente em ambientes redutores (Pradosh, 2002; Watanabe e Hirano, 2013). Já

foi relatado por Gosh (2015) que um dos possíveis mecanismos de resistência ao arsenato, forma mais abundante nas superfícies, coincide com a não solubilização de fosfatos, uma vez que estes são internalizados nas células através dos mesmos transportadores, desse modo prevenindo o dano a biomoléculas. Morfologicamente os isolados deste estudo foram classificados como bacilos gram positivos. Estudo semelhante avaliou dois isolados bacterianos resistentes ao arsênio, ambos *Bacillus* gram positivos (Dey *et al.*, 2016). Segundo os autores sugerem que a parede mais espessa das bactérias gram positivas pode dificultar a entrada de compostos tóxicos, como arsênio, o que condiz com os resultados encontrados neste trabalho, sugerindo que os isolados das regiões de canga são altamente adaptados às condições em que vivem.

Para sobreviver, a bactéria deve se adaptar rapidamente às mudanças nas condições ambientais. As mudanças na taxa de crescimento devem ser acompanhadas por mudanças no ciclo celular para garantir que a divisão celular seja coordenada com duplicação de massa, replicação e segregação cromossômica (Wang e Levin, 2009). Foi possível observar que grande quantidade dos isolados testados apresentam alta taxa de replicação quando comparado à *E. coli* sob condições normais experimentais. Especulamos que as bactérias da região de canga, por estarem em constante contato com um ambiente de altas concentrações de metais tóxicos e poucos nutrientes, tem a necessidade de se multiplicar rapidamente como parte de um mecanismo de sobrevivência para garantir a sua presença e perpetuação no ambiente, mesmo em condições desfavoráveis de crescimento.

Para as bactérias associadas à planta, a formação de biofilmes é uma estratégia adaptativa para alcançar com sucesso a colonização do hospedeiro, por exemplo, nas superfícies das folhas ou na rizosfera ou mesmo como estratégia chave para a patogênese, além de ser uma proteção contra as condições ambientais (Castiblanco e Sundin, 2015). Nossos resultados mostram que dentre as cepas avaliadas (figura 4A), somente a cepa *Serratia liquefaciens* FG3 como a cepa transformante *E. coli*::pFG3B produziram quantidades significativas de biofilme, sugerindo que a presença do plasmídeo pFG3B influencia diretamente no metabolismo de produção de biofilme celular. Os dados até o momento apontam o plasmídeo pFG3B como uma molécula altamente especializada ao meio, como parte de um mecanismo essencial à adaptação da

cepa à região de canga. Além disso, foi observado que a cepa carreando o plasmídeo pC25 possui maior capacidade de autoagregar em relação às outras. Condições desfavoráveis de crescimento ou mesmo a baixa atividade metabólica são capazes de induzir agregação celular, refletindo uma estratégia de sobrevivência à ambientes hostis (Bogino *et al.*, 2013). Sob condições favoráveis de crescimento, o plasmídeo pC25 induz uma maior capacidade de autoagregação celular. De acordo com Bogino (2013), a capacidade das células de autoagregar possui implicações favoráveis para a agricultura na produção de inoculantes baseados em bactérias. Agregados bacterianos podem ser produzidos em larga escala e separados de forma mais simples e fácil em relação às bactérias dispersivas no meio.

Nossos dados mostram que tanto a cepa FG3, quanto *E. coli*:pFG3B possui elevada tolerância ao arsenito de sódio, apresentando crescimento mesmo em elevadas concentrações (Figura 5A, 5 B e 5 C). A análise de remoção de arsênio revelou que as cepas resistentes não bioacumulam arsênio no interior das células ou mesmo na membrana celular, não apresentando modificações estruturais aparentes. Além disso, foi avaliada a capacidade da cepa FG3 em diminuir a toxicidade do meio na perspectiva de oxidar arsenito à arsenato, o qual não foi observado em nossos experimentos. Este resultado pode estar relacionado à produção de sideróforos pela bactéria. De acordo com Gosh (2015), bactérias com alta produção de sideróforos são mais resistentes ao arsenito, enquanto bactérias com baixa produção de sideróforos se mostram mais resistentes ao arsenato. Nossos dados sugerem que sideróforos produzidos por FG3 quelam com arsenito (As^{3+}) em meio de cultura como uma forma de atenuar o estresse causado por este metalóide. O mecanismo de resistência mais difundido em bactérias está relacionado com a presença funcional de *operons ars*, os quais podem estar associados tanto ao DNA cromossomal como plasmidial (Bachate *et al.*, 2009; Kaur e Rosen, 1992).

Foi constatado a presença de genes do *operon ars* no plasmídeo pFG3B, não sendo encontrado no genoma da cepa FG3, sugerindo mais uma vez que este plasmídeo em especial possui um papel importante na adaptação desta cepa à adversidade ambiental. A presença de genes de tolerância ao arsênio e possivelmente outros mecanismos aqui não avaliados, como a produção de sideróforos e mecanismos de respostas a danos no DNA podem estar atuando

conjuntamente para a diminuição da toxicidade intracelular, protegendo a células globalmente, contra danos às biomoléculas e permitindo assim maior resistência e a adaptação ao meio.

Uma vez que as bactérias detectam compostos tóxicos ao seu redor, estas podem se proteger através da formação de biofilmes ou então se locomoverem para áreas menos tóxicas (Farasin *et al.*, 2016). Já foi descrito na literatura que o proteoma da cepa *Herminiimonas arsenicoxydans* combinados com resultados de transcriptoma indicaram que *H. arsenicoxydans*, não somente expressou genes de detoxificação e resposta ao estresse contra ao arsênio como também genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeos, importação de fosfato e de motilidade (Weiss *et al.*, 2009). Foi observado que a cepa FG3 se mostra mais sensível, apresentando maior motilidade quando exposta ao arsenito e ao arsenato, claramente um mecanismo de defesa dessa bactéria frente à toxicidade do arsênio, sugerindo que este mecanismo não está relacionado com o plasmídeo pFG3B.

6.2 Análises genômicas da cepa *Serratia liquefaciens* FG3

Pelos experimentos propostos ficou comprovado que SIFG3 é capaz de produzir sideróforos, de tolerar elevadas concentrações de metais pesados, e de resistir ao arsênio com concomitante redução de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA. Parte destas funções estão associadas à presença de dois plasmídeos que conferiram em cepas de *E. coli* transformadas algumas destas características metabólicas. Apesar deste conhecimento preliminar contribuir parcialmente para explicar sua adaptação nas condições estressantes impostas pelos campos rupestres ferruginosos, ainda assim não dão subsídios de informações genéticas que justifiquem sua sobrevivência e envolvimento com a planta hospedeira. Com a proposta de compreender quais genes poderiam estar relacionados com as descobertas preliminares e compreender outros potenciais associados, SIFG3 teve seu genoma completamente sequenciado e comparado com os genomas completamente sequenciados de outras 33 espécies do gênero *Serratia*

Ficou comprovado que SIFG3 possui o segundo maior genoma do gênero com 576987 pb capaz de codificar 5398 genes, menor apenas que os genomas

de espécies de *Serratia fonticola*. Isso é decorrente, em parte, da presença de 18 ilhas genômicas, 13 das quais compreendendo inserções de fagos completos, segundo análise do genoma pelo programa PFAST (Zhou et al., 2011), além de uma série de genes únicos ou em cópias adicionais que lhe conferem características adaptativas específicas. Além disso, SIFG3 possui os maiores plasmídeos conjugativos já descritos para bactérias deste gênero, respectivamente com 159042 pb (pFG3A) e 125113 pb (pFG3B), capazes de codificar respectivamente para 179 e 146 genes. Além da presença de todos os genes associados com síntese e regulação do aparato de conjugação (*tra*) em ambos os plasmídeos, pFG3B merece destaque por possui genes associados com síntese de fímbrias.

Filogenomicamente SIFG3 está inserida no clado das cepas *S. liquefaciens* e que possui elevada identidade de proteínas com *S. proteamaculans* 568, isolada também de planta. SIFG3 compartilha um *core* de 417 famílias de proteínas com todas as 33 espécies investigadas, e 3998 famílias de proteínas apenas com as cepas de *Serratia* que estão dispostas em seu clado. Ainda com relação às outras espécies que compõe o mesmo clado, em SIFG3 foram identificadas 516 famílias de proteínas codificadas por uma única cópia gênica e outros 127 famílias de proteínas codificadas por cópias de genes parálogos, 53 (41,7%) das quais compartilhados exclusivamente nos plasmídeos. Além disso, 64 famílias de proteínas são exclusivas do plasmídeo pFG3A, 44 exclusivas do plasmídeo pFG3B e 479 famílias de proteínas exclusivas do cromossomo, das quais 68 associadas com proteínas de fagos.

Uma análise comparativa refinada do genoma de SIFG3, em relação aos outros genomas inseridos neste contexto, revelou a presença de uma série de vias metabólicas e genes, alguns dos quais exclusivos, que merecem destaque. A seguir estes genes e o potencial metabólico de SIFG3 será discutido sob três perspectivas: associados com adaptação a fatores abióticos, associados com adaptação ao tecido vegetal, associados com adaptação a competição frente a outros organismos. Juntos estes sistemas e genes são capazes de esboçar o potencial adaptativo desta bactéria que poderá servir de suporte para a discussão sobre outros modelos bacterianos correlacionados.

6.2.1 Genes associados com adaptação a estresse abiótico

Microorganismos associados ao filoplano necessitam de um repertório de genes que os permitam sobreviver diante das condições abióticas impostas pelo ambiente onde vivem (Lindow e Brandl, 2003), mitigando, desta forma, os danos gerados à própria estrutura celular, à população de microorganismos e aos hospedeiros associados (Dimkpa et al.,2009). Em bactérias do gênero *Serratia* já foram identificados uma série de genes e recursos que as permitam sobreviver em distintas condições de estresse (Ketola e Hiltunen, 2014; Saarinen et al., 2018). Porém, análise do genoma de SIFG3 revelou um extenso e diversificado repertório de genes que pode esclarecer um pouco mais sobre a biologia e manutenção desta bactéria aos diversificados fatores abióticos impostos pelo ambiente de onde foi isolada.

Um dos fatores abióticos mais relevante na região dos campos rupestres do quadrilátero ferrífero esteja relacionado às elevadas concentrações naturais de metais. Para bactérias associadas à estas regiões ainda pouco se sabe sobre seus potenciais genéticos relacionados com remediação de solo (Felestrino et al.,2017). Com o sequenciamento do genoma de SIFG3 foi possível identificar uma série de genes associados com metabolismo de chumbo, cádmio, zinco e arsênio. Alguns destes corroboram os resultados empiricamente comprovados neste trabalho quanto a capacidade de SIFG3 tolerar elevadas concentrações de arsênio em meio de cultura (Caneschi et al., 2018).

Pelo menos dez agrupamentos gênicos completos que codificam para transportadores ABC permitiriam a SIFG3 internalizar ferro associado à sideróforos, à cobalamina ou mesmo nos estados ferroso e férrico. Uma vez no interior da célula, este ferro poderia atuar como cofator em grupos prostéticos associados à proteínas (*sufABCDE*) ou ser estocado em proteínas especializadas como é o caso da proteína Dps (Hong Wang e Maier, 2006; Nair e Finkel, 2004) codificada por duas cópias gênicas.

Além dos genes associados às funções acima descritas, outro recurso genético que chamou a atenção no genoma de SIFG3 tem relação com a produção de celulose. Foi identificada a presença de um agrupamento contendo sete genes associados com síntese deste polímero, incluindo um operon de genes regulatórios (*yhjQR*), um operon de genes biossintéticos (*yhjONML*) e um operon de transdução de sinal (*yhjKIJ*), dispostos em tandem.

Além de uma completa caracterização estrutural destes operons e dos domínios associados às proteínas por estes genes codificados, ficou demonstrado por duas metodologias diferenciadas que SIFG3 é capaz de produzir celulose em meio de cultura, indicando que estes genes são ativos e funcionais. A produção de celulose em microorganismos associados à plantas tem sido correlacionada a uma série de funções. Além de promover adesão ao tecido vegetal rizosférico (Laus et al., 2005) ou no filoplano, que no caso dos fitopatógenos também incide como um importante fator de virulência, a produção de celulose estabiliza a colonização bacteriana na superfície do tecido vegetal (Matthysse, 1986) e reduz a perda de água por desidratação (Mathysse, 1986; Nielsen et al., 2011) propiciando, neste microambiente, a liberação de fatores de interação positiva ou negativa com a planta ou outros organismos associados, caracterizando desta forma sucesso ecológico (Gal et al., 2003). As aplicações potenciais da celulose bacteriana e seus derivados para reparos e substituição de vasos sanguíneos de pequeno diâmetro (Bottan et al., 2015; Sherner et al., 2014) e como sistemas de liberação de drogas (Abeer et al., 2014; Klemm et al., 2011), bem como membranas e filtros.

Ainda destacando o repertório genético associados com proteção ao estresse abiótico, talvez os genes mais intrigantes do genoma de SIFG3 estejam diretamente relacionados com reparo e proteção de ácidos nucléicos. Embora a maioria dos genes associados com função de reparo no genoma SIFG3 sejam encontrados nas outras cepas de *Serratia* investigadas, as variações intrínsecas no genoma de SIFG3 estão diretamente associados à novas aquisições gênicas mediadas por transferência horizontal e inserção de fagos. Além de colocarem em evidência a expansão do genoma de SIFG3, em 9 de 18 ilhas genômicas foram identificados genes com função de reparo de DNA, destaque para ilhas 3 e 7 que apresentam cópias adicionais do gene *recT*, e para as ilhas 12, 15 e 16 que apresentam cópias adicionais do gene *radC*.

Funcionalmente *recT* codifica para uma proteína de anelamento e invasão de fita de DNA de fita simples relacionada com recombinação homóloga de fagos (Kimec e Holloman, 1981), o que poderia justificar o sucesso das inserções de fagos no genoma de SIFG3. Já a proteína RadC está envolvida com reparo de DNA procariótico induzido por raios UV e raios X (Katsiou et al., 1999). Adicionalmente

SIFG3 ainda possui uma cópia adicional do gene *dam* que codificam para uma Dam-methylase que tem relação direta com proteção contra DNAs estranhos como transposons e DNAs virais (Low et al., 2001) e *dinI* que codifica para uma proteína induzível por dano ao DNA (Lusetti et al., 2004), a qual possui função de estabilizar os filamentos da proteína RecA durante uma resposta SOS, sendo RecA a proteína de recombinação central de *E. coli* e outras bactérias. DinI não facilita a formação de dos filamentos de RecA, más estaliza-os uma vez formados (Lusetti et al., 2004; Lusetti, Drees, Sthhol, 2004). Juntas, estas cópias adicionais dos genes *radC*, *dam* e *dinI* podem atuar no reparo de DNA, tanto via inserção de DNAs estranhos quanto ao reparo induzido por fontes exógenas, como por exemplo raios UV, juntamente com os sistemas de fosforotilação abaixo discutidos, refletindo no sucesso de crescimento de SIFG3 mesmo após ser desafiada a 90 segundos de exposição a UV, contrastando a susceptibilidade observada em *E.coli*.

Embora 16 destas 18 ilhas identificadas apresentarem algum gene que poderiam conferir benefícios genéticos ao genoma de SIFG3, é a ilha 15 que merece destaque especial. Além da cópia adicional de *radC* e de genes que codificam para um sistema toxina-antitoxina (*YpjF/YfjZ*), apresenta em sua composição um agrupamento de genes associados com fosforotilação do DNA (*dndBCDE*) disposto à jusante de um grupamento de genes que codificam para endonucleases (*dptFGH*) e a montante de outros genes com função associada à ligação ao DNA. Análise das bordas desta ilha genômica permitiu que fossem identificadas as repetições diretas (Lu e Leong, 2016) que modularam esta inserção, uma das quais posicionada a montante de um gene que codifica para tRNA-Leu, cuja posição 3' pode ter atuado como sítio de inserção de uma integrase localizada imediatamente à jusante, reiterando a presença de clássicas assinaturas de transferência lateral de genes (Willians, 2002). Embora regiões que contenham genes associados com fosforotilação de DNA sejam amplamente descritas com produtos de transferência lateral em outros genomas sendo também já relatado em genomas de outras enterobactereáceas, como *E.coli*, *Samonella*, incluindo *Serratia marscences* FG194 e *Serratia plymuthica* 4Rx13 (Ho et al., 2015).

Funcionalmente, os genes envolvidos com fosforotilação do DNA são responsáveis por um elaborado mecanismo molecular cujo propósito é promover a troca de um átomo de oxigênio por um átomo de enxofre ligado ao grupo fosfato que promove a formação da ligação fosfodiéster (Wang et al., 2007). Uma vez modificado, esta nova configuração confere ao DNA proteção contra danos ao estresse oxidativo ou catálises induzidas por ação de endonucleases (Xie et al., 2012). Segundo Xie e colaboradores, *in vivo* DNA fosforotilado é mais resistente aos danos causados por peróxido de hidrogênio em relação a um DNA ausente de enxofre na sua estrutura. Na tentativa de compreender se estes genes são funcionais no genoma de SIFG3, experimentos de indução de estresse acompanhado de uma análise de integridade do DNA foram realizados. Os resultados demonstraram que SIFG3 é capaz de substituir um oxigênio por enxofre na cadeia de seu DNA quando submetida a diferentes concentrações de arsênio e peróxido de hidrogênio. Ao mesmo tempo, ficou constatado que quanto maior a concentração destes indutores de dano ao DNA, maior é a substituição do oxigênio pelo enxofre, reiterando a importância deste mecanismo na proteção ao DNA de SIFG3.

Corroborando este aumento da proteção do DNA por fosforotilação, foram identificados no genoma de SIFG3 os genes *tusABCDE* e *mnmAE*. Estes genes estão associados especificamente com proteção de tRNA, mediado por um mecanismo análogo. As proteínas por eles codificadas teriam a função de promover a substituição do átomo de oxigênio de uma uracila na posição 34 (U34) do tRNA, por um enxofre (S2-U34), conferindo a esta biomoléculas aumento de estabilidade termal e proteção contra degradação inespecífica por nucleases (Motorin e Helm, 2010).

É interessante notar que ambos os mecanismos de proteção de ácidos nucleicos acima discutidos são decorrentes de eventos de substituições por átomos de enxofre. Isso obrigaria SIFG3 a possuir um repertório de vias metabólicas capazes de suprir a necessidade de produção de um substrato doador de enxofre. Com a proposta de compreender esta dinâmica, o metabolismo de enxofre foi completamente caracterizado, com base na presença de genes em seu genoma. Ficou evidenciado que SIFG3 possui sistemas de transporte e metabolismo de taurina (*tauABCD*), sulfonato (*ssuABCDE*), sulfato

(*cysAWTDCHKE-sbp*), tiosulfato (*cysPM*), cistina (*tcyP*), L- e D-cisteína (*fliY-cpp-cpa-dcyD*), todas elas culminando na síntese de cisteína intracelular. No caso do transportador envolvido com internalização de D-cistina, este poderia atuar como um importante sistema de detoxificação deste composto, já que nesta configuração a cisteína atuaria como um importante inibidor de crescimento microbiano (Soutourina, Blanquet e Plateau, 2001). A L-cisteína intracelular poderia então não apenas atuar como doadora de enxofre para os mecanismos de tiolação de DNA e tRNA, mas também como substrato fundamental para a síntese de glutathiona.

Considerando a potencialidade de geração de glutathiona como um subproduto do metabolismo de enxofre acima discutido, fomos verificar no genoma de SIFG3 o conjunto de genes associados com metabolismo oxidativo.

SIFG3 possui um amplo repertório de genes com esta função, incluindo três cópias dos genes que codificam para superóxido dismutase (Fe, Zn e Mn), 2 cópias de genes de resistência ao paraquat, além de uma complexa rede de genes associados com síntese de moléculas com potencial redutor. Com o objetivo de verificar a capacidade de multiplicar mesmo em condições de estresse induzido por peróxido de hidrogênio, SIFG3 foi desafiada nas condições de 1, 2 e 5 mM deste composto. Enquanto 1 mM de H₂O₂ foi capaz de inibir por completo a taxa de replicação celular em *E.coli*, SIFG3 mesmo em concentrações de 2 mM de H₂O₂ retomou sua capacidade replicativa após 9 horas. Esses resultados podem estar associados com os eventos de fosforotiolação do DNA previamente descritos, mas também com uma elevada capacidade de detoxificar este composto.

6.2.2 Genes associados com adaptação ao tecido vegetal

Com relação à presença de genes que poderiam justificar a interação com plantas metalófitas, SIFG3 também apresenta em seu genoma um diversificado repertório de genes e funções. Em relação ao metabolismo energético SIFG3 possui genes envolvidos com degradação de uma série de carboidratos (trealose, sucrose, maltose, maltodextrina, lactose, galactose, celobiose, glicerol, manitol, inositol, arabinose, sorbitol, xilose, galactonato, galacturonato, fucose, frutose,

cetogliconate e manose), muitos deles produzidos exclusivamente por plantas. Uma vez convertidos a piruvato, este poderia ser metabolizado em condições aeróbicas e anaeróbicas, o que corrobora o fato de SIFG3 apresentar uma série de aceptores e doadores de elétrons, tornado a geração de energia altamente versátil.

Serratia liquefaciens FG3 também possui genes e vias metabólicas completas associadas com promoção de crescimento vegetal, o que faz sentido tendo em vista seu local de isolamento. Dentre estas vias destacam-se as vias envolvidas com síntese de AIA, acetoína e butanodiol, previamente também encontradas no genoma de *Serratia marcescens* cepa RSC-14 isolada *Solanum nigrum* acumuladora de cádmio (Khan et al., 2017). Estas características metabólicas destacam SIFG3 como uma importante bactéria que pode ser utilizada como um recurso biológico para promoção de crescimento vegetal especialmente em proposta de regeneração de áreas degradadas. Condição esta bastante evidenciada na região do quadrilátero ferrífero já que este vem sofrendo intensa ação antrópica decorrente de atividades extrativistas minerais.

Além do mais, como relatado que o composto 2,3-butanodiol é alvo de estudo como fonte de biocombustível (Qiu et al., 2016), e que, supondo que *Serratia liquefaciens* FG3 não degrada acetoína levando ao acúmulo de 2,3 butanodiol, devido a ausência do gene *acoR*, conjugado com a alta taxa de replicação deste isolado observado neste trabalho (Caneschi et al., 2018), *Serratia liquefaciens* FG3 se mostra um excelente alvo para pesquisas posteriores a fim de avaliar a produção do composto 2,3-butanodiol, elevando ainda mais o seu potencial biotecnológico.

As vias mais interessantes presentes em SIFG3 tem relação com a capacidade de degradação de compostos fenólicos. Estes compostos são produzidos direta ou indiretamente por plantas e tem sido descritas como moléculas associadas a proteção vegetal contra infecções, uma vez que são tóxicas a muitos organismos (Bhattacharya et al., 2010). Além de um repertório de vias consenso, também encontradas nas outras cepas distribuídas no mesmo clado de SIFG3, nesta cepa também foram identificadas as vias completas de degradação de 4-hidroxibenzoato, ramo protocatecuato de beta-cetoadipato e cloroaromáticos, só encontrada em *Serratia protamaculans* 568, também isolada de plantas. Os genes

que participam destas vias estão localizados em três agrupamentos presentes em diferentes regiões genômicas, codificando para transportadores, reguladores e enzimas. Considerando que apenas as cepas associadas com plantas apresentam genes que codificam para estas vias, é possível que a funcionalidade destas esteja associada como um mecanismo de detoxificação destes compostos que culminaria na síntese acetil-CoA e succinil-CoA, sendo então utilizadas com fontes alternativas de carbono (Alejandro-Marin, Bosch e Nogales, 2014; Daayf et al., 2012).

Outro dado que corrobora o fato de SIFG3 ser um organismo que faz uso dos recursos da planta sem a prejudicar, está associado à ausência de alguns dos sistemas secretórios que classicamente são encontrados em organismos patogênicos, como é o caso dos sistemas secretórios tipo II, III, VI e VIII, os quais normalmente são codificados por genes plasmidiais ou estão inseridos em ilhas de patogenicidade (Gophna et al., 2003; Silverman et al., 2012). Apesar desta ausência, apresenta em seu repertório genes que codificam para sistemas secretórios envolvidos com adesão e colonização de tecidos hospedeiros. Foram encontrados genes associados com síntese do sistema secretório genes associados com o sistema secretório tipo IV, e genes envolvidos com síntese do sistema secretório tipo V do tipo two-partner secretion pathway (TPS), além disso, outros associados com sistema secretório tipo VII foram identificados, capazes de sintetizar pili. Finalmente foi identificado um agrupamento de genes associados com indução de hiperaderência (*yidE-16hspB-16hspA-yidR-yidQ*), descrito como importantes no processo de interação e colonização de plantas e sementes (Torres et al., 2005).

6.2.3 Genes associados com competição

Além de possuir recursos adaptativos a condições abióticas e a sobrevivência em contato com o tecido da hospedeira, bactérias associadas a plantas necessitam de recursos genéticos para evitarem competição frente a outros organismos presentes no mesmo nicho. Muitos destes recursos genéticos já foram identificados em bactérias de diversos gêneros, incluindo *Serratia*, a exemplo de metabólitos secundários com ação antagônica ao crescimento de outras bactérias e fungos (Li et al., 2015). Dentre estes compostos secundários

biologicamente mais importantes estão aqueles sintetizados por genes NRPs e PKS, ou mesmo pigmentos como é o caso da prodigiosina (Willians, 1973), classicamente produzidos por bactérias deste gênero.

Embora pertencente ao gênero *Serratia*, SIFG3 não possui pigmentação, o que corrobora a ausência de genes que codificam para a síntese de prodigiosina em seu genoma. Apesar disso, foram identificados 35 agrupamentos gênicos associados com síntese de potenciais metabólitos secundários, fazendo uso do programa AntiSmash. Além de agrupamentos envolvidos com síntese de polissacarídeos e o-antígenos, foram também identificados agrupamentos associados com síntese dos metabólitos marinacarbolina and taxillaid, que apresentam atividade antimalárica (Huang et al., 2011; Kronenwerth et al., 2014) . Porém, foi com relação a biossíntese de sideróforos que SIFG3 se destacou. Foram identificados que seis agrupamentos gênicos relacionados com a síntese desses compostos, hipoteticamente capazes de sintetizar turnerbactina (Han et al., 2013), pseudomonina (Anthoni et al., 1995), maleobactina (Alice et al., 2006), um sideróforos derivado de um arilpolieno, além de enterobactina e aerobactina. Análise do perfil de síntese destes compostos por ensaios em TLC identificaram a produção de dois sideróforos com características químicas associadas a um hidroxamato, possivelmente aerobactina (Ling et al., 2013) e um catecol, possivelmente enterobactina.

Embora a produção destes sideróforos possam contribuir para o crescimento vegetal (Scavino e Pedraza, 2013; Radzki et al., 2013 REF), são fundamentalmente associados com competição entre organismos de um mesmo nicho, uma vez que a eficiência de captação de ferro do meio, promovida por um microorganismo competente, poderia induzir bacteriostase ou morte bacteriana de outros microorganismos pouco adaptadas a estas condições (Hibbing et al., 2010). Finalmente, considerando que esta competição possa reduzir a incidência de organismos fitopatogênicos (Sayyed e Reddy, 2013), e que a imunidade de plantas possa ser ativada pela presença de sideróforos microbianos (Aznar et al., 2014; Aznar e Degali, 2015), SIFG3 com todo este repertório poderia atuar em todas estas frentes para promover a proteção e crescimento indireto de plantas controlando as populações de uma microbiota específica.

7. Conclusões

Os dados deste trabalho demonstram que os isolados bacterianos de regiões de canga do Quadrilátero Ferrífero possuem implicações ecológicas e biotecnológicas, que podem contribuir como BPCP em solos pobres em nutrientes, aumentando o crescimento de plantas, ou mesmo realizando a ciclagem de compostos orgânicos presente no meio através de enzimas líticas.

Nossos resultados ainda revelaram que os plasmídeos apresentados neste trabalho, possuem características cobiçadas para a indústria biotecnológica, como resistência a metal e antibiótico, além de acelerarem o crescimento da célula hospedeira.

Neste trabalho ainda foi possível o relato e a descrição de uma nova cepa de *Serratia liquefaciens* (cepa FG3) isolada de planta. As análises genômicas permitiram evidenciar uma série de genes únicos pertencentes a esta cepa, que lhe confere alta resistência à compostos tóxicos (genes *dnd*) além de uma série de genes que lhe permite uma melhor interação e adaptação do meio de onde foi coletada.

Por fim, fica claro que os isolados de regiões de canga possuem um arsenal de genes com promissor potencial biotecnológico, evidenciando a necessidade de mais estudos e aprofundamentos na identificação de possíveis novas espécies ainda não catalogadas, além da descrição de possíveis novos genes ainda não relatados na literatura.

8. Perspectivas

- Os resultados encontrados neste projeto, permitem que os outros isolados bacterianos que não foram extensivamente estudados, sejam alvos futuros de projetos de mestrado e doutorado do laboratório a novos alunos que ingressarem nos programas de pós graduação em Ciências Biológicas e Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto.
- A presença de genes de fosforotilação encontrados em *Serratia liquefaciens* FG3, gerou interesse em saber o quanto esses genes estão disseminados nos isolados de região de canga, o que possibilitou iniciar um novo estudo que já se encontra em andamento para verificar a presença e a funcionalidade dos genes *dndBCDE* nos isolados região de canga.
- Uma vez que foi verificado que o agrupamento gênico *dndBCDE* foi ativado na presença de compostos oxidantes (arsenito de sódio e peróxido de hidrogênio), uma perspectiva de trabalho é realizar o proteoma e o transcrissoma de *Serratia liquefaciens* FG3 na presença de diferentes compostos com capacidade oxidante, até mesmo na presença de raios UV.
- O fato de *Serratia liquefaciens* FG3 não possuir o gene *acoR*, o que supostamente gera o acúmulo de 2,3-butanodiol, trabalhos futuros na linha de biocombustível são excelentes alvos de pesquisa na área de biotecnologia.

9. Referências Bibliográficas

- ATAÍDE, E. et al. Florística e caracterização de uma área de campo ferruginoso no complexo minerário alegria, serra de antônio pereira, ouro preto, minas gerais, brasil. **Revista Árvore**, v. 35, n. 6, p. 1265 - 1275, 2011.
- ABEER, M. M. et al. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **J Pharm Pharmacol**. v. 66, p. 1047–1061. 2014.
- ADNAN, M., SHAH, Z., FAHAD, S., ARIF, M., ALAM, M., KHAN, I. A., et al. Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. **Sci. Rep.** v. 7, p. 16131. 2017.
- AEBI, H. “Catalase in vitro,” in *Methods in Enzymology*, ed. L. Packer (Cambridge, MA: Academic Press), p. 121–126. 1984. doi: 10.1016/S0076-6879(84) 05016-3.
- AHMED, E. e HOLMSTROM, S. J. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microb. Biotechnol.** v. 7, p. 196–208. 2014.
- ALAMURI, P.; LÖWER, M.; HISS, J.; HIMPSL, S.; SCHNEIDER, G. e MOBLEY, H. L. Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.** v. 78, p. 4882–4894. 2010.
- ALICE, A. F. Genetic and Transcriptional Analysis of the Siderophore Malleobactin Biosynthesis and Transport Genes in the Human Pathogen *Burkholderia pseudomallei* K96243. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 1551–1566. 2006.
- ANTHONI, U. et al. Pseudomonine, an Isoxazolidone with Siderophoric Activity from *Pseudomonas fluorescens* AH2 Isolated from Lake Victorian Nile Perch. **J. Nat. Prod.** v. 58, p. 1786–1789. 1995.
- ARBELI, Z., e FUENTES, C. L. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. **FEMS Microbiol.** v. 272, 269–275. 2007.
- AZIS, R. K. et al., The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**. v. 9, p. 75. 2008.

AZNAR, A. E DEGALI, A. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? **Journal of Experimental Botany**. v. 66, p. 3001–3010. 2015.

AZNAR, A. et al. Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. **Plant Physiol**. v. 164, p. 2167-2183. 2014.

BACHATE, S. P.; CAVALCA, L.; e ANDREONI, V. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. **J. Appl. Microbiol**. v. 107, p. 145–156. 2009.

BOGINO, P. C.; OLIVA M de, L.; SORROCHE, F. G.; e GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **Int. J. Mol. Sci**. v. 14, p. 15838–15859. 2013.

BOTTAN, S. et al. Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-based biolithography. **Nano**. v. 9: p. 206–219. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. v. 72, p. 248–254. 1976.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; e SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 57, p. 535–538.1991.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* v. 64, p. 807 -838. 2013

CABAJ, A. e KOSAKOWSKA, A. Iron-dependent growth of and siderophore production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea. **Microbiol. Res**. v. 164, p. 570–577. 2009.

CANESCHI, W. L. et al. Brazilian Ironstone Plant Communities as Reservoirs of Culturable Bacteria With Diverse Biotechnological Potential. **Front. Microbiol**. v. 9. 2018.

- CARMO, F. F. e JACOBI, C. M. A vegetação de canga no quadrilátero ferrífero, minas gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia**. v. 64, p. 527–541. 2013.
- CARMO, F. F. e JACOBI, C. M. Diversity and plant trait-soil relationships among rock outcrops in the Brazilian Atlantic rainforest. **Plant Soil**. v. 403, p. 7–20. 2016.
- CARMO, F. F.; KAMINO, L. H. Y.; JUNIOR, R. T., CAMPOS, I. C.; SILVINO, G., et al. Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. **Perspect. Ecol. Conserv.** v. 15, p. 145–151 2017.
- CASTIBLANCO, L. F. e SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *J. Integr. Plant Biol.* v. 58, p. 362–372. 2016.
- CHARBON, G. et al. Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.** v. 42, p. 13228-13241. 2014.
- CHOUBANE, S.; CHEBA, B. A. e BENOURRAD, A. (2016). Screening and phenotypic diversity of amylase producing rhizospheric bacteria from some North African plants. **Proc. Technol.** v. 22, p. 1197–1204. 2016.
- COSTA, R. V. F.; LEITE, M. G. P.; MENDONÇA, F. P. C. e NALINI, H. A. Jr. (2015). Geochemical mapping of arsenic in surface waters and stream sediments of the Quadrilátero Ferrífero, Brazil. *Rem. Rev. Esc. Minas.* v. 68, p. 43–51. 2015.
- DAAYF, F. et al. Phenolic Compounds in Plant Defense and Pathogen Counter-Defense Mechanisms. **Recent Advances in Polyphenol Research**. v. 3 p.191-208. 2012.
- DEY, U.; CHATTERJEE, S. e MONDAL, N. K. (2016). Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. **Biotechnol. Rep.** v. 10, p. 1–7. 2016.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant Cell Environ.** v. 32, p. 1682-1694. 2009.

DIXIT, R. et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. **Sustainability.** v. 7, p. 2189–2212. 2015.

DORR, J. V. N. Physiographic, Stratigraphic and Structural Development of the Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 1969.

DRUMMOND, G. M. et al. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 2005.

ENDO, G. et al.. Heavy metal resistance plasmids and use in bioremediation. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications.* p. 47 – 62. 1995.

FARASIN, J.; KOEHLER, S.; VARET, H.; DESCHAMPS, J.; DILLIES, M. A.; PROUX, C. et al. Comparison of biofilm formation and motility processes in arsenic-resistant *Thiomonas* spp. strains revealed divergent response to arsenite. **Microb. Biotechnol.** v. 10, p. 789–803. 2017.

Felestrino, É. B.; Assis, R. A. B.; Lemes, C. G. C.; Cordeiro, I. F.; Fonseca, N. P.; Villa, M. M. et al. *Alcaligenes faecalis* associated with mimosa calodendron rhizosphere assist plant survival in arsenic rich soils. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* v. 17, p. 1102–1115. 2017.

FELESTRINO, E. B.; SANTIAGO, I. F.; FREITAS, L. D.; ROSA, L. H.; RIBEIRO, S. P. E MOREIRA, L. M. Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaea*-rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial prospecting. **Front. Microbiol.** v. 8, p.172. 2017.

Gal, M.; Preston, G. M.; Massey, R.C. Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. **Mol Ecol.** V. 12, p. 3109-3121. 2003.

GHOSH, P.; RATHINASABAPATHI, B.; TEPLITSKI, M. e MA, L. Q. (2015). Bacterial ability in As III oxidation and As V reduction: relation to arsenic

tolerance, p uptake, and siderophore production. **Chemosphere**. v. 138, p. 995–1000. 2015.

GIBSON, N.; YATES, C. J. e DILLON, R. Plant communities of the ironstone ranges of South Western Australia: hotspots for plant diversity and mineral deposits. **Biodivers. Conserv.** v. 19, p. 3951–3962. 2010.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**. 2012. doi: 10.6064/2012/963401.

GOPHNA, U.; RON, E. Z.; GRAUR, D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. **Gene**. v. 312, p. 151-163. 2003.

HAN, A. W. et al. Turnerbactin, a Novel Triscatecholate Siderophore from the Shipworm Endosymbiont *Teredinibacter turnerae* T7901. *Plos One*. v. 8. 2013.

HERMOSA, R et al. Plant - beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. v. 158, p. 15 – 25. 2012.

HIBBING, E. M. et al Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nat Ver Microbiol**. v. 81, p. 15-25. 2010.

HO, W. S. et al. The *dnd* operon for DNA phosphorothioation modification system in *Escherichia coli* is located in diverse genomic islands. **BMC Genomics**. v. 16, p. 199. 2015.

HOBMAN, J. L.; CROSSMAN, L. C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. **Journal of Medical Microbiology**. v. 64, p. 471 – 497. 2014.

HONG, Y.; WANG, G.; MAIER, R.J. *Helicobacter hepaticus* Dps protein plays an important role in protecting DNA from oxidative damage. **Free Radic Res**. v. 40, p. 597-605. 2006.

HUANG, H. et al. Antimalarial β -carbolina e alcalóides indolactâmicos de *Marinactinospora thermotolerans*, um isolado em águas profundas. **Revista de Produtos Naturais**. v. 74, p. 2122-2127. 2011.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. e CAMPOS, I. C. Soaring extinction threats to endemic plants in Brazilian metal-rich regions. **Ambio**. v. 40, p. 540–543. 2011.

- JACOBI, C. M.; DO CARMO, F. F.; VINCENT, R. C., e STEHMANN, J. R. (2007). Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodivers. Conserv.** v. 16, p. 2185–2200. 2007.
- KAUR, P., e ROSEN, B. P. Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. **Plasmid.** v. 27, p. 29–40. 1992..
- KETOLA, T E HILTUNEN, T. Rapid evolutionary adaptation to elevated salt concentrations in pathogenic freshwater bacteria *Serratia marcescens*. *Ecol Evol.* v. 4, p. 3901–3908. 2014.
- KHALID, A.; ARSHAD, M. e ZAHIR, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* v. 96, p 473–480. 2004.
- KHAN, A. R. et al. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *Plos One.* V. 12. 2017.
- KIM, S. Y.; JEONG, H. C.; HONG, S. K.; LEE, M. O.; CHO, S. J., e CHA, H. J. Quercetin induced ROS production triggers mitochondrial cell death of human embryonic stem cells. *Oncotarget.* v. 8, p. 64964–64973. 2017.
- Klemm, D. et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Ed Engl.* V. 50, p. 5438–5466. 2011
- KMIEC, E. e HOLLOMAN, W. K. Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA. *J Biol Chem.* v. 25, p. 126361263-9.1981.
- KONG, Z. e GLICK, B. R. “Chapter Two - the role of plantgrowth-promoting bacteria in metal phytoremediation,” in *Advances in Microbial Physiology*, ed. R. K. Poole (Cambridge, MA: Academic Press), p. 97–132. 2017.
- KRONENWERTH, M. ET AL. Characterisation of taxlllids a–g: natural products from *xenorhabdus indica*. **Chemistry.** v. 20, P. 17478- 17487. 2014.
- LAUS, M. C. et al. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. **Mol Plant Microbe Interact.** V. 18, p. 533–538. 2005.

- LI, P. et al. Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. **Plos One**. v. 10. 2015.
- LINDOW, S. E. e BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Appl Environ Microbiol**. v. 69, p. 1875-1883. 2003.
- LOW, D. A.; WEYAND, N. J.; MAHAN, J. M. Roles of DNA Adenine Methylation in Regulating Bacterial Gene Expression and Virulence. **Infect Immun**. v. 69, p. 7197-7204. 2001.
- LU, B. e LEONG, W. H. Computational methods for predicting genomic islands in microbial genomes. **Comput Struct Biotechnol J**. v.14, p. 200-206. 2016.
- LUSETTI, S. L. et al. The DinI and RecX Proteins Are Competing Modulators of RecA Function. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 55073-5079. 2004.
- LUSETTI, S. L. et al. The DinI protein stabilizes RecA protein filaments. **J Biol Chem**. v. 16, p. 30037-30046. 2004.
- MAHANTY, T.; BHATTACHARJEE, S.; GOSWAMI, M.; BHATTACHARYYA, P.; DAS, B.; GHOSH, A. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int**. v. 24, p. 3315–3335. 2017.
- ALEJANDRO-MARÍN, C.; BOSCH, R.; NOGALES, B. Comparative genomics of the protocatechuate branch of the β -ketoacid pathway in the *Roseobacter lineage*. **Marine Genomics**. v. 17, p. 25-33. 2014.
- MATTHYSSE A. G. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Crit Rev Microbiol**. v. 13, p. 281-307. 1986.
- MMA. Áreas Prioritárias para Conservação, Uso Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira: Atualização - Portaria MMA n_9, de 23 de Janeiro de 2007. Brasília: Brasília Ministério do Meio Ambiente. 2007
- MOTORIN, Y. e HELM, M. tRNA Stabilization by Modified Nucleotides. **Biochemistry**. v. 49, p. 4934–4944. 2010.

NAIR, S. E FINKEL, S. E. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. **Journal of bacteriology**. v. 186, 4192-4208. 2004.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol.** v. 170, p. 265–270. 1999.

NIELSEN, L.; LI, X.; HALVERSON. L. J. Cell–cell and cell–surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions. **Environmental microbiology**. v. 13, p. 1342- 1356. 2011.

O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 47:2437. 2011.

Qiu, Y.; Zhang, J.; Li, L. et al. Engineering *Bacillus licheniformis* for the production of meso-2,3-butanediol. *Biotechnology of biofuels*. v. 9, p 117. 2016.

RADZKI, W. et al. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*. v. 104, p. 321-330. 2013.

RIBEIRO, S. P.; LONDE, V.; BUENO, A. P.; BARBOSA, J. S.; CORRÊA, T. L.; SOELTL, T. et al. Plant defense against leaf herbivory based on metal accumulation: examples from a tropical high altitude ecosystem. **Plant Species Biol.** v. 32, p. 147–155. 2017.

RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F. et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **ISMEJ**. v. 2, p. 404–416. 2008.

ROSIÈRE, C. A. e CHEMALE, F. Jr. Itabiritos e minérios de ferro de alto teor do quadrilátero ferrífero – uma visão geral e discussão. **Goenomos**. v. 8, p. 27–43. 2000.

ROY, P. e SAHA, A. Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen. **Curr. Sci**. v. 82, p. 38–45. 2002.

SAARINEN, K.; LAAKSO, J.; LINDSTROM, L.; KETOLA, T. Adaptation to fluctuations in temperature by nine species of bacteria. **Ecology and Evolution**. v.8, p. 2901-2910. 2018.

SAYYED, R. Z. e REDDY, M. S. Siderophore Producing PGPR for Crop Nutrition and Phytopathogen Suppression. **Bacteria in Agrobiolology: Disease Management**. p. 449-471. 2013.

SCAVINO, A. F. E PEDRAZA, R. O. The Role of Siderophores in Plant Growth-Promoting Bacteria. **Bacteria in Agrobiolology: Crop Productivity**. 2013.

SCHAEFER, C. E.; CÂNDIDO, H. G.; CORRÊA, G. R.; PEREIRA, A.; NUNES, J. A.; SOUZA, O. F. et al. (2015). "Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: umarevisão crítica e papel ecológico de termiteiros," in Geossistemas Ferruginosos, eds F. F. do Brasil, D. Carmo, and L. H. Y. Kamino (Belo Horizonte: 3i ditora), p. 77–102. 2015.

SCHERNER, M. et al. In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept? **J Surg Res**. v. 189, p. 340–347. 2014.

SCHWYN, B., e NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem**. v. 160, p. 47–56. 1987.

SILVA, R. F. A paisagem do Quadrilátero Ferrífero – MG: Potencial para uso turístico da sua geologia e geomorfologia. Belo Horizonte: UFMG. 2007.

SILVEIRA, F. A. O.; NEGREIROS, D., BARBOSA; N. P. U., BUISSON; E., CARMO, F. F.; CARSTENSEN, D. W. et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant Soil**. v. 403, p. 129–152. 2016.

SILVERMAN, J. M. et al. Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. **Annu Rev Microbiol**. v. 66, p. 453-472. 2012.

SKIRY CZ, A.; CASTILHO, A.; CHAPARRO, C.; CARVALHO, N.; TZOTZOS, G.; E SIQUEIRA, J. O. (2014). Canga biodiversity, a matter of mining. **Front. Plant Sci**.v. 5, p.653. 2014.

- SONTER, L. J.; MORAN, C. J.; BARRETT, D. J. e SOARES-FILHO, B. S. Processes of land use change in mining regions. **J. Clean. Prod.** v. 84, p. 494–501. 2014.
- SOUTORINA, J.; BLANQUET, S.; PLATEAU, P. Role of D-Cysteine Desulfhydrase in the Adaptation of *Escherichia coli* to D-Cysteine. **The journal of biological chemistry.**v. 276, p. 40864-40872. 2001.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A. e PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genet. Mol. Biol.** v. 38, p. 401–419. 2015.
- STRAUSS, M. L.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G. e VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **J. Appl. Microbiol.** v. 91, p. 182–190 2001.
- TORRES, A. G.; JETER, C.; LANGLEY, W.; MATTHYSSE, A. G. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. **Appl Environ Microbiol.** v.71, p. 8008-8015. 2005.
- VINCENT, R. C. e MEGURO, M. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. **Braz. J. Bot.** v. 31, p. 377–388. 2008.
- WANG, J. D. e LEVIN, P. A. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 7, p. 822–827. 2009.
- WANG, L. et al. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. **Nature Chemical Biology.** v. 3, p. 709-710. 2007.
- WATANABE, T. e HIRANO, S. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. **Arch. Toxicol.** v. 87, p. 969–979. 2013.
- WEISS, S.; CARAPITO, C.; CLEISS, J.; KOECHLER, S.; TURLIN, E.; COPPEE, J. Y. et al. Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite oxidizing strain *Herminiimonas arsenicoxydans* by proteomics data. **Biochimie.** v. 91, p. 192–203. 2009.

WILLIAMS, K. P. Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. **Nucleic Acids Res.** v. 15, p. 866-875. 2002.

WILLIAMS, R.P. Biossíntese de prodigiosina, um metabólito secundário de *Serratia marcescens*. **Appl Microbiol.** v. 25, p. 396-402. 1973.

XIE, X. et al. Phosphorothioate DNA as an antioxidant in bacteria. **Nucleic Acids Res.** v. 40, p. 9115–9124. 2012.

YAO, J.; GUO, Y.; ZENG, Z.; LIU, X.; SHI, F. e WANG, X. (2015). Identification and characterization of a HEPN-MNT family type II toxin-antitoxin in *Shewanella oneidensis*. **Microb. Biotechnol.** v. 8, p. 961–73. 2015.

ZHOU, Y.; LIANG, Y.,; LYNCH, K.; DENNIS, J. e WISHART, D. PHAST: A Fast Phage Search Too. **Nucleic Acids Res.** v.39, p. 347-352. 2011.

10. Anexos

Parte dos resultados deste trabalho foram publicados na revista Frontier in Microbiology como título “Brazilian Iron Stone Plant Communities as Reservoir of culturable Bacteria with Diverse Biotechnological Potential” como parte dos critérios para a obtenção do título de doutor pelo programa de Pós graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto.