

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA
FILHO - CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**GENÔMICA APLICADA À PREDIÇÃO DOS
MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM
Rhizobium sp. LBMP-C04**

**Daiane Silva Bonaldi
Bióloga**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA
FILHO - CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**GENÔMICA APLICADA À PREDIÇÃO DOS
MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM
Rhizobium sp. LBMP-C04**

Daiane Silva Bonaldi

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

Co-orientadores: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Dr. Luciano Takeshi Kishi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

B697g

Bonaldi, Daiane Silva

Genômica aplicada à predição dos mecanismos moleculares de resistência aos metais potencialmente tóxicos e promoção de crescimento vegetal em *Rhizobium* sp.

LBMP-C04 / Daiane Silva Bonaldi. -- Jaboticabal, 2021

86 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves

Coorientador: Daniel Guariz Pinheiro

1. Biorremediação. 2. Fitorremediação. 3. Genes de resistência. 4. Metais pesados. 5. Sequenciamento genético. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: GENÔMICA APLICADA À PREDIÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM *Rhizobium* sp. LBMP-C04

AUTORA: DAIANE SILVA BONALDI


ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES


COORIENTADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

COORIENTADOR: LUCIANO TAKESHI KISHI


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES (Participação Virtual) 
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. MARA CRISTINA PESSOA DA CRUZ (Participação Virtual) 
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO (Participação Virtual) 
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA (Participação Virtual) 
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais-FCBA/UFMG / Dourados/MSS

Profa. Dra. FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA (Participação Virtual) 
Departamento de Ciência do Solo-UFLA / Lavras/MG

Jaboticabal, 14 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Daiane Silva Bonaldi – Filha de Celso Roberto Bonaldi e Helena Silva Bonaldi, nasceu aos 02 de novemnro de 1990, no município de Aguaí, Estado de São Paulo. Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Lavras, no ano de 2014; Mestre em Microbiologia Agrícola pela mesma Universidade em 2017. Ingressou no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, no ano de 2017.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

DEDICO

Aos meus amados pais Celso Roberto Bonaldi e Helena Silva Bonaldi,
grandes responsáveis pela minha formação, que sempre estiveram
comigo e me incentivaram a acreditar em meu potencial
em todos os momentos nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar, proteger e me dar forças nessa caminhada;

Aos meus pais Celso e Helena, por tornarem esse sonho possível, pelo amor e carinho;

Ao Caio Henrique, é um presente ter você na minha vida, te ver crescer e ter o seu amor, pelos inúmeros sorrisos e alegria que tenho quando estou com você.

À Amora, por encher minha vida de alegria, pelo seu carinho e companheirismo;

À minha amiga Ednara, por acreditar em mim e sempre me incentivar;

À Andelita, pelos sábios ensinamentos, sem sua ajuda nada disso seria possível;

À minha querida orientadora prof. Dra. Lucia Maria Carareto Alves por abrir as portas do laboratório, acreditar em mim, pelo apoio e disponibilidade sempre; um grande exemplo de profissional e pessoa;

Ao meu co-orientador Daniel Guariz pelas contribuições e sugestões para melhoria deste trabalho;

À professora Luciana Saram pelas valiosas contribuições e disponibilidade em ajudar sempre que preciso;

À Michelli Gonçalves, a qual foi indispensável para realização deste trabalho;

Aos meus orientados Henrique Laurito, João Vitor Tinti e Bruno Bachega pela ajuda neste trabalho, e pela oportunidade de orientá-los e contribuir para seus aprendizados;

À Unesp/FCAV e aos professores que contribuíram para minha melhor formação;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Poluição por metais potencialmente tóxicos.....	2
2.2 Biorremediação	3
2.2.1 Fitorremediação.....	4
2.3 Mecanismos de resistência bacteriana a metais potencialmente tóxicos.....	7
2.4 Remoção de metais potencialmente tóxicos por bactérias e sua alocação.....	12
2.5 Gênero <i>Rhizobium</i>	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Isolamento bacteriano.....	17
3.2 Análises moleculares de bioinformática.....	18
3.2.1 Extração de DNA, Amplificação e Purificação.....	18
3.2.2 Sequenciamento dos fragmentos 16S rRNA, Análise das seqüências e homologia com banco de dados.....	18
3.2.3 Extração de DNA e sequenciamento do genoma completo.....	19
3.2.4 Processamento dos dados e montagem do genoma.....	19
3.2.5 Análises filogenômicas.....	19
3.2.6 Comparação genômica.....	20
3.2.7 Anotação funcional.....	20
3.3 Análises laboratoriais bioquímicas, microbiológicas e de resistência a metais.....	20
3.3.1 Solubilização de fosfato de cálcio.....	20
3.3.2 Produção de sideróforos.....	21
3.3.3 Produção de compostos indólicos.....	22
3.3.4 Teste de nodulação e eficiência simbiótica do isolado <i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04 em <i>Leucaena leucocephala</i>	22

3.3.5 Teste de resistência aos antibióticos.....	24
3.3.6 Preparação de soluções estoque de metais potencialmente tóxicos.....	24
3.3.7 Concentrações mínimas inibitórias: ensaio de resistência aos metais potencialmente tóxicos.....	25
3.3.8 Efeito dos metais potencialmente tóxicos na curva de crescimento.....	25
3.3.9 Análise de espectroscopia de absorção atômica.....	26
3.3.10 Microscopia eletrônica de transmissão.....	26
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	26
4.1 Montagem do Genoma.....	26
4.2 Identificação do isolado pela amplificação do gene 16S rRNA.....	28
4.3 Análises filogenéticas.....	30
4.4 Comparação dos genomas.....	31
4.5 Anotação Funcional do <i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04.....	34
4.5.1 Kegg.....	34
4.5.2 BacMet.....	38
4.5.3 Genes promotores de crescimento vegetal.....	44
4.6 Solubilização de fosfato de cálcio.....	45
4.7 Produção de sideróforos.....	49
4.8 Produção de compostos indólicos - Quantificação por colorimetria.....	50
4.9 Teste de nodulação e eficiência simbiótica do isolado <i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04 em <i>Leucaena leucocephala</i>	52
4.10 Sensibilidade aos antibióticos e padrão de resistência.....	54
4.11 Concentração Mínima Inibitória dos metais potencialmente tóxicos.....	57
4.12 Efeitos dos metais potencialmente tóxicos na curva de crescimento.....	60
4.13 Remoção dos metais potencialmente tóxicos.....	64
4.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	69
5. CONCLUSÃO.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

GENÔMICA APLICADA À PREDIÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM *Rhizobium* sp. LBMP-C04

RESUMO - A associação de microrganismos com plantas hiperacumuladoras de metais potencialmente tóxicos (MPT) para remover, transferir ou estabilizar esses elementos do solo é uma ferramenta adequada para processos de biorremediação de ambientes contaminados. A capacidade dos microrganismos em resistir a esses ambientes depende de fatores bioquímicos, estruturais, fisiológicos e de adaptação genética deles. Sendo assim, o objetivo desse trabalho consiste na avaliação da capacidade do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em ser usado para biorremediação e promoção de crescimento vegetal em solos contaminados com metais. Para isso, nesse trabalho foi realizada a predição de genes relacionados ao metabolismo de MPT, genes de promoção de crescimento e genes de resistência a antimicrobianos, bem como a realização de testes bioquímicos para comprovar essas características *in vitro* da bactéria *Rhizobium* sp. LBMP-C04. Através das anotações funcionais do genoma sequenciado foi possível prever uma variedade de genes relacionados à resistência aos MPT, de promoção de crescimento vegetal e resistência a antimicrobianos no genoma bacteriano. Os genes de resistência estão associados principalmente a mecanismos relacionados a bombas de efluxo, reparo de danos ao DNA e na importação ou exportação de metal nas células bacterianas, a fim de manter a homeostase celular. Os genes que promovem o crescimento vegetal estão relacionados com os mecanismos de tolerância ao estresse osmótico, solubilização de fosfato, metabolismo do nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio, formação de biofilme, respostas ao choque térmico e a biossíntese de ácido indol-3-ácetico (AIA), de triptofano e de ácidos orgânicos. Os resultados bioquímicos indicam que o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 é capaz de solubilizar fosfato de cálcio, produzir sideróforos e compostos indólicos *in vitro*; o isolado foi resistente aos antibióticos ampicilina, amoxicilina, rifampicina, ácido nalidíxico e trimetropina. O isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 apresentou MIC de 5, 14, 13, 12, 48 e 401 mmol dm⁻³ respectivamente aos metais Cd²⁺, Cu²⁺, Cr⁶⁺, Cr³⁺, Zn²⁺ e Ni²⁺, além de ter sido detectado acúmulo intracelular desses metais, demonstrado pela remoção de metais do meio de cultivo e por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados observados indicam a possibilidade de se utilizar o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 como uma bactéria eficiente em processos de biorremediação e fitorremediação de ambientes contaminados por metais potencialmente tóxicos por apresentar resistência a diversos metais e ter possibilidade de atuar como promotora de crescimento em plantas bioacumuladoras

Palavras-chave: biorremediação; fitorremediação; genes de resistência; metais pesados; sequenciamento genético

GENOMES APPLIED TO THE PREDICTION OF MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE TO POTENTIALLY TOXIC METALS AND PROMOTION OF PLANT GROWTH IN *Rhizobium* sp. LBMP-C04

ABSTRACT – The association of microorganisms with hyperaccumulating plants of potentially toxic metals (PTM) to remove, transfer or stabilize these elements from the soil is a suitable tool for bioremediation processes in contaminated environments. The ability of microorganisms to resist these environments depends on biochemical factors, physiological adaptations and their genetic adaptation. Therefore, the objective of this work is to evaluate the isolation capacity of *Rhizobium* sp. LBMP-C04 to be used for bioremediation and plant growth promotion in metal contaminated soils. For this purpose, in this work a prediction of genes related to PTM metabolism, growth promotion genes and antimicrobial resistance genes was performed, as well as the performance of biochemical tests to prove these characteristics *in vitro* of the bacterium *Rhizobium* sp. LBMP-C04. Through the linked annotations of the sequenced genome, it was possible to predict a variety of genes related to PTM resistance, plant growth promotion and antimicrobial resistance in the bacterial genome. Resistance genes are mainly associated with components related to efflux pumps, repair of DNA damage and the import or export of metal in bacterial cells, in order to maintain cell homeostasis. Genes that promote plant growth are related to mechanisms of osmotic stress tolerance, phosphate solubilization, nitrogen metabolism, biological nitrogen correction, biofilm formation, heat shock responses and indole-3-acetic acid biosynthesis (IAA), tryptophan and organic acids. The biochemical results indicate that the isolate *Rhizobium* sp. LBMP-C04 is able to solubilize calcium phosphate, produce siderophores and indole compounds *in vitro*; it was an isolate resistant to the antibiotics ampicillin, amoxicillin, rifampicin, nalidixic acid and trimethoprim. The isolate *Rhizobium* sp. LBMP-C04 presented MIC of 5, 14, 13, 12, 48 and 401 mmol dm⁻³ respectively to the metals Cd²⁺, Cu²⁺, Cr⁶⁺, Cr³⁺, Zn²⁺, and Ni²⁺, in addition to having detected intracellular accumulation of these, demonstrated by metal metals metals in the culture medium and by transmission electron microscopy. The observed results indicate the possibility of using the isolate *Rhizobium* sp. LBMP-C04 as an efficient bacterium in bioremediation and phytoremediation processes in environments contaminated by potentially toxic metals due to its resistance to several metals and being able to act as a growth promoter in bioaccumulating plants

Keywords: bioremediation; phytoremediation; genetic sequencing; heavy metals; resistance gene

1 INTRODUÇÃO

Os metais potencialmente tóxicos (MPT) (Ali and Khan, 2018) podem causar desnaturação de proteínas (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}); inibir a divisão celular (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+}), a atividade enzimática (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}) e a transcrição (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}); podem causar ruptura da membrana celular (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+}) e danos no DNA (Hg^{2+} , Pb^{2+} , As^{2+} e Cd^{2+}) (Fashola et al., 2016a). Para resistir e sobreviver ao ambiente tóxico, muitas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência ao estresse induzido por MPT. A capacidade de resistir a esses ambientes depende de fatores bioquímicos, estruturais, fisiológicos e de adaptação genética. Determinantes genéticos responsáveis pela resistência aos MPT são encontrados em muitas bactérias. Esses determinantes de resistência são mediados pelo genoma cromossômico, plasmídeos ou transposons e envolvem muitos genes resistentes a metais agrupados por operons como *czcD*, *nccA*, *pco*, *cop*, *mer*, *ars* (Nies, 2003; Fashola et al., 2016a).

A utilização de microrganismos com propriedades de resistência a múltiplos metais e capacidade de promover o crescimento das plantas em simbiose com plantas que acumulam metal para remover, transferir ou estabilizar os contaminantes do solo, torna esta técnica uma das escolhas mais adequadas para estudos de biorremediação (Khan et al., 2009). Esta técnica, denominada fitorremediação, utiliza ervas e plantas lenhosas hiperacumuladoras, capazes de remover, absorver ou tornar inofensivos contaminantes ambientais, como os MPT, compostos orgânicos e compostos radioativos no solo ou na água, devido à sua capacidade de transporte e acúmulo de contaminantes. Esse processo de remediação é um método seguro e promissor, sendo que as Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) são ideais para aumentar a eficiência dessa tecnologia, pois podem proporcionar um aumento no crescimento de plantas mesmo na presença de níveis elevados de metais, através de mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento, bem como aumentar a biodisponibilidade desses metais no solo (Ullah et al., 2015).

O Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) possui uma coleção de rizóbios isolados de diversos ambientes e hospedeiros e estuda esses isolados para possíveis aplicações biotecnológicas. O isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi estudado anteriormente por Moretto (et al., 2015), nesse estudo os autores observaram que o isolado apresentava relativa resistência aos íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , entretanto na presença desses elementos, sofriam algumas alterações em seus metabolismos, relacionadas principalmente à produção de exopolissacarídeos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho consiste na avaliação da capacidade do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em ser usado para biorremediação e promoção de crescimento vegetal em solos contaminados com metais. A fim de compreender os processos metabólicos envolvidos na homeostase dos metais por suas células e de genes de promoção de crescimento foi realizado o sequenciamento completo do genoma do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 e a predição dos genes de interesse. Além disso, avaliou-se, por testes bioquímicos e microbiológicos para comprovar essas características *in vitro* desse isolado em relação à resistência aos MPT, antimicrobianos e produção de moléculas envolvidas na estimulação do desenvolvimento vegetal. Nesses estudos, também foi possível classificar o isolado rizobiano e fornecer uma base teórica para aplicação deste microrganismo em processos de biorremediação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Poluição por metais potencialmente tóxicos

A poluição por MPT é um problema ambiental que tem aumentado devido às atividades antropogênicas. Os metais são constituintes naturais dos minerais encontrados na crosta terrestre, entretanto, não podem ser degradados e nem destruídos, representando um sério risco para saúde humana devido à sua bioacumulação e biomagnificação através da cadeia alimentar (Stankovic and Jovic, 2012). Seu alto teor ou sua presença em longo prazo, em águas e solos, é motivo de preocupação, pois podem prejudicar as

qualidades do solo e da água, a diversidade e população microbiana, além de causar doenças nos seres humanos, como Alzheimer e câncer (Bornhorst et al., 2018).

O resultado benéfico ou prejudicial de um metal para as células está relacionado com o tipo de metal, sua forma química e sua concentração disponível no meio ambiente. Os MPT como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} são micronutrientes para processos metabólicos e fisiológicos de plantas, humanos e microrganismos. Eles atuam na estabilização eletrostática de moléculas, regulação da pressão osmótica e alguns são cofatores para muitas enzimas e transportadores de elétrons (Haferburg and Kothe, 2007). Já os metais Ag^{2+} , As^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} não têm função biológica para os organismos vivos e são muito tóxicos para as células vivas.

Altas concentrações de MPT nos solos afetam diretamente a diversidade, o tamanho da população, a atividade metabólica, o crescimento, a morfologia e pigmentação das células bacterianas, resultando em alterações funcionais, rompimento da membrana celular ou desnaturação de proteínas. As bactérias são importantes na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e na absorção de nutrientes do solo para as plantas, de modo que a presença dos metais em altas concentrações causa uma seleção nas comunidades bacterianas, ocasionando uma redução na diversidade microbiana quando comparada a um ambiente não poluído (Fashola et al., 2016b).

2.2 Biorremediação

Uma abordagem para controlar a concentração de metais em ambientes contaminados por tais elementos é a biorremediação, na qual trata-se principalmente de intervenções biológicas mediadas por uma ampla gama de espécies biológicas como bactérias, fungos, algas e plantas- que podem ser usadas para remover compostos orgânicos e inorgânicos indesejados da biosfera, contribuindo dessa forma para a redução da contaminação e poluição ambiental (Prasad et al., 2010). Há uma variedade de técnicas de

biorremediação que foram desenvolvidas nos últimos anos, dentre elas, podemos citar: atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, biolixiviação, biofiltros, biopilagem, biossorção, “bioventing”, compostagem, “landfarming”, rizorremediação e fitorremediação (Cristaldi et al., 2017). Esses mecanismos promovidos por microrganismos apresentam alta eficiência, baixo custo e são ambientalmente corretos (Bornhorst et al., 2018).

2.2.1 Fitorremediação

A fitorremediação pode ser aplicada para remover contaminantes do solo e da água bem como para melhorar a gestão dos resíduos, pois muitos poluentes são prejudiciais à saúde. Esta técnica utiliza ervas e plantas lenhosas hiperacumuladoras, capazes de remover, absorver ou tornar inofensivos contaminantes ambientais, como os MPT, compostos orgânicos e compostos radioativos no solo ou na água, devido à sua capacidade de transporte e acúmulo de contaminantes (Tahir et al., 2017). Existem várias técnicas de fitorremediação e a escolha da técnica mais adequada vai depender da natureza dos contaminantes, a Figura 1 resume as principais técnicas de fitorremediação.

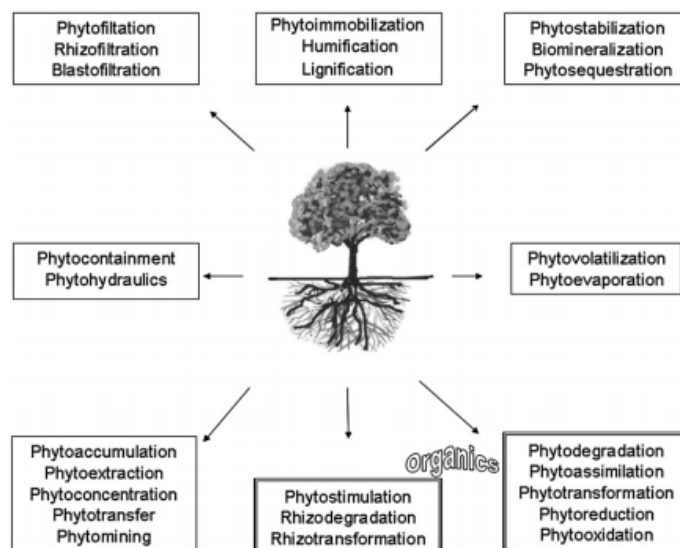


Figura 1. Técnicas de fitorremediação. (Mc Cutcheon and Schnoor, 2003).

As técnicas de fitoextração, fitoestabilização e rizofiltração são utilizadas para a remoção de MPT de solos contaminados, sendo a fitoextração a principal técnica de fitorremediação para a remoção de metais do solo. Nesta técnica, os contaminantes são absorvidos pelas raízes, transportados e acumulados nos brotos e folhas e a retirada dos contaminantes acontece com a colheita das plantas, incineração e aterro. Na fitoestabilização, os MPT são imobilizados no sistema radicular através da absorção das raízes, evitando a migração dos metais para o lençol freático e reduzindo a disponibilidade na cadeia alimentar. Já na rizofiltração os metais são mantidos ao nível da raiz, que, uma vez saturada desses elementos, será colhida (Cristaldi et al., 2017).

Duas das principais limitações dos processos de fitorremediação de MPT nos solos são a biodisponibilidade dos metais alvo e a capacidade das plantas de acumular os metais em sua biomassa acima do solo (Raskin e Ensley, 2000). Por isto, o uso de BPCV pode auxiliar na fitorremediação destes solos contaminados por tais elementos, pois podem proporcionar um aumento no crescimento de plantas mesmo na presença de níveis elevados de metais, através de mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento, bem como aumentar a biodisponibilidade desses metais no solo.

A utilização de microrganismos com propriedades de resistência a múltiplos metais e capacidade de promover o crescimento das plantas por meio de diferentes mecanismos em simbiose com plantas que acumulam metal para remover, transferir ou estabilizar os contaminantes do solo, torna esta técnica, uma das escolhas mais adequadas para estudos de biorremediação (Khan et al., 2009). É um método seguro e inovador para remediar ambientes contaminados por MPT, sendo que as BPCV são ideais para aumentar a eficiência dessa tecnologia (Ullah et al., 2015).

Em solos contaminados por MPT, geralmente os íons metálicos estão fortemente aderidos às partículas do solo, e por isto, eles não são facilmente absorvidos por plantas fitoextratoras. Em associação com as plantas, as BPCV auxiliam a remediação de solos contaminados por metais, uma vez que são capazes de secretar ácidos orgânicos, como láctico, cítrico, cetoglucônico, málico, glicólico, oxálico, malônico, tartárico, valérico, piscídico, succínico e

fórmico, os quais têm propriedades quelantes e solubilizantes. Dessa forma, os ácidos orgânicos atuam solubilizando os metais insolúveis e biologicamente indisponíveis como Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} e facilitando a biodisponibilidade do metal para a absorção pela planta (Rawat et al., 2021; Wei et al., 2018).

As associações simbióticas entre os rizóbios e as plantas leguminosas, são importantes para a fitorremediação, pois estes microrganismos são essenciais para a colonização das leguminosas em solos deficientes em nitrogênio, corroboram para o crescimento vegetal e para a limpeza de poluentes tóxicos no meio ambiente, seja por remoção ou imobilização (Fagorzi et al., 2018; Prasad et al., 2010).

Um estudo avaliou a capacidade de *Vicia faba*, *Lens culinaris* e *Sulla coronaria* para a fitoestabilização de Cu^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} respectivamente, quando inoculadas com bactérias promotoras de crescimento resistentes a MPT. Os resultados mostraram que as três simbioses acumulavam metais majoritariamente nas raízes e pouco nos ramos, a inoculação aumentou o acúmulo de cádmio nas raízes de *S. coronaria* e diminuíram a disponibilidade de MPT no solo em até -10% de Cu^{2+} e -47% de Pb^{2+} , respectivamente, nas raízes da *V. faba* e *L. culinaris*. Também aumentaram a produção de biomassa de raízes e da parte aérea e aumento da fixação de nitrogênio (Saadani et al., 2016).

Outro estudo abordou o isolamento e caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio nativas de áreas de mineração de carvão, as bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* foram inoculadas nas plantas *Macroptilium atropurpureum* e *Vicia sativa*, os resultados indicaram que estas bactérias são promissoras como inoculantes e biofertilizantes para leguminosas em áreas contaminadas por MPT (Ferreira et al., 2018b). A bactéria *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 também foi inoculada em mudas de *Medicago sativa* sob estresse de Cu^{2+} para se avaliar os efeitos no crescimento vegetal e na acumulação de metal. Os resultados mostraram que a inoculação da bactéria diminuiu a inibição do crescimento induzida por Cu^{2+} , aumentou a concentração de nitrogênio e da quantidade

total de absorção de Cu^{2+} nas plantas quando comparadas ao controle (Chen et al., 2018).

As plantas hiperacumuladoras de MPT, como as espécies *Medicago sativa* (Chen et al., 2018), *Robinia pseudoacacia* (Fan et al., 2018), *Glycine max* (Bianucci et al., 2018) e *Sulla conoraria* (Saadani et al., 2016) se associam a rizóbios e crescem naturalmente em ambientes contaminados, apresentando a capacidade de absorver o metal do solo, bioacumular os íons metálicos dentro de si e desintoxicar os contaminantes do solo (Prasad et al., 2010). Muitos estudos têm focado em selecionar cepas de rizóbios resistentes aos metais para que estes corroborem com o crescimento vegetal (Fagorzi et al., 2018; Rosariastuti et al., 2020, 2019; Rubio-Sanz et al., 2018). Do mesmo modo, alguns estudos mostram que linhagens nativas de *Bradyrhizobium* podem estimular o crescimento de leguminosas por uma simbiose efetiva em solos contaminados com As^{2+} . Essa associação planta-rizóbio promoveu o acúmulo de MPT principalmente em raízes, sem a presença do As^{2+} nas sementes (Bianucci et al., 2018).

2.3 Mecanismos de resistência bacteriana a metais potencialmente tóxicos

Muitas bactérias podem resistir e sobreviver ao estresse causado pelos MPT. Quando as bactérias são expostas a condições que ultrapassam seu limite tolerável de metal, os mecanismos de resistência que auxiliam na homeostase intracelular são desencadeados para que a bactéria possa sobreviver nesse ambiente tóxico. A capacidade de resistir a esses ambientes depende de fatores bioquímicos, estruturais, fisiológicos e de adaptação genética. Determinantes genéticos responsáveis pela resistência aos MPT são encontrados em muitas bactérias. Esses determinantes de resistência são mediados pelo genoma cromossômico, plasmídeos ou transposons, são agrupados por operons e, quando expressos, podem conferir resistência aos MPT (Fashola et al., 2016c). Sendo que os genes plasmidiais podem ser transmissíveis na natureza e disseminados através da transferência horizontal (Osman et al., 2019).

Os mecanismos moleculares usados por *Rhizobium tropici* para tolerar altas concentrações de MPT tem sido estudados, e podem ser preditos através de estudos das sequências genômicas de vários genes envolvidas na resistência aos metais, como os genes *cop* e *fix*, envolvidos na homeostase do cobre (Elizalde-Díaz et al., 2019) e o gene *arsR*, regulador da transcrição do sistema genético *ars*, responsável pela resistência ao arsênio (Mandal et al. 2008).

O gene *cop* está envolvido na resistência ao íon cobre e existem dois mecanismos de resistência independente, os operons *copMRS* e *copBAC*, que são expressos em resposta ao cobre. As proteínas Cop foram primeiramente estudadas em *Pseudomonas syringae* patovar *tomate*. Nesse organismo, CopA e CopC são proteínas periplasmáticas e CopB uma proteína da membrana externa que medeiam o sequestro de cobre fora do citoplasma através de um mecanismo de resistência ao cobre através do efluxo de metal, evitando a entrada dos íons metálicos tóxicos para dentro do citoplasma, mantendo-os no espaço intermembrana (Granja-Travez and Bugg, 2018). O gene *copM*, por sua vez, codifica uma proteína periplasmática capaz de se ligar a Cu^{2+} com alta afinidade e capacidade de conferir resistência ao cobre; está localizado no periplasma e também no espaço extracelular, sugerindo que esse gene pode prevenir o acúmulo de cobre por ligação direta do cobre fora da célula (Giner-Lamia et al., 2015).

A resposta a exposição ao níquel pode ser desencadeada pelos genes *nikR* e *hoxN*. O gene regulador responsivo ao níquel *nikR* é um repressor transcricional do operon *nikABCDE* e é ativo na presença de concentrações excessivas de níquel intracelular. Em condições de excesso de níquel, bombas de efluxo são usadas para eliminar a sobrecarga desses metais no citoplasma bacteriano (Sharma and Shukla, 2021). *hoxN* codifica uma proteína transportadora responsável pela captação de níquel. Em uma abordagem de exclusão estratégica de genes em *Cupriavidus metallidurans*, para avaliar a resistência dessa bactéria a metais, a cepa mutante D7 apresentou resistência diminuída ao níquel em comparação à cepa controle, como resultado da exclusão do importador de níquel *hoxN* (Herzberg et al., 2016).

Muitas famílias de proteínas são identificadas como proteínas de efluxo de Cd^{2+} através da membrana plasmática e da membrana externa, incluindo os sistemas Czc da superfamília de resistência-nodulação-divisão RND (em bactérias Gram-negativas) que compreende as proteínas CzcA, CzcB, CzcC, CzcD e CzcR. Dessa forma, Cd^{2+} pode ser secretado do citosol para o vacúolo ou locais extracelulares (Xia et al., 2021).

Os genes *chrABCEFI* codificam proteínas reguladoras envolvidas na resistência ao cromo (A. Morel et al., 2016). A identificação dos genes de resistência ao cromo localizados no transposon TnOtChr da cepa *Ochrobactrum tritici* 5bv11 que cresceu em concentrações de cromo superior a 50 mmol dm^{-3} foi estudada; o transposon contém o grupo de genes *chrABCF*. Os genes *chrB* e *chrA* foram importantes para a alta resistência da cepa ao cromo, sendo que o gene *chrA* codifica uma proteína de efluxo de cromo, responsável pela atividade de uma bomba de efluxo na qual suprime o acúmulo de cromo celular (Branco et al., 2008).

Para resistir a níveis elevados de cromo, as bactérias também podem dispor-se dos mecanismos de: biossorção e bioacumulação de Cr^{6+} ; podem reduzir o Cr^{6+} para Cr^{3+} , e também realizar a redução do estresse oxidativo através de proteínas do sistema de recombinação, replicação e reparo de DNA (LexA e RecG) (Ramírez-Díaz et al. 2008; Viti et al., 2014). A capacidade de redução do Cr^{6+} para Cr^{3+} é benéfica para o microrganismo, uma vez que Cr^{6+} causa estresse oxidativo intracelular e danos ao DNA, enquanto Cr^{3+} não entra tão facilmente nas células e possui menor toxicidade para as células. A redução do Cr^{6+} pelas bactérias pode ser dividida em redução enzimática e redução não enzimática, a maioria das redutases solúveis intracelulares foram identificadas com Cr^{6+} como ChrR, YieF, FerB, NfsA, NfsB, NemaAzoR, Frp, YcnD, NfoR e CsrF (Xia et al., 2021).

Para manter a homeostase, as bactérias têm a capacidade de importar ou exportar Zn^{2+} de suas células, através de transportadores caracterizados por diferentes afinidades com o metal. Em condições de escassez do Zn^{2+} as bactérias empregam transportadores de alta afinidade *znuABC* na resposta bacteriana à falta de zinco, demonstrando que este transportador tem um papel

importante na adaptação de bactérias à limitação de zinco. Esses transportadores consistem em três proteínas, ZnuA, ZnuB e ZnuC, codificadas pelos genes *znuABC*. A energia requerida para transportar os íons de Zn^{2+} desse sistema vem da hidrólise do ATP, que é realizada pela ZnuC; enquanto ZnuA é uma proteína periplasmática de ligação que interage com ZnuB, uma permease da membrana interna (Suryawati, 2018).

O gene *zupT*, por sua vez, é responsável pela absorção de zinco e desempenha um papel importante na homeostase desse metal nas bactérias. Esse gene é um transportador de metal com ampla especificidade de substrato (Zn^{2+} , Ferro, Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+}), entretanto, é observado que tem maior preferência por zinco. Um estudo com RT-PCR quantitativo foi usado para investigar os níveis de expressão de mRNA do gene putativo *zupT* e indicaram que esse gene é um importador de zinco de baixa afinidade o que sugere que *zupT* é significativo para a prevenção da toxicidade a Zn^{2+} pelas células bacterianas (Ge and Ge, 2016).

BPCV com potencial de desintoxicação de MPT podem aumentar a eficiência da fitorremediação, promovendo o crescimento das plantas mesmo em altas concentrações de metais nos solos (Ahemad, 2015). Estas bactérias podem interagir com os metais por meio de muitos mecanismos (Figura 2), os quais podem ser usados como base para estratégias de biorremediação em potencial.

A capacidade das bactérias de crescer em altas concentrações de MPT é o resultado de mecanismos intrínsecos ou induzidos. A tolerância é definida como a capacidade de lidar com a toxicidade do metal por meio de características intrínsecas do microrganismo; já a resistência é a capacidade das bactérias de sobreviver em altas concentrações de MPT por meio de mecanismos de desintoxicação, que são ativados em resposta direta à presença de metais (Ledin, 2000). Entretanto, para sobreviver e se multiplicar em solos contaminados com metais, a tolerância deve ser uma característica presente tanto nos microrganismos quanto em suas plantas hospedeiras (Khan et al., 2009).

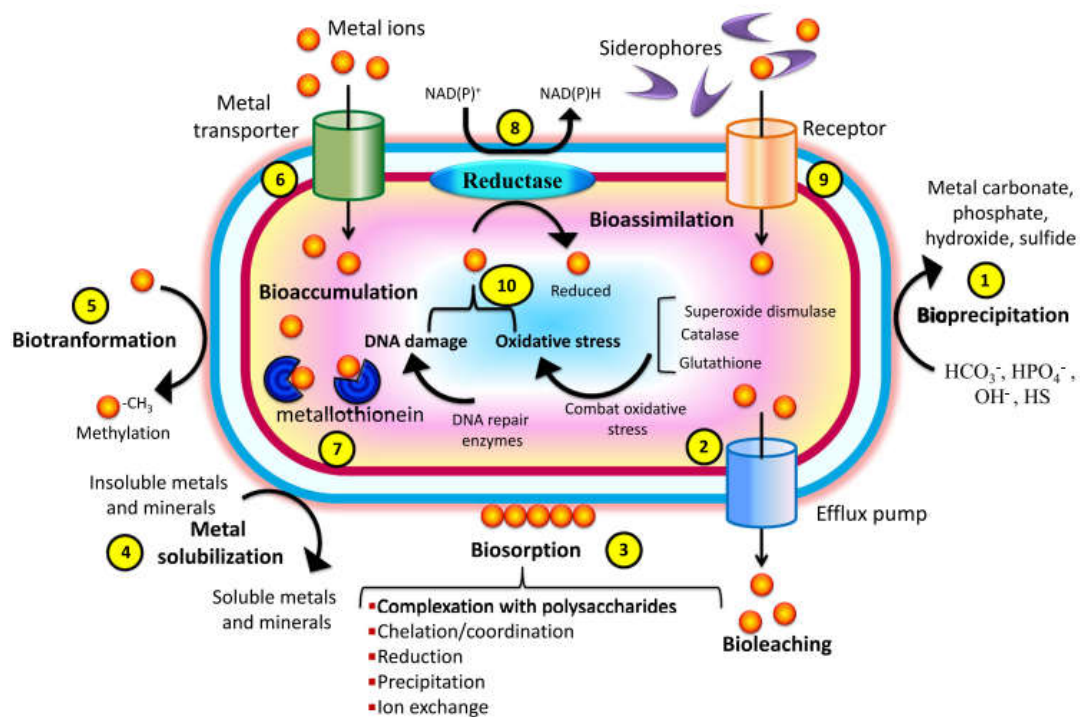


Figura 2. Interações bacterianas com metais potencialmente tóxicos em solos poluídos por metal. 1 Precipitação; a precipitação ou cristalização dos MPT ocorre devido a reações intercedidas por bactérias ou como consequência da produção de alguns metabólitos específicos. 2 Bombas de efluxo; as bombas de efluxo expõem para fora da célula os metais acumulados internamente. 3 Biossorção; as células bacterianas podem produzir um composto extracelular de polissacarídeos que estão presentes em sua superfície celular, na qual os íons metálicos podem se ligar. 4 Solubilização dos metais; as bactérias podem produzir e secretar ácidos orgânicos capazes de solubilizar os metais insolúveis. 5 Metilação; em algumas bactérias o mecanismo de resistência aos MPT envolve a metilação, na qual há a transferência do grupo metila para os metais. 6 Transporte de metal; transportadores de metal transportam os metais para dentro da célula bacteriana através da membrana citoplasmática. 7 Bioacumulação; as bactérias podem acumular concentrações elevadas de metais dentro de suas células. 8 Redução; enzimas específicas, denominadas redutases, reduzem os metais na presença de doadores de elétrons. 9 Produção de sideróforos; a secreção destas moléculas diminuem a biodisponibilidade do metal. 10 Combate ao estresse oxidativo e sistemas de reparo de DNA (Ahemad, 2015).

2.4 Remoção de metais potencialmente tóxicos por bactérias e sua alocação

Os estudos com bactérias resistentes aos MPT têm como enfoque a utilização destes microrganismos na biorremediação de ambientes contaminados, uma vez que os microrganismos são uma solução viável, pois podem atingir diferentes processos de transformação e imobilização.

A bioacumulação é um processo de transporte de MPT dependente de energia que envolve o metabolismo celular de células vivas, na qual os microrganismos capturam os metais para seu espaço intracelular usando mecanismos de importação através da bicamada lipídica por meio de permeação complexa, endocitose e bomba de íons mediada por transportadores. Dentro das células, os íons metálicos são ligados por proteínas e peptídeos, como as metalotioneínas, que formam complexos com o metal, através de um sistema de armazenamento. Desempenhando um importante papel na imobilização do metal tóxico (Diep et al., 2018; Fashola et al., 2016c; Oves et al., 2017).

Quando o acúmulo de metal nas células bacterianas é independente do metabolismo celular, temos a biossorção. É um processo passivo, não enzimático e pode ocorrer tanto por biomassa bacteriana viva ou morta. A imobilização dos metais envolve a adsorção das partículas metálicas a uma matriz biológica usando interações físicas e químicas (forças eletrostáticas e deslocamento de íons ou prótons, respectivamente), por meio de troca de íons metálicos, complexação de superfície, coordenação, quelação e microprecipitação. Em pH neutro, a superfície extracelular das bactérias contém frações aniônicas que fornecem sítios de ligação para os metais catiônicos (Oves et al., 2017; Diep et al., 2018).

2.5 Gênero *Rhizobium*

O gênero *Rhizobium* contempla bactérias Gram-negativas que fazem parte de um grupo parafilético de bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes à classe Alpha/Beta-proteobacteria (Berrada, 2014). Os rizóbios

são conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas fixadoras de nitrogênio devido à sua capacidade de formar uma simbiose funcional com leguminosas. Os rizóbios fornecem às plantas N fixado e obtêm energia das plantas na forma de ácidos orgânicos, principalmente ácidos dicarboxílicos (Iyer and Rajkumar, 2019). Além disso, os rizóbios também podem colonizar a rizosfera de plantas não leguminosas, vivendo dentro dos tecidos das plantas como endófitos.

Por sua capacidade de beneficiar as plantas também por outros mecanismos, os rizóbios têm sido classificados como microrganismos com alto potencial para atuar como eficientes rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (Vargas et al., 2017). Embora a maioria dos estudos com rizóbios promotores de crescimento vegetal sejam em solos livres de MPT, há evidências que em solos contaminados por MPT em baixas concentrações não exercem efeito prejudicial sobre estes microrganismos e até mesmo estimulam atividades de promoção do crescimento das plantas.

Wani et al. (2008), estudaram os efeitos dos metais Cd^{2+} , Cu^{2+} e Cr^{6+} usados separadamente e como misturas no crescimento de plantas de ervilha inoculadas com *Rhizobium* sp. Os resultados da adição dos metais diferiram entre os metais, sendo que o Cu^{2+} foi o mais tóxico e reduziu a matéria seca total em 18% (1.338 mg kg^{-1} solo) quando comparado ao controle. Entretanto, a mistura de Cd^{2+} (24 mg kg^{-1} solo) e Cr^{6+} (136 mg kg^{-1} solo) aumentou a matéria seca em 16%, em relação à testemunha. Cd^{2+} e o Cr^{6+} , quando usados isoladamente não reduziram o crescimento da ervilha. Isto sugere que a toxicidade desses metais pode ter sido inibida por exsudatos da raiz de ervilha ou mudanças de pH da rizosfera (Prasad, 2004).

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias rizobianas podem ser diretos ou indiretos. Os mecanismos diretos são aqueles que resultam na promoção direta do crescimento da planta, estes incluem: a produção de moléculas orgânicas análogas aos hormônios vegetais como: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, fenólicos, alcalóides e brassinosteróides; fixação de nitrogênio atmosférico (N_2), solubilização de fosfato e sequestro de ferro por sideróforos.

Os mecanismos indiretos empregam características das bactérias que inibem o funcionamento de um ou mais organismos patogênicos de plantas, tanto fungos quanto bactérias. Como mecanismos indiretos temos: o controle biológico de fitopatógenos, produção de antibióticos, compostos cianogênicos e enzimas hidrolíticas, ACC desaminase, quorum quenching, disparo de resistência sistêmica induzida; resistência ao estresse abiótico, como extremos de temperatura; salinidade; acidez do solo; resistência aos MPT e tolerância a pesticidas (Glick, 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Olanrewaju et al., 2017; Vargas et al., 2017)

Muitas rizobactérias associadas às plantas em desenvolvimento podem sintetizar e liberar fitohormônios, devido ao solo rico em substratos exsudados das raízes, atuando diretamente na estimulação do crescimento vegetal. A síntese do ácido-indol-acético (AIA), fitohormônio da série auxina tem influência em todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, desempenham papel importante na divisão celular, alongamento, desenvolvimento de frutos e senescência. É também uma molécula sinalizadora associada aos mecanismos de defesa da planta contra bactérias fitopatogênicas. O AIA e seu precursor metabólico, o ácido antranílico, podem solubilizar o Fe^{3+} do solo e aumentar sua biodisponibilidade através de mecanismos diferentes dos sideróforos (Spaepen et al., 2007; Khan et al., 2009; Brígido and Glick, 2015).

As rizobactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas aumentam o crescimento das leguminosas por fornecer N às plantas por meio da fixação biológica do N_2 . O estabelecimento da simbiose envolve uma interação complexa e específica entre a planta hospedeira e o microrganismo simbiote. No nódulo da raiz, a bactéria fixa o N_2 por meio do complexo nitrogenase e produz amônia. Nessa relação simbiótica mutualística a planta fornece às bactérias carbono fixado - oriundo da fotossíntese, na qual a bactéria necessita para crescer enquanto continua a fixar o N_2 nos nódulos (Ahemad 2014; Olanrewaju et al., 2017). Estas bactérias também podem aumentar a disponibilidade de nutrientes na rizosfera, induzir o aumento da superfície da raiz, promover outras simbioses benéficas à planta, prevenir ataques de fitopatógeno e aumentar a fertilidade dos solos com N fixado, aumentando a

produtividade da cultura para o cultivo subsequente de não leguminosas (Khan et al., 2009; Brígido and Glick, 2015).

O fósforo, assim como o N, é um nutriente importante para o crescimento das plantas e está amplamente distribuído nos solos, entretanto, a quantidade de formas disponíveis para as plantas é geralmente baixa. As BPCV podem promover o crescimento das plantas através da solubilização de fosfato inorgânico que pode ocorrer de duas formas: 1. pela ação de ácidos orgânicos sintetizados por estas bactérias, como os ácidos glucônico ou ceto-glucônicos e o ácido cítrico. Os ácidos orgânicos produzidos quelam cátions ou reduzem o pH, resultando na acidificação das células microbianas e seus arredores, dessa forma, os íons de fósforo são liberados (Olanrewaju et al., 2017); 2. pela mineralização do fosfato orgânico através da síntese de fosfatases, catalisando a hidrólise dos ésteres fosfóricos (Glick, 2012).

A mineralização de fosfato diz respeito à solubilização do fosfato orgânico e à degradação das porções restantes da molécula que é desencadeada pela indisponibilidade de fósforo suficiente no solo (Olanrewaju et al., 2017). Ressaltando que ambos os mecanismos podem coexistir na mesma cepa bacteriana (Tao et al., 2008). Dessa forma, as BPCV solubilizadoras de fosfato podem fornecer as formas disponíveis de P para as plantas e, portanto, um substituto viável para fertilizantes fosfatados químicos que são caros e ambientalmente indesejados.

Nos solos, o ferro ocorre principalmente como ferro férrico (Fe^{3+}) e pode formar hidróxidos e oxihidróxidos insolúveis, de modo que a quantidade de ferro disponível para assimilação por organismos vivos é extremamente baixa.

Como o Fe é um micronutriente essencial para as rizobactérias, estas são capazes de produzir uma molécula quelante, denominada sideróforo. Os sideróforos são moléculas pequenas de peptídeos com baixo peso molecular, solúveis em água, com cadeias laterais e grupos funcionais aos quais os íons férricos podem se ligar (Goswami et al. 2016).

O Fe^{3+} se liga ao sideróforo e forma um complexo ferro-sideróforo (agora solúvel) na membrana bacteriana, e então o ferro é absorvido por receptores

específicos nas superfícies de bactérias ou plantas. Em seguida, após a redução para o estado ferroso (Fe^{2+}) ou clivagem da molécula de sideróforo, o ferro é liberado do sideróforo através de um mecanismo de passagem que liga as membranas interna e externa. Proporcionando, assim, a absorção de ferro pelos microrganismos, mesmo em condições de limitação de ferro (Ahemad, 2015; Ahemad and Kibret, 2014; Glick, 2012; Olanrewaju et al., 2017).

As BPCV que produzem sideróforos associadas com plantas hiperacumuladoras apresentam um importante papel para a fitorremediação, uma vez que os sideróforos também podem formar complexos estáveis com outros MPT como Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ga^{2+} , In^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} , bem como com radionuclídeos incluindo U e Np. Dessa forma, a ligação do sideróforo a um metal aumenta sua biodisponibilidade na rizosfera das plantas, ajudando a aliviar o estresse imposto às plantas pelos altos níveis de MPT no solo (Neubauer et al., 2000; Rajkumar et al., 2010)

Outro mecanismo de promoção de crescimento vegetal é o biocontrole de fitopatógenos que pode ser realizada também pelos sideróforos. Nesse caso, os sideróforos produzidos pelas BPCV podem impedir que alguns fitopatógenos fúngicos adquiram o ferro, limitando assim sua capacidade de crescimento na rizosfera das raízes da planta hospedeira (Glick, 2012). Os sideróforos sintetizados pelas BPCV possuem uma afinidade muito maior para o ferro do que os sideróforos fúngicos, dessa forma, os sideróforos sintetizados pelas bactérias se ligando fortemente à maior parte do Fe^{3+} que está presente na rizosfera da planta hospedeira absorvendo o ferro, assim, os patógenos são incapazes de proliferar devido à falta deste elemento, fazendo com que percam a capacidade de agir como patógenos (Olanrewaju et al., 2017).

Os rizóbios com propriedades de promoção de crescimento vegetal e resistência aos MPT são os microrganismos de maior interesse nos processos de fitorremediação de metais, por sua capacidade de remediar estes solos contaminados e ajudar no crescimento das plantas. As espécies de rizóbios que são tolerantes aos MPT podem se associar às raízes das leguminosas, nodular a planta hospedeira e aumentar os níveis de metal na planta. Os nódulos radiculares atuam fornecendo às plantas mais um local para estocar

os metais e reduzir o risco de exposição direta da planta aos metais. Dessa forma, os rizóbios fixadores de N, além de contribuir com o crescimento vegetal pela fixação biológica de N, também auxiliam no crescimento vegetal por meio da adsorção e tolerância a metais. (Brígido and Glick, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento bacteriano

A bactéria utilizada neste estudo foi isolada do hospedeiro *Arachis pintoi*, coletado em março de 2006 do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP Jaboticabal, cujas coordenadas são: Latitude S21,243070° e Longitude W48,299392°. O isolado faz parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia. A Figura 3 ilustra o fluxograma com as atividades desenvolvidas neste trabalho.

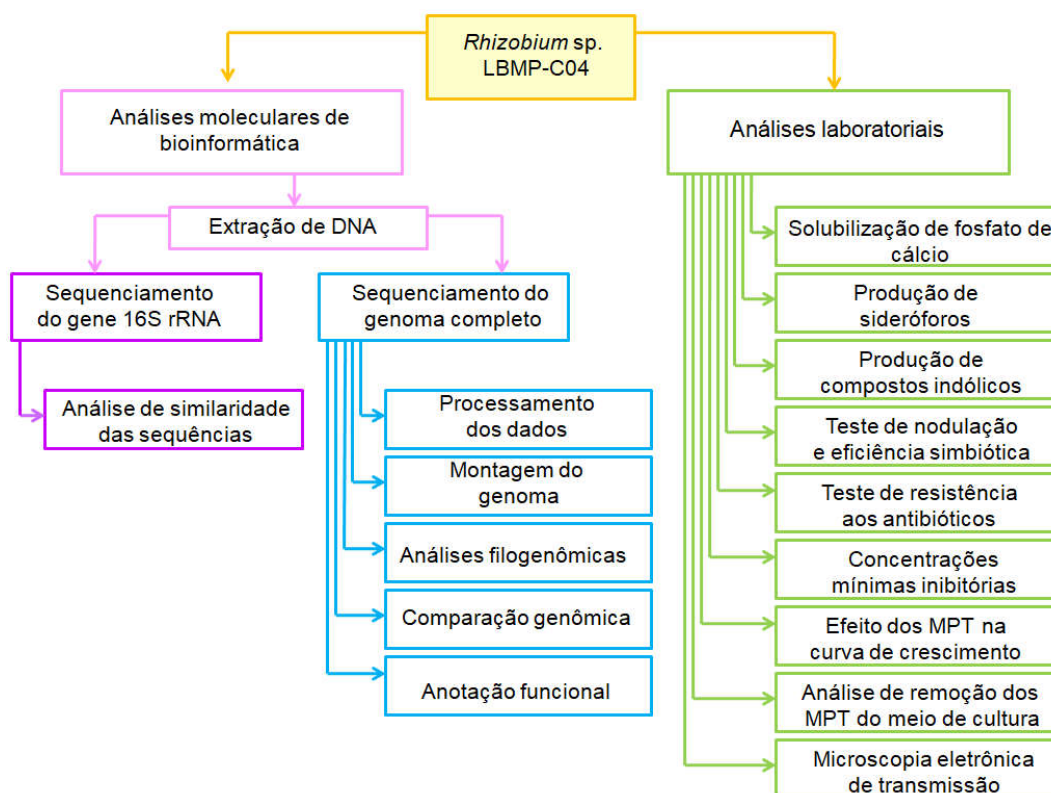


Figura 3. Fluxogramana das atividades desenvolvidas neste trabalho

3.2 Análises moleculares de bioinformática

3.2.1 Extração de DNA, Amplificação e Purificação

O isolado foi cultivado em meio de cultura caldo nutriente (CN) constituído por gL⁻¹: extrato de levedura 3,0; peptona de soja 15,0; glicose 1,0 (Sigma Aldrich, St Louis EUA) por 48 horas a 30 °C e 130 rpm em shaker horizontal. Após este período, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi utilizado para posterior extração do DNA. O DNA genômico do isolado foi extraído usando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído teve os fragmentos da região 16S rRNA amplificados, por técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando os primers universais fD1 e rD1 (Weisburg et al. 1991). O produto da amplificação por PCR foi purificado com usando o kit Zymoclean Gel DNA Recovery.

3.2.2 Sequenciamento dos fragmentos 16S rRNA e análise de similaridade das sequências com bancos de dados

O sequenciamento Sanger foi realizado em um sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas, processadas e montadas usando os pacotes de software Phred / Phrap / CONSED (Ewing e Green 1998; Ewing et al. 1998; Gordon et al. 1998). Para análise comparativa com sequências similares, foram utilizados os bancos de dados públicos: 1. BLASTn do Nacional Center for Biotechnology Information (Y. Chen et al., 2015); 2. Sequence Match do Ribossomal Database Project (Cole et al., 2014) e 3. Sequence Search do Silva Database (Quast et al., 2012).

3.2.3 Extração de DNA e sequenciamento do genoma completo

O DNA genômico do isolado foi extraído usando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) e a quantificação do DNA foi realizada usando o equipamento Qubit

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A construção da biblioteca genômica foi realizada usando o Nextera XT Library Preparation Kit (Illumina, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq usando química v2, 2x250bp (Illumina, Inc., San Diego, CA).

3.2.4 Processamento dos dados e montagem do genoma

A remoção dos adaptadores foi realizada usando o Atropos v1.1.19 (Didion et al., 2017). *Reads* de baixa qualidade foram filtradas utilizando PRINSEQ-Lite v0.20.4 (Schmieder and Edwards, 2011), sequências com *score* médio ≤ 20 foram aparadas e comprimento inferior a 20 bp foram filtradas.

A montagem da sequência foi realizada usando o programa Spades v3.10 (Bankevich et al., 2012), usando as opções: -k 21,33,55,77,99,127, --cov-cutoff auto and -careful. A montagem foi submetida ao processo de scaffolding usando SSPACE (Boetzer et al., 2011). Sequências de plasmídeos foram preditos com a ferramenta PlasFlow usando parâmetros padrão (Krawczyk et al., 2018).

3.2.5 Análises filogenômicas

O consenso do *core-genome* foi calculado para genomas do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* a partir da interseção de agrupamentos computados pelo algoritmo Bidirectional Best-Hit – BDBH (Sankoff, 2003), Orthologs Markov Clustering Algorithms – OMCL (Kim et al., 2011) e Cluster of Orthologous Group – COG (Tatusov, 2000) implementados no GET_HOMOLOGS (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013). O *core-genome* foi processado com GET_PHYLOMARKERS (Vinuesa et al., 2018). Os genes marcadores selecionados foram concatenados e o melhor modelo de substituição e a topologia da árvore foram construídos empregando-se o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) (Murshudov et al., 1997), a partir da ferramenta IQ-TREE (Nguyen et al., 2015) implementada no pipeline do GET_PHYLOMARKERS (Vinuesa et al., 2018).

3.2.6 Comparação genômica

A identidade média de nucleotídeo (ANI) foi calculada com a ferramenta OrthoANI (Lee et al., 2016a) e a distância genômica foi obtida por meio da Calculadora de Distância de Genoma a Genoma (GGDC) (Auch et al., 2010), considerando valores de Hibridização DNA-DNA (DDH) derivados das distâncias de GGDC usando a fórmula 2 (Meier-Kolthoff et al. 2013). Para comparar o genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04 com *Rhizobium tropici* CIAT 899 calculamos o alinhamento usando o algoritmo Progressive Mauve (Darling, 2004).

3.2.7 Anotação funcional

Os genes codificadores de proteínas do genoma do isolado *Rhizobium* sp LBMP-C04 foram preditos usando o pipeline Prokka (v1.11) (Seemann, 2014) e anotados com EggNOG-mapper (v.1.0.3) (Huerta-Cepas et al., 2017) com a opção padrão DIAMOND (Buchfink et al., 2015) usando o banco de dados eggNOG (v.4.5) (Huerta-Cepas et al., 2016). Os genes de resistência aos antimicrobianos e metais foram preditos usando BacMet (Pal et al., 2014) com 60% de identidade. E as sequências de aminoácidos preditas para o genoma bacteriano foram submetidas à anotação de genes relacionados à promoção de crescimento vegetal por meio de alinhamento usando a ferramenta DIAMOND (Buchfink et al., 2015), configurando os seguintes parâmetros: --ultra-sensitive --max-target-seqs 1 --query-cover 80, com 60% de identidade. O banco de dados compreende diversos genes ortólogos baseados no KEGG (Kanehisa et al., 2016), que estão direta ou indiretamente associados à promoção de crescimento vegetal reportados na literatura.

3.3 Análises laboratoriais bioquímicas, microbiológicas e de resistência a metais

3.3.1 Solubilização de fosfato de cálcio

Para avaliar a capacidade do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em solubilizar fosfato bicálcico, o isolado foi cultivado em National Botanical

Research Institute's Phosphate growth médium (NBRIP) sólido (g L^{-1}): 10,0 glicose; 5,0 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 KCl, 0,1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 15,0 ágar bacteriológico (Nautiyal, 1999). O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0. Para obter e padronizar o inóculo, o isolado foi inoculado em meio líquido CN a uma absorbância de 0,1 (OD600) que corresponde a 10^5 UFC mL^{-1} , e após 72 horas de cultivo a 30 °C e 130 rpm em shaker horizontal, uma alíquota de 25 μL foi inoculada nas placas de Petri contendo o meio NBRIP sólido.

As placas de cultura foram incubadas a 30 °C, e o diâmetro dos halos de solubilização (área translúcida ao redor da colônia) foram medidos após 15 dias de incubação. O índice de solubilização (IS) foi calculado pela Equação 1.

Equação 1:

$$\text{IS} = \text{A/B}$$

A= diâmetro total (colônia + zona do halo); B= diâmetro da colônia (Oves et al., 2017).

Com base neste índice de solubilização, a cepa foi classificada como tendo baixa ($\text{SI} < 2,00$), moderada ($2,00 < \text{SI} < 4,00$) ou alta ($\text{SI} > 4,00$) capacidade de solubilização e não solubilizadora de fosfato, quando não apresentou solubilização visível até o 15° dia de avaliação (Ruiz-Berraquero and Ramos-Cormenzana, 1977).

3.3.2 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada por meio da utilização de placas de Petri contendo o meio Chromeazurool Agar Assay (CAS) (Schwyn & Neilands 1987). Para isso, a bactéria foi crescida em meio CN sólido, constituído por g L^{-1} : extrato de levedura 3,0; peptona de soja 15,0; glicose 1,0; ágar bacteriológico 15,0 (Sigma Aldrich, St Louis EUA) e após 24 horas, foi realizado um repique e a bactéria foi inoculada nas placas de Petri contendo o meio CAS. As placas foram incubadas por 72h a 30 °C. Posteriormente, ao redor da

colônia, foi observada a presença de halos de cor laranja, que indicam a produção de sideróforos.

3.3.3 Produção de compostos indólicos

A capacidade de produção de compostos indólicos pelo isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi estimada utilizando a metodologia colorimétrica descrita por Sarwar & Kremer (1995). A bactéria foi inoculada a uma absorbância de 0,1 (OD600) em 20 mL de meio de cultura CN, suplementado com 100 µg mL⁻¹ de triptofano filtrado em millipore (0,2 µm), dispostos em erlenmeyers de 50 mL. Os erlenmeyers foram incubados por 72 horas a 30 °C e 130 rpm em shaker horizontal. Após este período, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos e sobrenadante coletado

A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada conforme o protocolo de Gordon e Weber (1951) e consistiu da mistura de 2 mL de reagente de Salkowski com 1 mL do sobrenadante da cultura, a qual foi reservada por 30 minutos em ambiente escuro para reação e manifestação de cor. A intensidade da cor foi determinada em um espectrofotômetro com leitura em 535 nm de absorbância, conforme Asghar et al., (2002). A concentração de compostos indólicos foi estimada utilizando uma reta padrão preparada quantidades conhecidas do hormônio (0; 1, 2, 3, 4, 5; 10; 20, 25; 50; 75; 100; 125 µg mL⁻¹) as quais foram obtidas por meio de diluições de uma solução de AIA comercial padrão (Sigma-Aldrich).

3.3.4 Teste de nodulação e eficiência simbiótica do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em *Leucaena leucocephala*

A capacidade de nodular e promover o crescimento vegetal da planta hiperacumuladora de metais *Leucaena leucocephala* foi avaliada através da inoculação do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04. As sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. Fabaceae, Mimosoideae, Eumimoseae) foram coletadas no ano de 2019 na Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Campus Jaboticabal e preservadas após o beneficiamento a

temperatura ambiente, em recipiente de plástico e vedado. Antes da semeadura, as sementes foram submetidas a um tratamento de quebra de dormência, com ácido H_2SO_4 concentrado por 20 minutos, lavadas duas vezes com água estéril, enxaguadas por 20 minutos em hipoclorito de sódio aquoso a 5% e lavadas dez vezes com água estéril. As sementes foram pré-germinadas em placas de Petri com algodão úmido estéril, incubadas a 28 °C até a emergência da radícula, e foram então inseridas nos tubetes a cerca de 1 cm da superfície.

Os tubetes de 375 mL continham uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 2:1 e foram previamente esterelizados. No momento do plantio, foi inoculado 1 mL de solução bacteriana ($UFC = 10^8 \text{ mL}^{-1}$) junto das plântulas e após 15 dias de cultivo, mais 1 mL de solução bacteriana foi inoculada. O isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi cultivado em meio YML modificado (g L^{-1} : 0,4 extrato de levedura; 10,0 manitol e 1,0 água destilada. pH 6.8) por 36 horas, a 30 °C e agitação de 130 rpm.

Dois controles negativos, ambos sem inoculação bacteriana, foram executados juntos e irrigados com solução de Hoagland & Arnon (1950), com alta ($52,5 \text{ mg L}^{-1}$) e baixa ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$) concentração de nitrogênio, na solução nutritiva (Rangel et al., 2017). Esta solução é composta por: 0,4 mL de $236,16 \text{ g L}^{-1} \text{ CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mL de $115,03 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,6 mL de $101,11 \text{ g L}^{-1} \text{ KNO}_3$; 2,0 mL de $246,9 \text{ g L}^{-1} \text{ de MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,0 mL de $87,13 \text{ g L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$; 10 mL de $12,6 \text{ g L}^{-1} \text{ CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 200 mL de $1,72 \text{ g L}^{-1} \text{ de CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 mL de $10 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ e 1 mL de solução de micronutrientes ($2,86 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $2,03 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0,22 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,08 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $0,09 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), que foram adicionadas a 4 L de água destilada.

Adicionalmente, um tratamento inoculado com a bactéria SEMIA 6070 (*Rhizobium* sp.) foi utilizada como controle positivo e cultivada sob as mesmas condições do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04. Os tratamentos inoculados tanto com o *Rhizobium* sp. LBMP quanto com a SEMIA 6070, foram irrigados com solução de Hoagland & Arnon, com baixa ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$) concentração de nitrogênio. A umidade do solo foi mantida sempre próxima à capacidade

máxima de retenção. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, constituído de 4 tratamentos, com 3 repetições cada.

Após 60 dias de plantio, o experimento foi desmontado. O sistema radicular foi cuidadosamente lavado em água corrente, sobre peneira, para coleta e contagem dos nódulos. A parte aérea das plantas foi cortada e separada das raízes, ambas foram medidas e depois acondicionadas em sacos de papel e colocadas para secar em estufa de ventilação forçada de ar a 65 °C por 72 horas até atingir massa constante para posterior pesagem. Os dados foram submetidos à análise de variação e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico R.

3.3.5 Teste de resistência aos antibióticos

A resistência aos antibióticos ampicilina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), estreptomicina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), trimetropina (5 mcg), tetraciclina (30 mcg), ácido nalidíxico (30 mcg), cloranfenicol (30 mcg), polimixina B (300 UI), vancomicina (30 mcg), azitromicina (15 mcg) e rifampicina (5 mcg) foi avaliada usando a técnica de difusão de disco de Kirby – Bauer (Bauer et al., 1966). Quatro discos de antibióticos foram colocados de forma asséptica em placas de Petri com meio CN sólido inoculados previamente com o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 e incubados a 30° C por 72 horas. O diâmetro de cada zona de inibição foi medido em milímetros (mm) e o isolado foi classificado como resistente ou sensível de acordo com o gráfico de disco de antibiótico padrão (Bauer et al., 1966; Naamala et al., 2016).

3.3.6 Preparação de soluções estoque de metais potencialmente tóxicos

Os metais Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , estavam na forma de $CdCl_2 \cdot H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $CrCl_3 \cdot 6H_2O$; $K_2Cr_2O_7$; $ZnSO_4$ e $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ respectivamente. Soluções estoques a 0,2 mol dm^{-3} foram preparadas dissolvendo cada um dos sais de metal em água deionizada, esterilizadas por filtração (0,22 μm Satorius Millipore) e armazenadas a 4°C.

3.3.7 Concentrações mínimas inibitórias: ensaio de resistência aos metais potencialmente tóxicos

As soluções estoques de metais foram adicionadas ao meio de cultura CN líquido nas concentrações de 0,25 até 405 mmol dm⁻³ de cada metal. O meio de cultura foi previamente tamponado com 50 mmol dm⁻³ de tampão Tris-HCl em pH 7.5 e distribuídos em erlenmeyers de 125 mL. A bactéria foi inoculada a uma absorbância de 0,1 (OD600) e os erlenmeyers foram incubados a 30 °C e 130 rpm em shaker horizontal. Após 24 horas de incubação, uma microgota da suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Petri com meio CN sólido sem a presença dos metais. As placas triplicadas foram incubadas a 30 °C por 5 dias até que o crescimento fosse observado e a MIC determinada (El-Deeb et al., 2013). A MIC foi determinada como a menor concentração de metal que inibiu completamente o crescimento do isolado bacteriano na placa de Petri (Bhardwaj et al., 2018; Nokman et al., 2019).

3.3.8 Efeito dos metais potencialmente tóxicos na curva de crescimento

A bactéria foi inoculada em 50 mL de meio CN líquido previamente acrescido das diferentes concentrações dos MPT: (mmol dm⁻³) Cd²⁺ (0,5), Cu²⁺ (1,0), Cr³⁺ (6,0), Cr⁶⁺ (1,0), Zn²⁺ (0,5), Ni²⁺ (2,0). Estas concentrações foram estabelecidas com base nos resultados obtidos nos experimentos de CMI, adotando as concentrações de metais em que todas as estirpes apresentavam capacidade de serem cultivadas. O isolado também foi cultivado em meio de cultura sem a presença dos metais, utilizado como controle negativo. Todos os tratamentos foram realizados com três repetições. As amostras foram coletadas em um intervalo de 24 horas por um período de 120 horas. Foi realizada uma diluição seriada e a amostra foi inoculada pela técnica de plaqueamento em superfície no meio CN sólido. As placas foram incubadas em BOD à 30 °C por 48 horas e o crescimento foi determinado pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3.3.9 Análise de remoção dos metais potencialmente tóxicos do meio de cultura do isolado bacteriano por espectroscopia de absorção atômica com chama

A bioacumulação de MPT por meio do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi determinada por análise espectroscópica de absorção atômica com chama (EAAC) (Sharma and Shukla, 2021). O isolado foi cultivado em meio de cultura CN líquido acrescido das diferentes concentrações dos metais: (mmol dm⁻³) Cd²⁺ (0,5), Cu²⁺ (1,0), Cr³⁺ (6,0), Cr⁶⁺ (1,0), Zn²⁺ (0,5), Ni²⁺ (2,0). O isolado foi cultivado em 150 mL de CN, nas mesmas condições de pH, inoculação, temperatura, agitação, tempo de incubação e concentração dos metais adotados para determinação da curva de crescimento. Todos os tratamentos foram realizados em três repetições. A cada 24 horas, uma alíquota do caldo bacteriano foi coletada e centrifugada por vinte minutos a 10000 rpm. A biomassa celular foi removida do sobrenadante e a concentração residual de cada metal presente no sobrenadante límpido foi estimada. As concentrações de metal remanescentes no sobrenadante foram medidas pela aplicação da Equação 2. A diferença entre a concentração inicial de íons metálicos e a concentração final de íons metálicos foi considerada como metal ligado (ou acumulado) no bioissorvente.

Equação 2:

$$\text{Bioacumulação de MPT (\%)} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

C_i = concentração inicial de íons metálicos no meio (mg L⁻¹); C_f = concentração final de íons metálicos no sobrenadante (mg L⁻¹) (Sharma and Shukla, 2021).

3.3.10 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a observação de acumulação de metais nas células do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi retirado 1mL do caldo bacteriano de cada tratamento do experimento de remoção de metais após 96 horas de cultivo. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos em 10000 rpm e o sobrenadante descartado. Este tempo de coleta foi estabelecido com base nos resultados

obtidos do teste de remoção dos metais, uma vez que este foi o tempo em que a concentração de metal no meio de cultura estava em sua menor concentração. Os sedimentos bacterianos obtidos foram lavados 3 vezes com tampão fosfato a $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 7.4 e fixado em solução de gliceraldeído 3% em tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, por 4 horas, a 4°C .

Posteriormente, estas amostras foram levadas ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde foram centrifugados, lavados e fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 7.4, por 2 horas, a 4°C . Em seguida, realizou-se a desidratação em gradiente de acetona (30, 50, 70, 90, 95 e 100%) e infiltração em araldite, por 72 horas a 60°C , finalizando o emblocamento. Foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrótomo e os cortes foram corados com azul de toluídina e, em seguida, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A visualização foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 (120kV).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Montagem do Genoma

Os genomas de *Rhizobium* variam de aproximadamente 4,8 a 8,4 Mb de comprimento com conteúdo de G + C em torno de 60% (Bamba et al., 2020; Reeve et al., 2010). O *draft* do genoma *Rhizobium* sp. LBMP-C04 (Tabela 1) indica que ele consiste de um cromossomo de 6,1 Mb de tamanho, distribuído em 29 contigs (15 cromossômicos e 14 plasmidiais) com tamanhos variando de 1300 a 1.845.876 bp, sendo o comprimento do contig N50 igual a 1.375.192 bp e com conteúdo médio de G + C de 59,7%. Este conjunto de contigs contém 55,90% dos genes codificadores de proteínas; 44,45% de genes hipotéticos; 59,98% de genes anotados com KEEG e 86,07% de genes atribuídos aos COGs; 3 rRNAs e 49 tRNAs.

Tabela 1. Resumo da montagem e anotação para o *draft* do genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04.

Features	Chromosome	Plasmids
Coding DNA (bp)	3756317	2345387
Contigs	15	14
Longest Scaffold	1375192	1845876
Shortest Scaffold	1300	2599
N50 scaffold length	482330	1845876
Total genes	3620	2161
Genes com funções preditas	2093	2062
Funções hipotéticas e/ou desconhecidas	1527	99
KO (KEGG Orthology)	2255	1183
COGs	3234	1856
rRNA	3	-
tRNA	49	-

4.2 Identificação do isolado pela amplificação do gene 16S rRNA

Após a amplificação, o produto de PCR do gene 16S rRNA foi sequenciado e a sequência obtida foi submetida a três bancos de dados distintos (GenBank, RDP e Silva database). Com base na sequência obtida do gene 16S rRNA total, o isolado C04 pode ser classificado como pertence ao gênero *Rhizobium* e à espécie *Rhizobium tropici*, com identidade de 98 a 99% com sequências cadastradas nos bancos, mais especificamente com a estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899. As respectivas similaridades com a sequência dos bancos de dados NCBI, Ribossomal Database Project e Silva Database são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação do gene 16S rRNA amplificado

Banco de dados	Organismo Identificado					
NCBI	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	% Identidade
		2651	2651	96%	0.0	99.25
Ribossomal Database Project	<i>Rhizobium tropici</i>					98
Silva Database	<i>Rhizobium</i>					99.5

A sequência de nucleotídeos do gene 16S rRNA tem sido um dos pilares da análise bacteriana por décadas. Com o advento dos sistemas de sequenciamento mais eficientes a classificação de uma bactéria considerando-se o sequenciamento parcial ou mesmo total (1500 pb) desse gene tem se mostrado controverso (Johnson et al., 2019). Pelo menos nos últimos 30 anos, as diretrizes para a descrição de novas espécies bacterianas recomendavam a hibridização DNA-DNA (DDH), o sequenciamento do gene 16S rRNA e a abordagem polifásica das características de um organismo; entretanto, estas técnicas possuem limitações, sugerindo a necessidade de uma revisão das diretrizes e recomendação para que as informações genômicas forneçam uma evidência primária para a afiliação de espécies (de Lajudie et al., 2019a).

As novas análises genômicas quantitativas estão começando a serem usadas na taxonomia rizobial; alternativas para estimar a relação do DNA, como a Identidade Média de Nucleotídeos (ANI), são atualmente muito melhores do que a DDH (Ormeño-Orrillo et al., 2015). Como o DDH, os valores de ANI entre duas sequências do genoma podem ser diferentes um do outro quando os cálculos recíprocos são comparados (Lee et al., 2016b). Um valor ANI de $95\% \pm 0,5\%$ de identidade corresponde a 70% do limiar de DDH para espécies (Goris et al., 2007), valores acima deste limiar indicam que compreendem a mesma espécie (Konstantinidis and Tiedje, 2005). Jain et al. (2018) apóia o conceito de delimitação de espécies por ANI $>95\%$ e propõe um ANI abaixo de 83% para interespecies.

Entretanto, não há uma correlação estrita entre ANI e a similaridade do gene 16S rRNA, mas geralmente, as cepas com $<98,7\%$ de identidade de sequência de 16S rRNA não pertencem à mesma espécie, todavia, o inverso nem sempre é válido, pois espécies diferentes podem ter sequências do gene 16S rRNA idênticas (Yarza et al., 2014)

Para Thompson et al. (2013), as cepas da mesma espécie procariótica compartilham $>95\%$ de Identidade Média de Aminoácidos (AAI) e ANI $>95\%$ de identidade com base em múltiplos genes de alinhamento, uma assinatura genômica de Karlin <10 e similaridade $>70\%$ *in silico* de Hibridização Genoma-Genoma (GGDH).

4.3 Análises filogenômicas

Determinamos as relações entre os genomas do *Rhizobium* a partir da análise filogenética construída com 378 genes marcadores presentes em genomas de 79 espécies de *Rhizobium* e 3 de *Bradyrhizobium*, como grupo externo. Conforme mostrado na Figura 4, o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 está evolutivamente mais próximo da estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899.

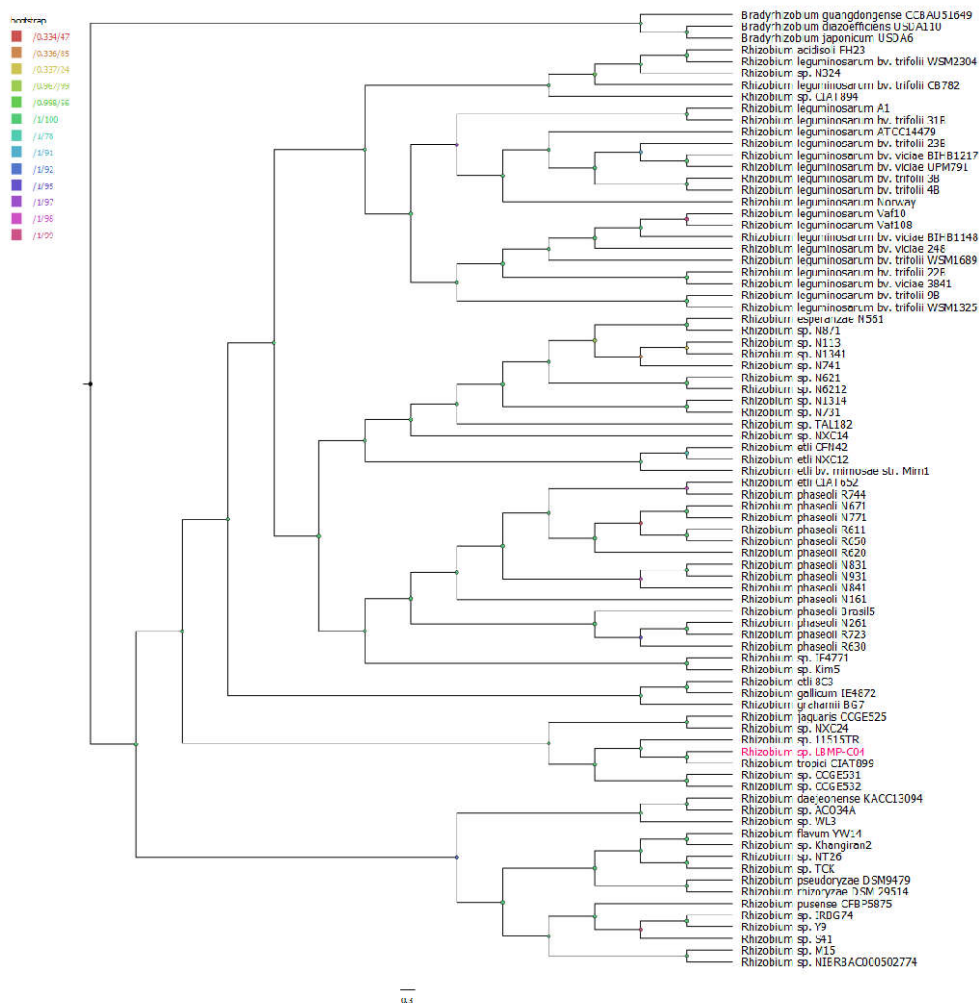


Figura 4. Análise filogenômica mostrando as relações evolutivas do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 com as 82 cepas sequenciadas da família Rhizobiaceae, construída com base em proteínas core definidas pelo pacote GET-HOMOLOGS e selecionadas para atributos filogenéticos ideais e a ferramenta GET-PHYLOMARKERS.

4.4 Comparação dos genomas

A análise comparativa com genomas pode ser usada para identificar similaridades e estimativa da relação genética entre microrganismos e estimativa da relação genética. O isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi comparado em nível genômico com todas as espécies de *Rhizobium*, as mesmas utilizadas na filogenia. Os resultados da comparação de genomas estão resumidos na Tabela 3 e demonstram que o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 é geneticamente mais semelhante à estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899 com valor ANI 90,20% e DDH igual 40,70% ($\pm 2,5$). Os valores encontrados apoiam a colocação sistemática da cepa LBMP-C04 no gênero *Rhizobium*, entretanto, não podemos afirmar que nosso isolado pertence à espécie *Rhizobium tropici*, pois os valores encontrados ficaram abaixo do limite necessário para tal classificação.

Na Tabela 3, também estão listados os isolados que apresentaram um valor de ANI superior a 78% e o DDH, quando comparados ao *Rhizobium* sp. LBMP-C04, observamos que tais valores (DDH) são ainda menores que o do *Rhizobium tropici* CIAT 899.

Tabela 3. Valores médios de identidade de nucleotídeos (ANI) e hibridização DNA-DNA (DDH) entre a sequência do genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04 e as espécies intimamente relacionadas de *Rhizobium*.

<i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04 vs	ANI (%) OrthoANI	DDH (%)* Fórmula 2
<i>Rhizobium</i> sp. CIAT894	78	22.40% [20.1-24.9%]
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	90,2	40.70% [38.2-43.2%]
<i>Rhizobium</i> sp. N324	78,1	22.50% [20.2-24.9%]
<i>Rhizobium</i> sp. 11515TR	88,9	37.20% [34.8-39.8%]
<i>Rhizobium</i> sp. NXC24	81,8	25.30% [23-27.8%]
<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525	81,4	25.00% [22.7-27.5%]
<i>Rhizobium</i> sp. CCGE532	81,4	32.10% [29.7-34.6%]
<i>Rhizobium</i> sp. CCGE531	81,4	32.10% [29.7-34.6%]

*Probability that DDH > 70% (i.e., same species): 3.2% (via logistic regression)

Probability that DDH > 79% (i.e., same subspecies): 0.8% (via logistic regression)

Na década de 80, o DDH era o melhor procedimento para informações da sequência do genoma inteiro, mas atualmente outros métodos ajudam a descrever novas espécies com rapidez e precisão, como medidas de

similaridade baseadas no genoma (por exemplo, a ANI), DDH digital (dDDH), índice de distância MUM e identidade média de nucleotídeos (ANI) (de Lajudie et al., 2019a). O conteúdo de G + C do genoma, derivados diretamente de sequências de genoma de alta qualidade, também devem substituir as determinações de laboratório, que podem divergir consideravelmente dos valores reais (Kim et al., 2015).

Em 1991, quando havia poucos gêneros de rizóbios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), Graham et al. (1991) fez recomendações para a descrição de novas espécies de rizóbios, na qual utilizavam uma abordagem polifásica, envolvendo características fenotípicas, propriedades bioquímicas, sequências do gene 16S rRNA e valores de DDH. No entanto, essas recomendações foram complementadas com a análise de sequência de múltiplos loci – MLSA, pois é uma técnica útil para minimizar o impacto de uma possível transferência horizontal de genes. Pois, até mesmo o 16S rRNA, pode ser transferido horizontalmente durante a evolução, sendo assim, a filogenia de um único gene pode não refletir a filogenia das espécies (de Lajudie et al., 2019b). O uso de MLSA também é válido para a descrição da diversidade genética intraespecífica, a técnica baseia-se em genes centrais de cópia única, localizados no cromossomo, sendo os genes *recA*, *atpD* e *glnII* os mais prevalentes em rizóbios (Young, 2016).

Nos trabalhos atuais, o ANI de genoma completo e DDH digital são as medidas amplamente utilizadas para identificação de similaridade genômica entre cepas microbianas. Mas uma desvantagem desses procedimentos é que eles baseiam-se em uma combinação mal definida de genes essenciais e acessórios, uma vez que são os genes centrais que fornecem as informações taxonômicas mais claras, já que os genes acessórios podem variar entre os isolados dentro de uma espécie (de Lajudie et al., 2019a). Para Vinuesa et al. (2018), embora ANI seja indicativo de clusters genômicos, é preciso critérios filogenômicos, ecológicos e genéticos de população para delinear espécies biologicamente significativas

de Lajudie et al. (2019), consideram que a atual classificação para uma nova espécie rizobiana inclua os estudos polifásicos, como DDH, filogenia do

gene 16S rRNA e características fenotípicas, MSLA e dados genômicos. Sendo obrigatório depositar a sequência do genoma em um banco de dados público com acesso aberto dentro da Colaboração do Banco de Dados de Sequência de Nucleotídeos Internacional (GenBank, ENA ou DDBJ).

Um estudo do genoma completo de *Rhizobium* sp. cepa 11515TR, um novo isolado da rizosfera de tomate nas Filipinas, foi estudado por Montecillo et al. (2018). A fim de identificar a qual espécie rizobiana o isolado se classificava, foi feita a comparação com os bancos de dados NCBI RefSeq, calculando o ANI e determinando o DDH. O programa utilizado identificou as cepas *R. tropici* CIAT 899 (ANI = 90,2%, dDDH = 3,3%) e *R. lusitanum* P1-7 (ANI = 89,7%, dDDH = 0,8%) como os genomas mais próximos ao da cepa 11515TR. Os valores calculados permitiram a classificação no gênero *Rhizobium*, mas sugerindo uma nova espécie de *Rhizobium*.

Mauve é um software para identificação e alinhamento de DNA genômico conservado na presença de rearranjos e transferência horizontal. O alinhador Mauve tem sido usado para comparações do genoma inteiro bacteriano, pois esta ferramenta identifica e alinha regiões homólogas, mesmo se os genomas sofreram rearranjos, grandes inserções ou deleções e divergência de sequência substancial (Rissman et al., 2009).

Na Figura 5, observamos o alinhamento do genoma de *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Rhizobium* sp. LBMP-C04 usando Mauve, o programa revela blocos colineares localmente que são mostrados com as mesmas cores e indicam segmentos conservados (regiões homólogas) entre os dois genomas, as regiões que não foram alinhadas estão em branco e representam regiões específicas de um genoma, o que pode indicar mudanças evolutivas no DNA.

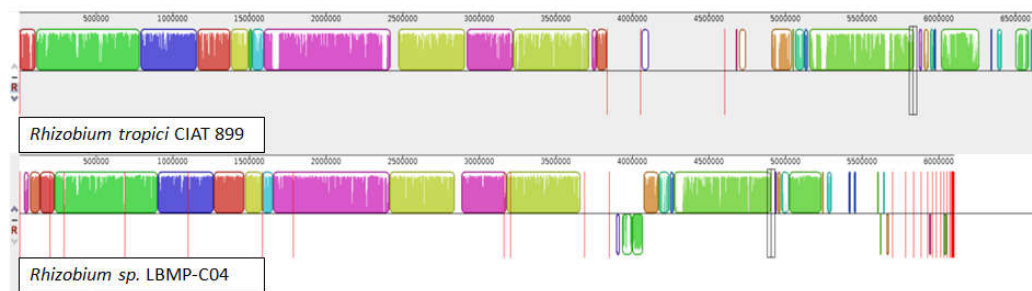


Figura 5. O alinhamento do genoma de *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Rhizobium* sp. LBMP-C04 usando Mauve revela blocos colineares conservados entre os genomas. Contigs são separados por linhas vermelhas verticais e blocos homólogos em cada genoma são mostrados como regiões de cores idênticas.

4.5 Anotação Funcional do *Rhizobium* sp. LBMP-C04

4.5.1 KEGG

As anotações funcionais genômicas são importantes ferramentas para a caracterização dos processos e domínios dos genes. Pois através dessa caracterização podemos compreender as funções gênicas e a distribuição deles em cada genoma. A atribuição da via KEGG permite a compreensão das vias metabólicas e regulatórias de processos biológicos importantes, e neste estudo ela foi usada para identificar as vias biológicas encontradas no genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04.

Em um total de 5.728 unigenes de *Rhizobium* sp. LBMP-C04, aproximadamente 60% foram atribuídos a 264 vias KEGG (Figura 6A), sendo os genes mais abundantes categorizados dentro dos conjuntos: *Mapas globais e gerais* (2038); *Metabolismo de carboidratos* (411); *Metabolismo de aminoácidos* (352); *Transporte de membrana* (248); *Metabolismo de cofatores e vitaminas* (205); *Metabolismo de energia* (195); *Metabolismo de nucleotídeos* (124) e *Metabolismo e biodegradação de xenobióticos* (116).

Conforme os resultados da anotação de vias metabólicas com o KEGG Pathway (Figura 6A) um total de 38 genes foram mapeados na classe de 'Drug Resistance: antimicrobial', que estão relacionados com: Resistência a beta-lactâmicos (20); Resistência à vancomicina (8) e Resistência aos peptídeos

antimicrobianos catiônicos (10). Embora apresente genes de resistência à vancomicina, nosso isolado foi suscetível a esse antibiótico na concentração testada (30 mcg).

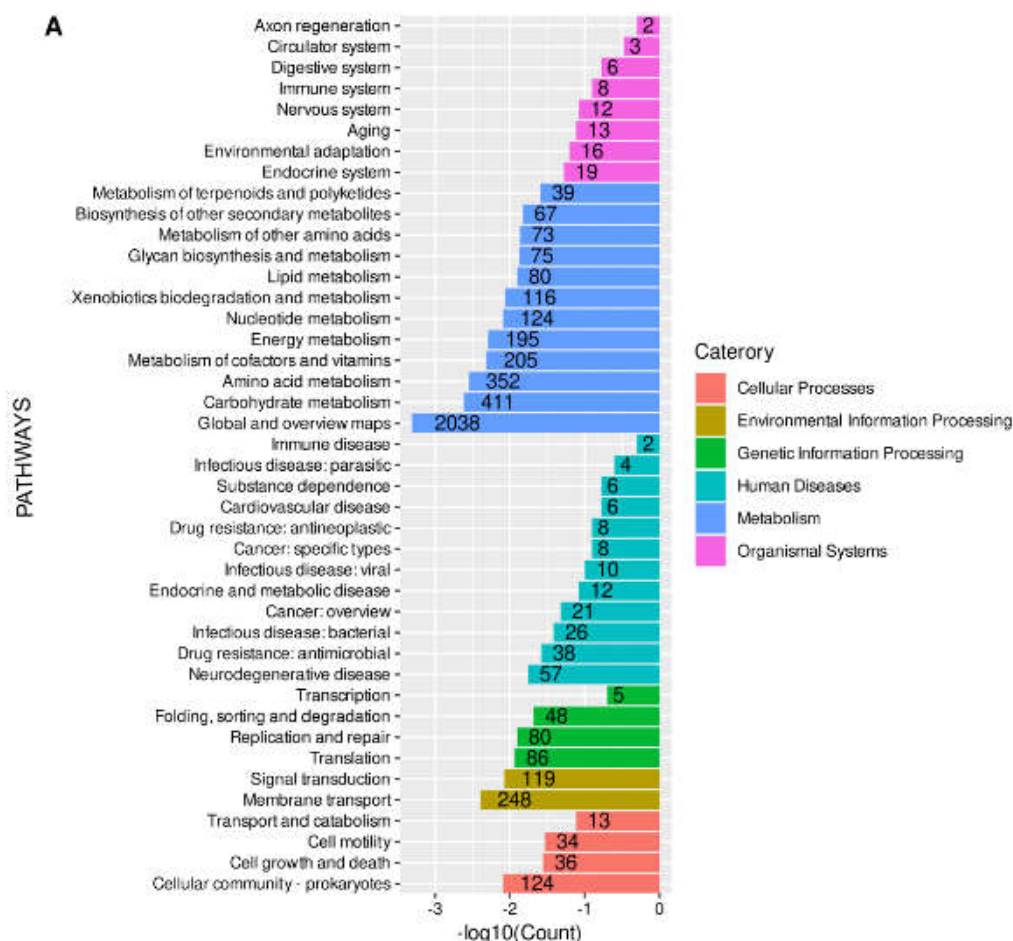


Figura 6 A. Kegg Pathway - Análise funcional do genoma do *Rhizobium* sp. LBMP-C04, mostrando a quantidade de cada gene e as vias que eles participam.

Em contraste com o KEGG Pathway, que é limitado a interações e reações moleculares, o KEGG Brite incorpora muitos tipos diferentes de relacionamentos, incluindo: *Genes e proteínas; Compostos e reações; Drogas; Doenças e Organismos e células*. Dentro da categoria ‘Drogas’ foram recuperados 37 KOs que conferem resistência aos antimicrobianos (Figura 6B).

Destes, podemos citar: o gene *aphA* que confere resistência à kanamicina; *strAB* à estreptomicina; *tetAMO* e *acrAB* conferem resistência à tetraciclina; *mdfA*, *cmr*, *cmlAB*, *floR* e *cpt* resistência ao cloranfenicol; *blaACDFOPX* resistência à beta-lactâmicos; *vanXS* e *acr* resistência à vancomicina; *penP* resistência à penicilina. E os genes, *mexABEFJKLT*, *adel*, *smeD*, *mtrC*, *cmeA*, *adeJ*, *smeE*, *mtrD*, *cmeB*, *bpeE* e *bpeF* estão relacionados a bombas de efluxo a múltiplos antimicrobianos. A resistência mediada por sistemas de bomba de efluxo ao ácido nalidíxico em bactérias Gram-negativas é expressa pelos operons: *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexXY-oprMh*. Sendo que *mexEF-oprN* fornece resistência também à trimetoprima e ao cloranfenicol (Poole, 2005).

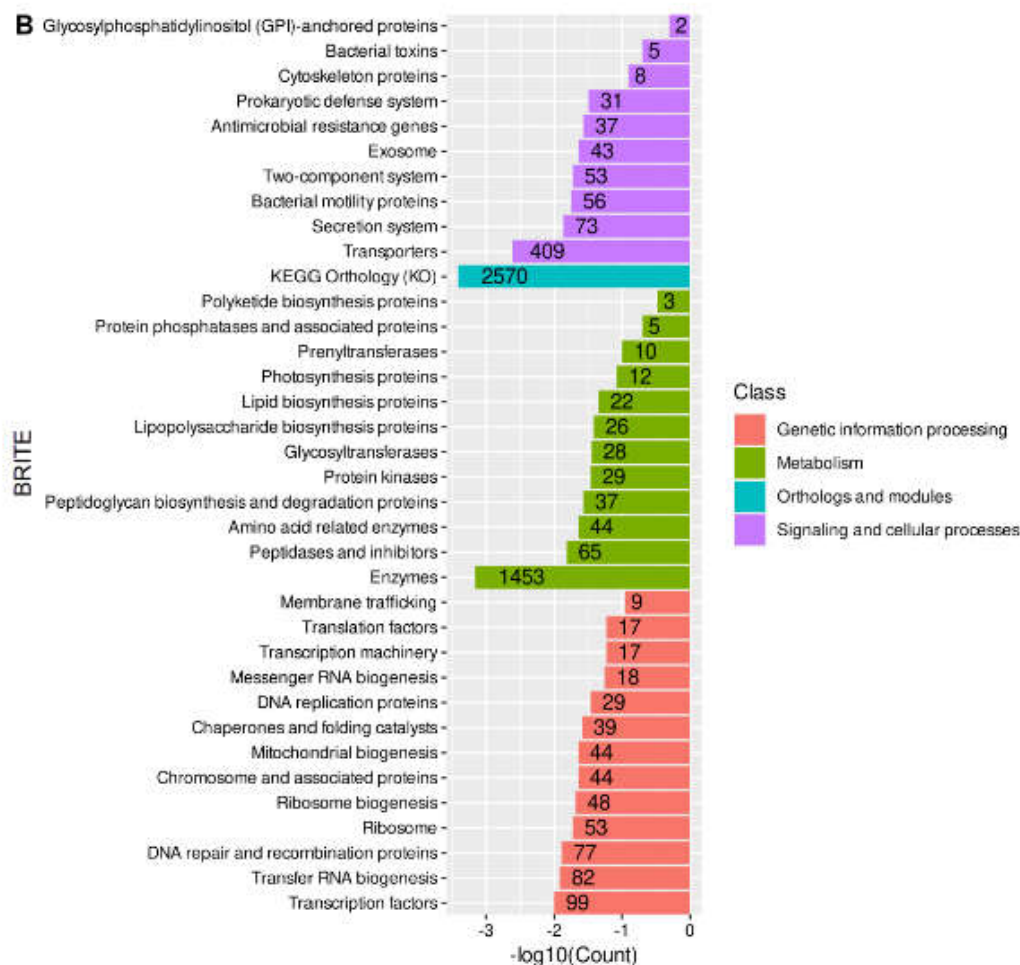


Figura 6 B. Kegg Brite - Análise funcional do genoma do *Rhizobium* sp. LBMP-C04, mostrando a quantidade de cada gene e a qual classe eles pertencem.

Considerando a presença dos genes encontrados no genoma do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, podemos prever que esta resistência pode estar relacionada ao desenvolvimento de bombas de efluxo, uma vez que nos rizóbios, a resistência aos antimicrobianos é devida à expressão dos sistemas de efluxo das proteínas de membrana da subfamília de divisão celular de resistência-nodulação (RND). As bombas de efluxo expõem ativamente os agentes antimicrobianos do citoplasma através das membranas interna e externa da parede celular antes que eles alcancem o local alvo. Os antimicrobianos excluídos não sofrem alteração e nem são degradados, dessa forma, este mecanismo pode levar a resistência a múltiplos antimicrobianos,

pois uma única bomba de efluxo pode expulsar vários agentes antibióticos (Naamala et al., 2016).

A contaminação ambiental desencadeia processos de co-seleção de MPT e aumenta o nível de tolerância a alguns antibióticos devido à co-regulação de genes de resistência nas bactérias (Seiler and Berendonk, 2012). A expressão dos sistemas de resistência aos antibióticos em bactérias pode ser induzida por alguns metais, promovendo assim, uma maior resistência aos antibióticos. O crescimento da bactéria Gram negativa LSCJ7 em meios de cultura contendo Ar (2 mmol dm^{-3}) + tetraciclina ($24 \text{ } \mu\text{M}$), Cu (4 mmol dm^{-3}) + tetraciclina ($24 \text{ } \mu\text{M}$) e Zn ($1,25 \text{ mmol dm}^{-3}$) + tetraciclina ($24 \text{ } \mu\text{M}$) foram significativamente promovidos em comparação com o tratamento de tetraciclina ($24 \text{ } \mu\text{M}$) sozinho (S. Chen et al., 2015a). A transcrição dos genes *acrD* e *mdtABC* que codificam para uma bomba de efluxo a múltiplas drogas em *Salmonella enterica* foi induzida por um sistema regulador *baeSR* em resposta ao cobre e ao zinco, proporcionando aumento da resistência bacteriana a múltiplos antibióticos (Nishino et al., 2007).

As reações químicas entre o MPT e o antibiótico também podem ser prejudicadas pela quelação, diminuindo a biodisponibilidade um do outro. A tetraciclina pode ser reduzida pelos íons Cu^{2+} e Zn^{2+} , devido à formação de complexos entre os cátions metálicos e o antibiótico, dessa forma, a resistência da bactéria à tetraciclina pode ser aumentada pela diminuição da concentração do metal biodisponível (S. Chen et al., 2015b). A expressão combinada entre os antibióticos e os metais pode ser o resultado da seleção por MPT presente no ambiente (Nath et al., 2019). O uso combinado de terapias com antibióticos e MPT é usado nas áreas da saúde e na pecuária, no entanto, esta co-exposição pode induzir a resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas (S. Chen et al., 2015a).

4.5.2 BacMet

O BacMet é um banco de dados de genes bacterianos que conferem resistência a metais ou biocidas antibacterianos. Ele consiste em dois bancos

de dados: um com genes de resistência experimentalmente confirmados e outro com genes de resistência preditos, pois os genes de resistência podem diferir entre as espécies e/ou ocorrer em formas diferentes que (ainda) não foram investigadas experimentalmente (Pal et al., 2014). O genoma do *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi anotado com o Bacmet e um total de 399 genes teve anotação com genes relacionados à resistência a antibióticos e MPT. Destes, 265 genes foram anotados com genes experimentalmente confirmados e 378 genes foram anotados com o banco de dados de genes com funções preditas. Dentre as duas anotações, 244 genes foram anotados tanto para os genes experimentalmente confirmados quanto para os genes preditos. O Diagrama de Venn, ilustrado na Figura 7, demonstra essa intersecção dos genes.

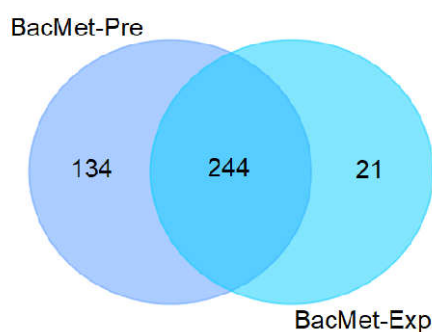


Figura 7. Diagrama de Venn mostrando a distribuição dos genes de resistência a metais e biocidas antibacterianos preditos no genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04 entre os bancos do BacMet (genes preditos e experimentalmente confirmados). O diagrama foi construído usando a ferramenta online Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

As anotações funcionais de *Rhizobium* sp. LBMP-C04, através do BacMet, revelou potencial gênico para resistência a MPT, compostos biocidas e antimicrobianos, identificando vários transportadores e proteínas responsáveis por múltiplas resistências. Os 244 genes experimentalmente confirmados relacionados a estas resistências estão listados na Figura 8. Na figura observamos vários genes que codificam principalmente para resistência aos metais Co^{2+} e Ni^{2+} e aos compostos biocidas e antimicrobianos que estão

relacionados principalmente com a resistência de compostos de amônio quaternários, fenantridinas, azidas, acridinas e ácidos.

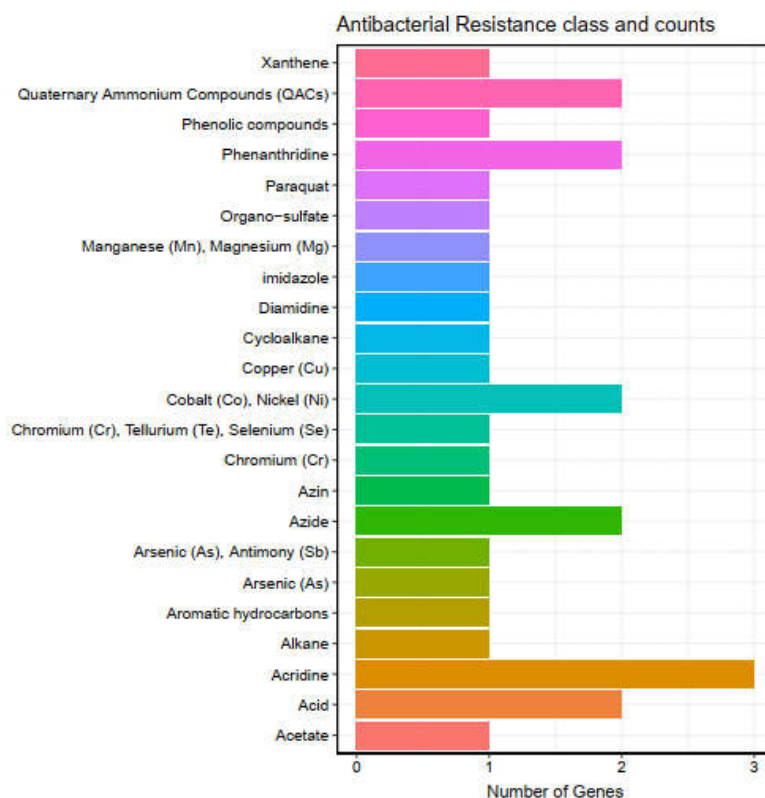


Figura 8. Anotação funcional dos genes do *Rhizobium* sp. LBMP-C04, com o BacMet. Mostrando o número genes experimentalmente confirmados anotados para resistência aos MPT e compostos biocidas e antimicrobianos.

O conhecimento da genética e dos mecanismos moleculares da resistência aos metais é um dos objetivos da biotecnologia ambiental, com o enfoque de promover a biorremediação de solos contaminados. Dessa forma, através do sequenciamento genômico, pudemos fazer a predição dos genes relacionados à resistência aos MPT em *Rhizobium* sp. LBMP-C04, identificamos por meio da anotação com o banco de dados especializado que este isolado apresentou diversos genes relacionados a resistência (399 genes). No entanto na Tabela 4, estão descritos os 10 genes experimentalmente confirmados que apresentaram similaridade maior que 60%. Todos os genes encontram-se localizados no cromossomo, com exceção do gene *mntR* que se encontra em um fragmento putativo de plasmídeo.

Tabela 4. Genes de resistência aos metais potencialmente tóxicos encontrados nas análises genômicas do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04.

Gene	Code for	Family	Compounds	% identity
<i>actP</i>	Enzyme	Cation transport ATPase (P-type) family	Cu	76.7
<i>actS</i>	Regulator	Contains histidine kinase domain	Cd, Zn	70.4
<i>actR</i>	Regulator	Contains 1 response regulatory domain. Phosphotyrosine protein phosphatase superfamily.	Cd, Zn	81.0
<i>arsC</i>	Enzyme	ArsC family	As	65.4
<i>dmeF</i>	Efflux	Cation diffusion facilitator (CDF) transporter family	Co, Ni	75.0
<i>dmeR</i>	Efflux	Cation Diffusion Facilitator (CDF) family	Co, Ni	76.7
<i>ruvB</i>	Enzyme	ruvB Family	Cr	62.7
<i>recG</i>	Enzyme	Contains 1 DEAD/DEAH box helicase domain	Cr, Te, Se	64.0
<i>mntR</i>	Regulator	Contains 1 HTH dtxR-type DNA-binding domain ABC transporter superfamily. Phosphate importer	Mn, Mg	60.6
<i>pstB</i>	Enzyme	family	As	70.6

ActP é uma ATPase do tipo P que pertence à família CPx, é uma enzima transportadora envolvida no efluxo de Cu^{2+} , prevenindo a toxicidade do Cu^{2+} induzida por pH baixo. A jusante do *actP* está o gene *hmrR*, um regulador transcricional putativo, na qual pode regular a transcrição de *actP* positiva e negativamente em resposta a íons Cu^+ . Estudando as espécies *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* e *Sinorhizobium meliloti*, Reeve e colaboradores (2002) concluíram que a proteína ActP seria o mecanismo pelo qual essas bactérias exportam o excesso de Cu^{2+} da célula.

Os componentes *actS* e *actR* são responsáveis pela resistência aos metais Cd^{2+} e Zn^{2+} e atuam na tolerância a ácidos envolvido na detecção e ou resposta de pH em *Rhizobium meliloti* cepa WSM419 (Reeve et al., 2002). O estudo realizado por Tang et al. (2017) demonstrou que o sistema ActS/ActR desempenha um importante papel na adaptação da bactéria *Sinorhizobium meliloti* na tolerância a ácidos e na resistência a oxidantes por meio da regulação da transcrição dos genes *actR*, *katB*, *gshA* e *gshB1*; demonstrando que o sistema ActS/ActR é um regulador redox essencial nesse microrganismo.

Os microrganismos que vivem nos solos se deparam com compostos redox-ativos, como fenazinas H_2O_2 , glutatona oxidada e nitroprussiato de sódio o que pode ocasionar um estresse oxidativo em suas células, dessa forma, é interessante que as espécies bacterianas possuam mecanismos para tolerar

esses compostos. Os fatores de transcrição, ActR e SoxR, por exemplo, promovem a tolerância da bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* às fenazinas. *actR* gera tolerância a este composto ao direcionar a expressão de uma oxidase terminal mais eficiente energeticamente às custas de outra, menos eficiente; dessa forma, gerando espécies reativas de oxigênio (Perry and Newman, 2019).

O gene *dmeF* codifica proteínas DmeF pertencentes à família de proteínas facilitadoras de difusão de cátions, na qual formam sistemas antiportos de metal/ próton para translocar metais Co^{2+} e Ni^{2+} através da membrana bacteriana para fora da célula (Haney et al., 2005). Enquanto *dmeR* codifica para uma proteína reguladora transcricional responsiva ao Co^{2+} e Ni^{2+} que reprime a expressão do sistema de efluxo na ausência desses metais (Rubio-Sanz et al., 2013). Sendo que o operon *dmeRF* é especificamente induzido por Co^{2+} e Ni^{2+} , sendo o Co^{2+} o indutor mais potente (Dokpikul et al., 2016).

Em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, os genes *dmeRF* fazem parte de um sistema de efluxo responsivo aos metais Co^{2+} e Ni^{2+} , atuando como elementos chaves na homeostase desses metais. Os genomas de *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* e *Agrobacterium tumefaciens* também foram analisados e observou-se a presença de clusters de genes *dmeRF* semelhantes entre estas cepas, sugerindo que o sistema *dmeRF* é um mecanismo conservado para tolerância aos metais Co^{2+} e Ni^{2+} em bactérias endossimbióticas leguminosas da família Rhizobiaceae (Rubio-Sanz et al., 2013).

Para investigar as funções de *dmeR* e *dmeF* em *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020, foi construído mutantes do isolado com deleção dos genes *dmeR* e *dmeF*, no qual foram inoculados em sementes da planta *Medicago lupulina*, germinada em solo suplementado com diferentes concentrações de CoCl_2 ou NiCl_2 . Como resultado foi obtido que o número de nódulos da planta hospedeira inoculada com o mutante de deleção *dmeF* foi significativamente menor do que o isolado do tipo selvagem na presença dos metais, indicando que este gene confere resistência às bactérias (Li et al., 2018).

As helicases RuvB e RecG estão envolvidas na replicação, recombinação e reparo de danos ao DNA causados por cromato ou seus derivados (Miranda et al., 2005). O estresse oxidativo resulta em danos ao DNA, por isto, o reparo de danos ao DNA é um mecanismo importante para a manutenção da função do gene (Xia et al., 2021).

O estudo sobre a indução de recombinação homóloga em *Rhizobium etli* para reparar o dano ao DNA, causado pelo Cr^{6+} , investigou mutantes nos genes de recombinação *addA*, *recF*, *recA*, *ruvB*, *recG* e um duplo *ruvB-recG*. Os resultados obtidos demonstraram que *ruvB* e *recG* participam do reparo do dano ao DNA induzido por cromato, e um efeito aditivo com o duplo mutante *ruvB-recG* foi observado. Além do que, a exposição contínua ao Cr (0,05 mmol dm^{-3}) induziu a expressão dos genes *addA*, *recA* e *ruvB* e também mostraram suscetibilidade a outros agentes que danificam o DNA, como telurito e selenito (Santoyo et al., 2015).

O estudo com a bactéria *Alishewanella* sp. WH16-1 foi realizado para verificar o papel de *ruvB* e seus genes reparadores de DNA putativos adjuntos - *ruvCAB*, na resistência aos metais Cr^{6+} , As^{3+} , Sb^{3+} e Cd^{2+} *in vivo*. A análise de RT-PCR mostrou que *ruvR* é co-transcrito com *ruvCAB*, este contribui para a resistência aos metais através do reparo do DNA. *ruvR* está envolvido na resistência ao Cr^{6+} e resistência a outros metais e também regula positivamente a expressão de *ruvCAB* (Wu et al., 2019).

Nosso estudo pode prever os genes relacionados com a resistência aos antimicrobianos e MPT no genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04. A resistência aos metais Cu^{2+} e Ni^{2+} deve ocorrer através de bombas de efluxo, na qual são usadas para eliminar o excesso desses metais no citoplasma bacteriano. Na resistência ao cromo, estão envolvidos genes que atuam na reparação de danos ao DNA bacteriano causado pelos cromatos. Para Cd^{2+} e Zn^{2+} , foram preditos genes que codificam para proteínas reguladoras envolvidas na resistência a este metal.

4.5.3 Genes promotores de crescimento vegetal

Na análise das sequências de aminoácidos preditas para o genoma de *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foram encontrados genes que promovem o crescimento vegetal através dos mecanismos de tolerância ao estresse osmótico, solubilização de fosfato, metabolismo do nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio, formação de biofilme, respostas ao choque térmico e a biossíntese de AIA, de triptofano e de ácidos orgânicos (Tabela 5).

Tabela 5. Genes promotores de crescimento vegetal e a classe a qual pertencem.

Class	Genes
Tolerância ao estresse osmótico	<i>betAB, chdH, gbsA, proA, gltD, treYZ, glgYZ, glnA, gluL, proVWX, treS, mnhABCDEFG, opuABCD, clsAB</i>
Solubilização de fosfato	<i>gcd, phoD, PLD1-2, cpdAB, glpQ, ugpQ, thpR, phnJPN, ymdB</i>
Metabolismo do nitrogênio	<i>ncd2, npd, cynT, can, cynT, nirB, gdh2, nrtABC, nasDEF, cynAB</i>
Regulação da fixação de nitrogênio	<i>flgS, hfq, glnGL, ntrBC, dctBD, ntrXY</i>
Formação de biofilme	<i>maa, cysDNC, efp, flgABCDEFGHIKL, motAB</i>
Resposta ao choque térmico pelo frio	<i>otsA, pnpT, dnaA, gyrA, infABC, mtiF2-3, nusA, rbfA, hupB, tig, recA, cspA, deaD, cshA, rnr, vacB</i>
Resposta ao choque térmico pelo calor	<i>clpP, rpoHN, clpX, lepA, smpB, dnaJk, grpE, clpB, hrcA, ftsH, hflB, hspA9, groEL, degP, htrA hspD1, groES, hspE1, hsp90A, htpG, hslO</i>
Biossíntese de triptofano	<i>TrpBCD</i>
Biossíntese de AIA	<i>amiE, ipdC, nit1, ybeM, nthB</i>
Biossíntese de peptídeos não ribossômicos do grupo sideróforo	<i>AsbF</i>
Biossíntese de ácidos orgânicos	<i>panE, apbA, asd, argC, pdhAB, dapB, tyrC, gltB, proC, dld, lpd, pdhD, tdo2, kynA, dapD, hisG, cfa, glyA, shmT, panB, otc, argFIJ, dlaT, aceF, pdhC, kbl, gcaT, fabBDH, mcaT, mct1, bioF, pspH, impA, suhB, mtnN, mtn, pfs, pepT, glsA, purU, argE, dapE, hyuA, hisEI, ppx, gppA, lysA, gcl, itaE, ilvABDGHIN, pabB, hisB, trpA, acpS, selA, pspH, leuA, ims, ridA, fabF, oxsm, cem1, asdA, fbaB, thrB2, fabZ, gcvH, gcsH, hisFHZ, pabC, ioID, nadA, birA, moaD, cysO, lipAB1-5, liaS, aroQ, qutE, phbC, phaC, iucD, tyrA1, pheA2, glnB, pfpl, kdsD, kpsF, lys5, acpT, cysZ, gabT, pqqL, ridA, tdcF, spuC, ppsC, trpEG, nspC, pop2, xylD, apnO, phgDH, fabG, oar1, paaH, hbd, folC</i>

Estes dados indicam que esse isolado, além de ser resistente aos metais potencialmente tóxicos, pode ter características que contribuam para aumentar a capacidade de fitorremediação das plantas em solos contaminados com esses elementos. Em associação com as plantas, as BPCV auxiliam a

remediação de solos contaminados por MPT, diminuindo a toxicidade do metal pela transformação de espécies de metal em formas imóveis e pela mobilização de metal e acúmulo em tecidos vegetais, facilitando a fitoestabilização e a fitoextração, respectivamente (Ahemad, 2015).

Por isto, testes bioquímicos foram realizados a fim de se verificar quais outras propriedades de promoção de crescimento vegetal estariam presentes no isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04. Os resultados dos testes de solubilização de fosfato, formação de sideróforos, antibiograma e MIC estão apresentados a seguir.

4.6 Solubilização de fosfato de cálcio

A capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foi avaliada e o índice de solubilização do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi de 2,176 cm ($\pm 0,039$), classificando-o como uma bactéria com moderada capacidade de solubilização (Ruiz-Berraquero and Ramos-Cormenzana, 1977) (Figura 9).



Figura 9. Placa de Petri com o meio NBRIP, inoculadas com o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, após 15 dias de cultivo a 30 °C.

O fósforo (P) e o nitrogênio são nutrientes importantes para o crescimento vegetal. Todavia, por sua natureza reativa, o P forma derivados

insolúveis, dificultando sua absorção pelas raízes da planta (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2020; Alaylar et al., 2020). Nesse contexto, as bactérias solubilizadoras de fosfato são importantes ferramentas para o desenvolvimento de tecnologias mais seguras e sustentáveis. Como resultado disso, muitas espécies de bactérias com capacidade de solubilizar o fosfato foram descobertas usando os métodos de triagem convencionais de laboratório. Mas há desvantagens e deficiências no uso de meios de cultivo seletivos para detecção ou quantificação dessas características *in vitro*, uma vez que nem todos os microrganismos podem ser cultiváveis em laboratório.

Para contornar este problema, abordagens genômicas e ferramentas moleculares fornecem novas abordagens mais sensíveis, confiáveis, reprodutíveis e menos demoradas para a pesquisa de bactérias solubilizadoras de fosfato, auxiliando na compreensão de suas condições de trabalho *in situ* (Alaylar et al., 2020). Estudar genes específicos ajuda nas descobertas dos mecanismos de solubilização de fosfato pelos microrganismos, bem como a compreensão das vias biossintéticas e sua regulação. Além desses genes poderem ser caracterizados e clonados (Elmer, 2016). Dessa forma, com as ferramentas moleculares, novos genes relacionados à solubilização de fosfato poderão ser descobertos, permitindo um melhor entendimento da dinâmica das comunidades do solo rizosférico (Gosal and Mehta, 2015).

Pirroloquinolina quinina (*pqq*) e glicose desidrogenase (*gcd*) são os genes representativos para a solubilização do fósforo em microrganismos (Rawat et al., 2021). A predição dos genes relacionados à promoção de crescimento vegetal do genoma do *Rhizobium* sp. LBMP- C04 confirma esta afirmação, uma vez que o gene *gcd* foi predito em nosso estudo. Para investigar os mecanismos genéticos envolvidos na solubilização de fosfato inorgânico por *Pseudomonas fluorescens* F113 foi construída uma biblioteca mutante de transposon. Foi verificado que as mutações nos genes *gcd* e *pqqE* reduziram muito a capacidade de solubilização, enquanto as mutações no gene *pqqB* reduziram apenas moderadamente essa capacidade (Miller et al., 2009).

Rhizobium é um gênero de bactérias solubilizadoras de fosfato, que pode transformar o P insolúvel em formas solúveis que são acessíveis às plantas por meio de uma variedade de reações químicas e interações biológicas. (Iyer and Rajkumar, 2019), estudaram a capacidade de solubilização de fosfato tricálcico pelas cepas rizobianas Td3 e SN1, isoladas das plantas *Cajanus cajan* e *Sesbania rostrata*, respectivamente, e concluíram que o ácido glucônico foi o ácido orgânico chave envolvido na solubilização de P por ambos os isolados que requerem quinoproteína glicose desidrogenase (*gcd*) dependente de pirroloquinolina quinona (*pqq*).

A solubilização do fósforo inorgânico pode ocorrer pela ação de ácidos orgânicos sintetizados pelas bactérias do solo ou pela mineralização do fósforo orgânico, por meio da ação de enzimas: 1. Fosfatases ácidas não específicas (NSAPs); 2. Fitases e 3. Fosfonatases e C – P liases (Glick, 2012; Rawat et al., 2021). As Fosfonatases e as Carbono-Fósforo (C – P) Liasas catalisam a clivagem da ligação C – P dos organofosforados, aumentando a disponibilidade de fósforo para as plantas (Rodríguez et al., 2006). E sua atividade é relatada em muitas bactérias fosfatossolubilizantes como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Rhizobium* e *Burkholderia* (Rawat et al., 2021).

A utilização de rizobactérias solubilizadoras de fosfato é uma opção segura e ecologicamente correta para melhorar a produção agrícola em solos com baixo teor de fósforo, pois, além de fornecer P às plantas, essas bactérias também aumentam o crescimento das plantas, estimulam a fixação biológica de N, e aumentam a disponibilidade de oligoelementos por meio da síntese de moléculas promotoras do crescimento das plantas. Dessa forma, as rizobactérias podem otimizar o rendimento da cultura e reduzir o uso de fertilizantes fosfatados químicos, uma vez que estes são caros e ambientalmente indesejáveis (Ahemad and Kibret, 2014).

A fim de se avaliar o crescimento da planta, desempenho simbiótico e rendimento dos grãos na cultura de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. varieties) em resposta à inoculação de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* cepa HB-429, um experimento foi executado em Galalicha no sul da Etiópia durante as safras de 2012 e 2013 em condições de chuva. A inoculação do rizóbio

aumentou o crescimento da planta, porcentagem de N derivada da fixação de N_2 , quantidade de N-fixado e rendimento de grãos em 19, 17, 54 e 48%, respectivamente, em relação ao controle não inoculado (Samago et al., 2018).

4.7 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos pelo isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi confirmada em meio CAS, pois foi observada a presença de halo de cor laranja ao redor das colônias, como é possível observar na Figura 10.



Figura 10. Placa de Petri com o meio Chromeazurool Agar Assay (CAS), inoculadas com o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, após 72 horas de cultivo a 30 °C.

Com a predição do genoma, encontramos o gene *acbF*, cuja expressão está envolvida na biossíntese de peptídeos dos sideróforos. Para investigar os genes biossintéticos de produção de sideróforos pelo isolado *Rhizobium* BICC, foi construído um mutante induzido por Tn5 (B153). A inserção de Tn5 foi localizada em um fragmento *Sall* e a análise desta sequência de DNA revelou que esta região era homóloga ao gene *agbB* de *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. A partir do produto de PCR esses genes foram designados

como *sid*, constituindo um operon, localizados na ordem de *sidC*, *sidE*, *sidB* e *sidA* (Datta and Chakrabartty, 2014)

O ferro é essencial às plantas e pode ser encontrado nos solos tanto no estado divalente (ferroso) ou trivalente (férico), sendo que o pH, o potencial redox e outros componentes minerais dos solos é que influenciam o estado de oxidação do ferro. Sob condições de escassez de ferro, algumas espécies de rizobactérias podem produzir sideróforos – moléculas que são capazes de sequestrar o ferro férrico dos solos e reduzi-los a ferro ferroso, tornando esse micronutriente acessível às plantas (Gopalakrishnan et al., 2015).

Apesar de sua afinidade preferencial por ferro ferroso, os sideróforos também atuam como agentes quelantes de outros metais, como cromo, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ga^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ar^{2+} , Pb^{2+} e radionuclídeos, incluindo Pu^{4+} , com afinidades variáveis (Ahemad, 2015). Os sideróforos podem se ligar a estes metais, formar complexos estáveis e, assim, aumentar sua biodisponibilidade na rizosfera por meio de uma reação de complexação (Ullah et al., 2015). Dessa forma, os sideróforos bacterianos corroboram para aliviar o estresse imposto às plantas pelos altos níveis de metais no solo (Ahemad and Kibret, 2014). Além disso, os sideróforos também fornecem às plantas nutrientes, que por sua vez neutraliza os efeitos nocivos do crescimento lento induzido pelos metais nas plantas (Dimkpa et al., 2009).

Dimkpa et al (2009) avaliaram o crescimento de feijão-caupi em um solo contendo níveis elevados dos metais, Al, Cu, Fe, Mn, Ni e U, usando sobrenadante livre de células derivado de *Streptomyces* sp. contendo sideróforos e auxinas. Foi relatado que a adição de sideróforos melhorou o crescimento das plantas em comparação com as plantas controle, houve um aumento no conteúdo de clorofila e diminuição da formação de radicais livres; e também, maiores quantidades de metais foram obtidas em plantas tratadas com sideróforos.

4.8 Produção de compostos indólicos - Quantificação por colorimetria

A reta padrão da absorbância colorimétrica da quantidade de AIA produzido pelo isolado bacteriano *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi composta por diferentes concentrações de AIA comercial e gerou a equação $y=0,027x$, com $R^2 = 0,988$, em que “y” representa a quantidade de auxina secretada na cultura líquida. O ensaio colorimétrico com o emprego da solução de Salkowski permite identificar e quantificar um isolado capaz de produzir auxinas pela manifestação de cor vermelha. A produção de compostos indólicos obtida pelo isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi de $6,10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A produção de compostos indólicos encontrada para o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 é pequena em relação a outros estudos com rizóbios citados na literatura (Ghosh et al., 2013; Lebrazi et al., 2020; Mandal et al., 2009; Rupal K et al., 2020). No entanto, é importante ressaltar que há um potencial de produção deste fitohormônio pelo nosso isolado que poderia ser melhorada otimizando as condições de cultivo. (Lebrazi et al., 2020) avaliou a produção de AIA por duas cepas de rizóbios, *Rhizobium* sp. I22, e *Rhizobium* sp. I69, e a otimização das condições de cultivo. Os autores encontraram os valores de $116 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de $135 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados I22 e I69, respectivamente. Posteriormente, a metodologia foi usada para determinar as condições operacionais ideais, levando à otimização da produção de IAA. Assim, com os parâmetros ideais de condições de cultivo: $36 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 6.5, 24 horas de incubação, 1 g L^{-1} de triptofano e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl, a produção de AIA alcançou o valor máximo de $166 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo isolado *Rhizobium* sp. 169.

A produção de AIA é essencial para que as rizobactérias regulem várias funções morfológicas e fisiológicas nas plantas. Esta principalmente relacionada com a estimulação do crescimento e proliferação de raízes laterais em plantas, dessa forma, a área de superfície é aumentada e as plantas absorvem mais água e minerais do solo (Ahemad, 2015). O AIA produzido pelas bactérias proporciona uma maior adaptação de plantas hospedeiras em solos contaminados com MPT por meio de mudanças fisiológicas no metabolismo das células vegetais sob estresse por metal, para que as plantas em crescimento possam suportar altas concentrações de metais (Glick, 2010).

Em rizóbios, a produção de AIA também é um fator importante na simbiose da bactéria com a planta durante os estágios iniciais da infecção. (Imada et al., 2017) estudaram a síntese de IAA e os efeitos do N mineral na produção deste fitohormônio por *Rhizobium tropici* CIAT 899 através de cromatografia líquida de ultraperformance-espectrometria de massa (UPLC-MS). Foi constatado que o indol-3-pirúvico (IPyA) é o principal intermediário de biossíntese de IAA e os genes *y4wE*, *lao* e *ior* também estão envolvidos. Entretanto, em *Azospirillum*, os genes *ipdC*, *hisC1* e *hisC2* estão envolvidos na via do ácido indol-3-pirúvico (IPyA) da biossíntese de IAA, sendo o gene indol-3-piruvato descarboxilase (*ipdC*) o codificador de uma enzima chave da via. (Jijón-Moreno et al., 2015; Malhotra and Srivastava, 2008).

Bactérias promotoras de crescimento vegetal dos gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Escherichia*, isoladas da rizosfera de plantas que cresciam em solos com resíduos de mineração, foram avaliadas quanto a atividade da enzima ACC desaminase e a síntese de IAA na presença de Cu, As, Pb, Ni, Cd e Mn. Os resultados mostraram que tanto a atividade da enzima ACC desaminase quanto a síntese de IAA foram maiores com os tratamentos Pb, As e Cu do que com os tratamentos controle para *Escherichia* N16, *Enterobacter* K131, *Enterobacter* N9 e *Serratia* K120. Apresentando assim, potencial de uso em sistemas fitorremediadores (Carlos et al., 2016).

O estudo com a bactéria promotora de crescimento de plantas *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286, foi utilizada para determinar qual característica (resistência ao zinco ou capacidade de produção de IAA) desempenhou um papel mais importante no auxílio ao crescimento da planta sob estresse de zinco. Para isso, oito mutantes sensíveis ao zinco e um mutante sensível ao zinco com produção reduzida de AIA foram obtidos por mutagênese transposon; a análise revelou que a interrupção de uma proteína de transporte reduziu a síntese de AIA e mostrou resistência reduzida ao zinco e ao cádmio. Os experimentos em casa de vegetação com *Robinia pseudoacacia* inoculada com *A. tumefaciens* CCNWGS0286 apresentou um aumento significativo na produção de biomassa em relação àquela sem inoculação, em um ambiente contaminado com zinco, demonstrando que os

fitohormônios foram o principal fator no aumento do crescimento das plantas em solo contaminado (Hao et al., 2012)

4.9 Teste de nodulação e eficiência simbiótica do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em *Leucaena leucocephala*

Os resultados dos testes de nodulação e eficiência simbiótica do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, da estirpe SEMIA 6070 e dos controles com alto (52,5 mg L⁻¹) e baixo (5,25 mg L⁻¹) N mineral em *Leucaena leucocephala* estão descritos na Tabela 6. Com relação à eficiência simbiótica, não foram observados nódulos no sistema radicular das plantas controle não inoculadas. Isso confirma a ausência de contaminação e significa que o experimento foi realizado em condições axênicas.

Tabela 6. Teste de nodulação e eficiência simbiótica do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em *Leucaena leucocephala*.

Variáveis	<i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04	Controle positivo	Controle negativo	Controle negativo	CV(%)
		SEMIA 6070	Alto N	Baixo N	
Aérea (cm)	10,80 a	10,83 a	10,06 a	10,50 a	9,36
Raíz (cm)	12,40 a	12,63 a	10,90 a	11,80 a	6,44
MS (g) aérea	0,67 a	0,57 a	0,54 a	0,48 a	4,66
MS (g) raiz	0,45 a	0,59 a	0,50 a	0,47 a	9,09

Os valores seguidos pela mesma letra na linha comparando as cepas não diferem pelo teste de Scott-Knott, p <0,05.

O isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, bem como o inoculante controle SEMIA 6070, nodularam o sistema radicular; com número de contagem média de nódulos iguais a 5.66 e 3.66 (por planta) respectivamente; sendo que estes valores não diferiram estatisticamente. Em todas as variáveis estudadas, de acordo com o teste F a 5% de significância, as médias não puderam ser consideradas diferentes, ou seja, também não houve diferença estatística entre os tratamentos estudados.

A *L. leucocephala* é uma leguminosa lenhosa que forma simbiose eficiente com cepas específicas de *Rhizobium*, tornando esse elemento disponível em solos tropicais. A simbiose entre BPCV resistentes a MPT e plantas hiperacumuladoras de metal pode desempenhar um importante papel na fitorremediação de solos contaminados por tais elementos químicos. A inoculação com cepas adequadas é necessária para estabelecer simbioses eficazes em solos, uma vez que a simbiose leguminosa-rizóbio mais apropriada for identificada, elas podem ser exploradas para aumentar diretamente o sucesso da fitorremediação por meio da fixação biológica de nitrogênio e outras propriedades de promoção do crescimento da planta, melhorando a saúde das plantas e a fertilidade dos solos (Rangel et al., 2017).

Bactérias que nodulam as raízes de *L. leucocephala* foram isoladas na Península de Yucatan, no México. Os isolados 70 e 40A, foram identificados pelos produtos do gene 16S rRNA nos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, respectivamente. Estes isolados produziram quantidades significativas de IAA e de sideróforos, e foram relatados como eficazes na nodulação desta leguminosa, podendo ser usados como inoculantes para aumentar a fixação de N_2 nesta planta, aumentando a simbiose e a disponibilidade de N em solos deficientes em nutrientes (Tzec-Gamboa et al. 2020).

Rizóbios de solos de mineração contaminados com os metais Zn^{2+} e Cd^{2+} foram estudados quanto às suas características de promoção de crescimento de plantas, como produção de ácidos orgânicos, de AIA e sideróforos, atividade de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase e solubilização de fosfato inorgânico. Após 65 dias de plantio, os resultados demonstraram que os rizóbios nativos apresentam grande potencial para fins de fitorremediação, pois apresentaram, além da fixação biológica de N_2 , tolerância a Zn^{2+} e Cd^{2+} , simbiose eficiente em solos contaminados e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes na parte aérea (Rangel et al., 2017).

4.10 Sensibilidade aos antibióticos e padrão de resistência

Os ambientes contaminados por MPT favorecem uma co-seleção para resistência aos antibióticos. Os mecanismos de co-seleção envolvem: a co-resistência, na qual ocorre quando os genes que conferem resistências estão localizados no mesmo elemento genético, como transposons, integrons e principalmente nos plasmídeos; a resistência cruzada, quando a aquisição da resistência a um agente antimicrobiano é acompanhado pela resistência a outro agente; a co-regulação, onde eventos transcricionais estão associados para desencadear uma resposta a qualquer estresse causado pela exposição e metais ou antibióticos; e a indução de biofilmes e exopolissacarídeos (Baker-Austin et al., 2006).

Neste trabalho, observou-se que o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 foi resistente aos antibióticos ampicilina, amoxicilina, rifampicina, ácido nalidíxico e trimetropina e sensível aos outros 8 antibióticos estudados, com a presença de halos de inibição entre 12 e 33 mm (Tabela 7).

Tabela 7. Sensibilidade a antibióticos e padrão de resistência em *Rhizobium* sp. LBMP-C04 (expressada em mm).

Antibiótico	Halo de inibição	Classificação	Modo de ação
Ampicilina	NI	Resistente	Interferência com a síntese da parede celular
Amoxicilina	NI	Resistente	Interferência com a síntese da parede celular
Vancomicina	12	Sensível	Interferência com a síntese da parede celular
Polymixin B	19	Sensível	Interferência com a síntese da parede celular
Kanamicina	19,5	Sensível	Inibição da síntese de proteínas
Estreptomicina	18	Sensível	Inibição da síntese de proteínas
Gentamicina	19,5	Sensível	Inibição da síntese de proteínas
Tetraciclina	33,5	Sensível	Inibição da síntese de proteínas
Cloramfenicol	18,5	Sensível	Inibição da síntese de proteínas
Azitromicina	34	Sensível	Inibição da síntese de proteínas
Rifampicina	NI	Resistente	Inibição da síntese de ácido nucléico
Ácido Nalidíxico	NI	Resistente	Inibição da síntese de ácido nucléico
Trimetropina	NI	Resistente	Inibição da via metabólica

NI = sem zona de inibição; diâmetro do disco = 6 mm

Desta forma, pudemos observar que o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 apresentou resistência a antibióticos relacionados à síntese da parede celular, inibição da síntese de ácido nucléico e de ácido fólico. O comportamento do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 frente à ampicilina e ao ácido nalidíxico se assemelha ao que foi observado na cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899, por Dall'Agnol et al. (2013); isolado este, que apresentou grande similaridade genética com o *Rhizobium* sp. LBMP-C04 nas análises moleculares realizadas neste estudo.

Os antibióticos possuem diferentes modos de ação sobre os microrganismos. Ampicilina, amoxicilina e vancomicina atuam interferindo na síntese da parede celular, através da inibição irreversível da enzima trans-peptidase, afetando a produção da camada de peptidoglicano, formando assim, uma parede celular enfraquecida; o que resulta na morte da bactéria devido à pressão osmótica (Mc Dermott et al., 2003). A polimixina B também interfere na síntese da parede celular, o antibiótico interage com a porção do lipídio A da membrana externa do lipopolissacarídeo, causando a inibição da divisão celular ou a permeabilização da membrana citoplasmática e, conseqüente morte celular (Trimble et al., 2016). Além disso, os agentes antimicrobianos podem também inibir a síntese de proteínas. Tetraciclina e kanamicina, se ligam ao rRNA 16S e 23S, inibindo a tradução da proteína (Aleksun and Levy, 2007).

A estreptomicina atua interferindo na subunidade 30S do RNA ribossomal da bactéria, afetando a tradução (Wiener, 1996). O cloramphenicol se liga com a enzima peptidil transferase da subunidade ribossômica 50S dos ribossomos 70S e evita o alongamento da cadeia do peptídeo (Schwarz et al., 2004). A gentamicina liga-se à região de decodificação do sítio A do RNA 16S levando à interrupção da síntese de proteínas, causando uma eventual morte celular (Udumula et al., 2013). Azitromicina inibe o crescimento bacteriano, pois se liga ao 23S rRNA na subunidade 50S do ribossomo, evitando assim, a transferência do tRNA do sítio A para o P do ribossomo, impedindo o crescimento do polipeptídeo (Imperi et al., 2014). E os antibióticos ácido nalidíxico e rifampicina, atuam na inibição da síntese de ácido nucléico pelo bloqueio na replicação do DNA e pela inibição da síntese de RNA polimerase,

respectivamente. Também podem causar inibição da via metabólica de síntese de ácido fólico, como a trimetropina (Naamala et al., 2016).

Os microrganismos possuem duas formas de resistências aos antibióticos: a intrínseca e a adquirida. A resistência intrínseca ocorre pela presença natural do gene *ampC* b-lactamase em uma espécie bacteriana, pela alteração do sítio-alvo dos antimicrobianos, pela formação de biofilmes e pela prevenção do acúmulo de antimicrobianos no interior das células bacterianas; esta pode ser realizada por dois mecanismos: alteração da permeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo. Já a resistência adquirida acontece quando uma cepa antes suscetível se torna resistente, ela pode acontecer por mutação em genes específicos ou pela transferência de genes de resistência vindos de plasmídeos, bacteriófagos, transposons ou integrons (Auda et al., 2020; Brooks and Brooks, 2014; Naamala et al., 2016; Pal et al., 2015).

As bombas de efluxo são importantes na resistência intrínseca e adquirida a múltiplos antimicrobianos. Os genes que as codificam estão presentes nos cromossomos das bactérias e são altamente conservados em todos os membros da mesma espécie (Martinez et al., 2009). Nas bactérias Gram-negativas, as bombas de efluxo são da família Divisão de Resistência de Nodulação (RND), são compostas por proteína da membrana externa, proteína da membrana interna e proteína de fusão da membrana e tem função importante na resistência a substâncias tóxicas, como biocidas, MPT e antimicrobianos (Auda et al., 2020).

Os sistemas de efluxo *mex* e *acrAB*, preditos no genoma do *Rhizobium* sp. LBMP-C04, medeiam os fenótipos de resistência a múltiplas drogas intrínsecas e adquiridas, assim como medeiam funções de outra natureza, como a mediação da patogenicidade e a resposta às condições de estresse (Li et al., 2015). Quando o operon do sistema de efluxo *acrAB* é super expresso em membros da família *Enterobacteriaceae*, a resistência adquirida é desenvolvida, conferindo resistência a β -lactâmicos, novobiocina, eritromicina (macrolídeos), cloranfenicol, tetraciclina, fluoroquinolonas e rifampicina. Já o operon *mex* confere resistência a: *mexAB*- aminoglicosídeos e β -lactâmicos; *mexCD*- cloranfenicol e cefalosporinas; *mexEFVW*- cloranfenicol e

fluoroquinolonas; *mexXY* aminoglicosídeos e fluoroquinolonas; *mexJK* aminoglicosídeos e ciprofloxacina (Auda et al., 2020).

A resistência aos MPT e a antibióticos pode ser selecionada concomitantemente no ambiente contaminado por metais. Este fato pode ocorrer pela co-seleção, quando dois ou mais genes de resistência estão geneticamente ligados (Baker-Austin et al., 2006) ou pela seleção cruzada, na qual um único elemento genético fornece tolerância a mais de um agente antimicrobiano (Seiler and Berendonk, 2012). Dessa forma, os microrganismos do solo podem sofrer pressões de seleção e alterações da diversidade de comunidades microbianas devido ao excesso de metais nestas áreas (Chen et al., 2019).

Um estudo sobre a relação entre genes de resistência aos metais potencialmente tóxicos (MRGs) e genes de resistência a antibióticos (ARGs) em uma área de barragem contaminada por rejeitos de cobre em longo prazo no norte da China, observou que ambos MRGs e ARGs existem no solo poluído com vários metais; para ARGs, as abundâncias dos genes *tetW*, *tetB* e *tetP* (genes de resistência à tetraciclina) estão correlacionadas com a concentração de Zn, indicando que esse elemento pode induzir a resistência a antibióticos que inibem a síntese de proteínas. O gene de resistência à Sulfonamida (*sulII*) e MRGs co-ocorrem e o *copB* ocorre com ARGs, evidenciando que MRGs e ARGs podem ser co-selecionados no solo contaminado por metais (Chen et al. 2019).

4.11 Concentração Mínima Inibitória dos metais potencialmente tóxicos

A contaminação dos solos por MPT advém da constante eliminação de resíduos contaminados pelas indústrias, da combustão de carvão e combustíveis, fertilizantes, pesticidas, lodo de esgoto, fundição de minérios e derramamento de petróleo (Nath et al., 2019). Ao longo da evolução, muitas bactérias desenvolveram vários mecanismos que conferem resistência aos MPT e através dos processos de biorremediação, sejam eles por adsorção, biossorção, mecanismos fisio-bioquímicos ou bioestimulação, esses

microrganismos podem desintoxicar solos contaminados por metais (Verma and Kuila, 2019). O presente estudo demonstra que o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 pode resistir a diferentes concentrações de MPT (Tabela 8), foram observadas MIC maiores para Ni^{2+} (401 mmol dm^{-3}) e Zn^{2+} (48 mmol dm^{-3}), intermediárias para Cu^{2+} (13 mmol dm^{-3}), Cr^{3+} (12 mmol dm^{-3}) e Cr^{6+} (11 mmol dm^{-3}) e baixa para Cd^{2+} (5 mmol dm^{-3}).

Tabela 8. Concentração mínima inibitória dos metais potencialmente tóxicos para o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 em meio CN líquido após 24 horas de cultivo.

Concentrations (mmol dm^{-3})	<i>Rhizobium</i> sp. LBMP- C04					
	Cd^{2+}	Cu^{2+}	Cr^{6+}	Cr^{3+}	Zn^{2+}	Ni^{2+}
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	++	+++	+++	+++	+++	+++
4	+	+++	+++	+++	+++	+++
5	-	+++	+++	+++	+++	+++
6	-	+++	++	+++	+++	+++
7	-	+++	++	+++	+++	+++
8	-	+++	++	++	+++	+++
9	-	+++	++	+	+++	+++
10	-	+++	++	+	+++	+++
11	-	+++	+	+	+++	+++
12	-	++	+	-	+++	+++
13	-	+	-	-	+++	+++
14	-	-	-	-	+++	+++
45	-	-	-	-	++	+++
46	-	-	-	-	+	+++
47	-	-	-	-	+	+++
48	-	-	-	-	-	+++
300	-	-	-	-	-	+++
390	-	-	-	-	-	++
400	-	-	-	-	-	+
401	-	-	-	-	-	-
405	-	-	-	-	-	-
MIC (mmol dm^{-3})	5	14	13	12	48	401

+++ alto crescimento; ++ Moderado; + baixo crescimento; - sem crescimento

Estudos observados na literatura com diversos isolados de rizóbio mostram que existe uma grande variedade nas concentrações de metais a que essas bactérias são resistentes. Recentemente, Abdollahi, Golchin, e Shahryari 2020, coletaram amostras de locais contaminados por MPT e encontraram uma cepa de *Rhizobium pusense*-59 com MIC de $0,0009 \text{ mmol dm}^{-3}$ de Cd^{2+} . Do mesmo modo, Ajayi et al. (2020) estudaram uma cepa *Bradhyrhizobium japonicum*-USDA136 da coleção de cultura do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) cuja resistência ao Zn^{2+} e ao Cu^{2+} foram de $0,0001 \text{ mmol dm}^{-3}$ e de $0,0013 \text{ mmol dm}^{-3}$ ao Cd^{2+} .

Paul et al. (2018), analisando a resistência de microrganismos isolados de uma área poluída por MPT, verificou que os isolados *Rhizobium* sp. AfSR1 e SfSR4 foram resistentes às concentrações de $1,71 \text{ mmol dm}^{-3}$ e $0,86 \text{ mmol dm}^{-3}$ de Ni^{2+} , respectivamente e a $0,89 \text{ mmol dm}^{-3}$ de Cd^{2+} . Abd-Alla et al. (2012) identificaram como *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, um isolado cultivado em campos contaminados com lodo no Alto Egito e encontrou resistências de $0,5111 \text{ mmol dm}^{-3}$ para Ni^{2+} ; $1,0706 \text{ mmol dm}^{-3}$ para Zn^{2+} e $0,0889 \text{ mmol dm}^{-3}$ para Cd^{2+} . Desta forma, a comparação dos resultados observados na literatura com os observados para isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 sugere que esse microrganismo é resistente a concentrações muito maiores que aquelas descritas em estudos *in vitro* de outros organismos deste gênero.

A presença dos MPT nos solos afeta diretamente as comunidades de microrganismos que ali habitam, interferindo nas funções metabólicas e celulares, como a fosforilação oxidativa e o equilíbrio osmótico, na especificidade e inativação de enzimas, danificando as membranas celulares e desnaturando as proteínas e o material genético das bactérias (Imran et al., 2019; Nath et al., 2019). Entretanto, os microrganismos desenvolveram mecanismos para evitar os efeitos adversos dos metais em sua fisiologia.

Dentre os mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos, os mais bem compreendidos incluem: o sequestro intra e extracelular, a captação e acumulação de metais no interior de suas células, a precipitação extracelular e a produção de enzimas que degradam os

contaminantes alvos. Além disso, pode ocorrer a oxidação ou redução enzimática para uma forma menos tóxica, a ativação de bombas de efluxo, alterações da morfologia celular, produção de pigmentos, formação de biofilme e de EPSs e a mineralização de alguns poluentes orgânicos em produtos finais (CO_2 e H_2O) (Imran et al., 2019; Nath et al., 2019; Verma and Kuila, 2019). Todavia, os mecanismos fisiológicos de resistência aos íons metálicos e a eficiência de remoção pode variar amplamente de acordo com a espécie microbiana e sua composição de genes (Ferreira et al., 2012).

4.12 Efeitos dos metais potencialmente tóxicos na curva de crescimento

As concentrações mínimas inibitórias (MICs) para o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 frente aos MPT foram superiores às concentrações selecionadas para a curva de crescimento, isso porque foram selecionadas concentrações nas quais o isolado apresentava crescimento semelhante ao controle quando observado em meio sólido nas placas de Petri. Desta forma, as taxas de crescimento (UFC) do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 quando exposto aos meios de cultivo acrescido dos MPT nas concentrações (Cd^{2+} ($0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$), Cu^{2+} ($1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$), Cr^{3+} ($6,0 \text{ mmol dm}^{-3}$), Cr^{6+} ($1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$), Zn^{2+} ($0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) e Ni^{2+} ($2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) e nos intervalos de tempo de 0 a 120 horas, pode ser observado na Figura 11.

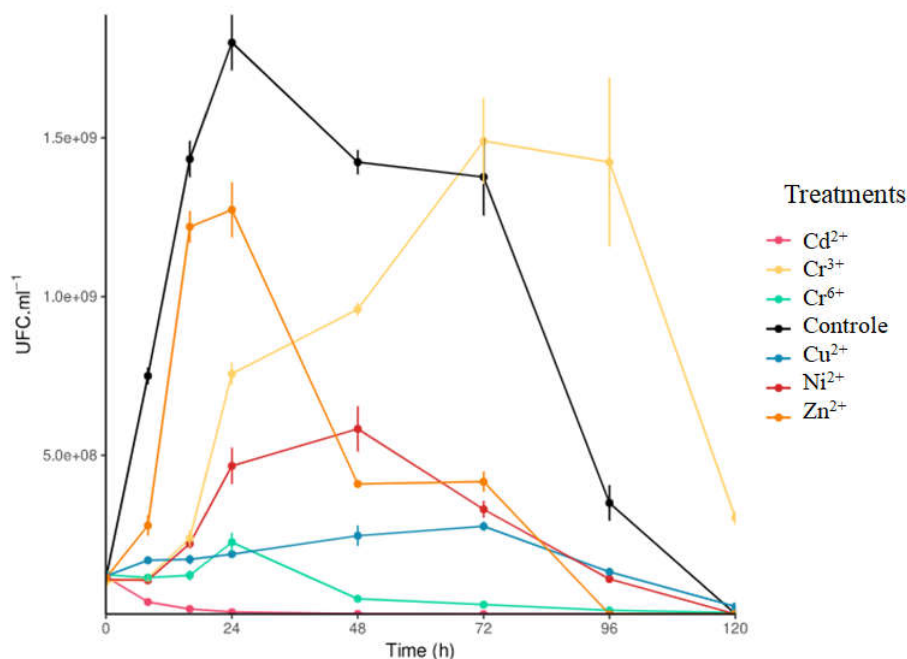


Figura 11. Curva de crescimento do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 na presença dos metais potencialmente tóxicos: (mmol dm⁻³) Cd²⁺ (0,5), Cu²⁺ (1,0), Cr³⁺ (6,0), Cr⁶⁺ (1,0), Zn²⁺ (0,5), Ni²⁺ (2,0).

A observação das variadas respostas do isolado frente aos MPT eram esperadas, isso ocorre porque cada metal tem seu modo de ação contra a célula e nível de toxicidade. O tempo de duração da fase de latência indica tolerância ao metal e adaptações da bactéria no meio com MPT. De fato, quando uma bactéria é inoculada em uma nova cultura contendo metais, suas células são danificadas devido à toxicidade do metal. Desta forma, a bactéria direciona sua energia para reparar os danos celulares e a adaptar sua via enzimática a esta nova condição (Abbas et al., 2014).

As durações da fase lag do *Rhizobium* sp. LBMP-C04 nos meios acrescidos de Cu²⁺, Ni²⁺, Cr³⁺ e Cr⁶⁺ foram maiores quando comparadas ao controle, esta fase lag de maior duração pode ser resultado do desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência eficazes em resposta às concentrações de MPT presentes no meio de cultura, esses mecanismos podem ser bioquímicos, fisiológicos ou genéticos e interferem na especiação e na mobilidade do metal (Benghait, 2019).

Na literatura é relatado que o principal mecanismo de resistência para os metais Cu^{2+} e Ni^{2+} incluem as bombas de efluxo que são ativas na presença de concentrações excessivas de metal intracelular. No genoma do isolado estudado, foram preditos os genes *actP*, *dmeF* e *dmeR*, dessa forma, eles podem ser responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no transporte desses metais, os sistemas de efluxo medeiam o sequestro de metal para fora do citoplasma evitando a toxicidade pela célula (Giner-Lamia et al., 2015; Rubio-Sanz et al., 2018; Sharma and Shukla, 2021a). Entretanto, as concentrações testadas para estes metais podem ter sido tóxicas para nosso isolado, por isso a baixa taxa de crescimento quando comparada ao controle.

O padrão de crescimento do *Rhizobium* sp. LBMP-C04 frente aos meios com Cr^{3+} e Cr^{6+} demonstram que o isolado teve um maior período para o reconhecimento do meio, indicando tolerância e adaptação ao metal pelo isolado. Esse comportamento pode ser realizado pelas bactérias através da ativação de mecanismos eficazes de sobrevivência em resposta à concentração do metal estudado. Dentre os mecanismos possíveis, é provável que as helicases RuvB e RecG estejam sendo expressas, estas proteínas estão envolvidas no reparo de danos ao DNA causado pelo estresse de cromo nas células bacterianas (Ramírez-Díaz et al., 2008; Viti et al., 2014).

O tratamento com Cr^{6+} apresentou uma taxa de crescimento bem menor quando comparada ao tratamento com Cr^{3+} , o que pode ser explicada pela toxicidade deste metal na concentração estudada. Uma vez que Cr^{6+} causa estresse oxidativo intracelular e danos ao DNA, nosso isolado não conseguiu absorver e acumular este metal ao mesmo tempo em que direcionava seu gasto energético para a manutenção de funções celulares que o permitiam resistir à toxicidade do metal.

As diferenças nas taxas de crescimento entre os metais dependem dos mecanismos adotados pelo isolado no combate à restrição extracelular dos MPT e sua eficácia (Oladipo et al., 2018). No geral, a taxa de crescimento bacteriano do *Rhizobium* sp. LBMP-C04 na presença de MPT (Figura 11) foi consistentemente menor do que a do controle. Mesmo com a presença dos componentes *actS* e *actR*, reguladores redox que atuam na tolerância ao Cd^{2+}

e Zn^{2+} , o isolado demonstrou sensibilidade vívida sem observação de crescimento para concentração de $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ de Cd^{2+} , indicando que essa concentração é tóxica para o isolado estudado ao longo das 120 horas de incubação. A inibição da taxa de crescimento pelo Cd^{2+} pode ser explicada pelas propriedades desse metal que tem a capacidade de alterar a expressão da proteína nas células bacterianas (Gomez-Fuentes et al., 2020).

Quando inoculamos o *Rhizobium* sp. LBMP-C04 no meio acrescido com Zn^{2+} temos uma fase lag de curta duração e um rápido crescimento exponencial, o que indica que este metal, na concentração estudada, não é tóxico para as células. Na fase exponencial, as bactérias se multiplicaram rapidamente, atingindo seu nível máximo com 24h, após esse período, as bactérias entraram em fase de declínio. Isso pode ter acontecido porque houve escassez de nutrientes no meio de cultura e assim, faltou energia suficiente para as bactérias se multiplicarem e ainda manter ativos os mecanismos de resistência. Dessa forma, após a fase lag, o crescimento diminui e o número de células viáveis na cultura é reduzido, o que também acontece na curva controle.

Em muitos estudos foi observado que a presença de MPT reduz a taxa do crescimento microbiano (Hassan et al., 2008; Neeta et al., 2016; Sharma and Shukla, 2021). Em geral, concentrações elevadas de MPT afetam o crescimento bacteriano de quatro formas distintas: 1. Os metais podem interagir com a membrana celular, causando danos irreversíveis na integridade da membrana; 2. Os metais que são absorvidos pelo citoplasma podem inativar ou oxidar as enzimas celulares; 3. Os metais podem afetar o material genético de microrganismos interagindo diretamente com o DNA e 4. Os microrganismos têm que direcionar sua energia do crescimento para a manutenção de funções celulares que permitem às bactérias resistir à toxicidade do metal, como os mecanismos de extrusão, atividades de redução e mecanismos de reparo ao DNA (Alnaimat et al., 2017; Nath et al., 2019).

Em geral, as diferenças nas taxas de crescimento entre os metais estudados dependem da eficácia do mecanismo adotado pelo isolado no combate à restrição extracelular de MPT (Oladipo et al., 2018). Existe relato na

literatura sugerindo mecanismos diferentes de resistência a metais, dependendo da concentração que eles estiverem no meio, nesse caso o organismo pode acumular metal até uma determinada concentração, quando ele atinge um limiar característico do metal e do organismo, o elemento acumulado começa a ser devolvido para o meio externo (Huang et al., 2014). Por isso, é importante estudar os genes presentes no genoma do nosso isolado, a fim de predizermos quais estão presentes e associá-los aos mecanismos de resistência que temos descritos na literatura. Desta forma pode-se definir sobre a possibilidade ou não de uso desse organismo em processos de biorremediação.

4.13 Remoção dos metais potencialmente tóxicos

A análise de espectrofotometria de absorção atômica com chama demonstrou uma diminuição gradual na quantidade de metal presente no meio de cultivo com o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, o que sugere aumento na porcentagem de bioacumulação dos metais com o aumento no tempo de cultivo e da biomassa (Figura 12). De todos os metais, Zn^{2+} e Cr^{6+} foram os que apresentaram as maiores taxas de bioacumulação, 18,69% e 13,63%, respectivamente. Seguindo a ordem decrescente, temos os metais: Cd^{2+} (6,23%), Cu^{2+} (4,42%), Cr^{3+} (2,46%) e Ni^{2+} (1,90%).

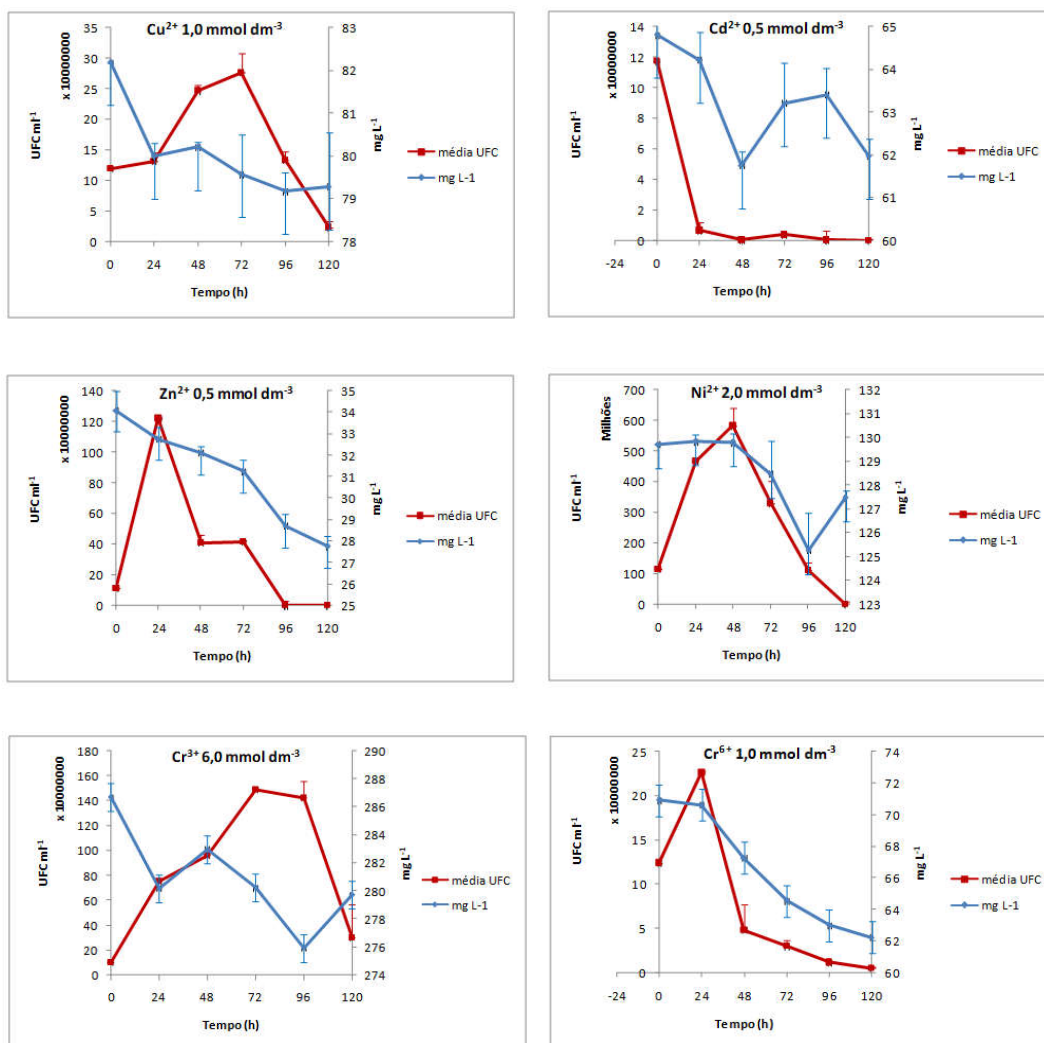


Figura 12. Crescimento celular de *Rhizobium* sp. LBMP-C04 (----) e remoção (----) de metais potencialmente tóxicos em meio de cultura CN líquido suplementado com: Cu²⁺ 1mmol dm⁻³, Cd²⁺ 0,5mmol dm⁻³, Zn²⁺ 0,5mmol dm⁻³, Ni²⁺ 2,0 mmol dm⁻³, Cr³⁺ 6,0 mmol dm⁻³ e Cr⁶⁺ 1,0 mmol dm⁻³.

A capacidade de alguns microrganismos de crescer na presença de altas concentrações de metais é resultado dos mecanismos de tolerância que podem ser intrínsecos ou induzidos por fatores ambientais do meio (Ferreira et al., 2018a). Os MPT presentes no ambiente não podem ser degradados pelos organismos vivos, mas alguns microrganismos são capazes de transformá-lo em outra forma orgânica ou em um estado de oxidação menos tóxico, através de mecanismos como bombas de efluxo de metais, produção de exopolissacarídeos, bem como o sequestro, precipitação, redução,

desintoxicação, bioacumulação ou adsorção dos metais. A bioacumulação bacteriana de MPT baseia-se em suas condições genéticas, fisiológicas e ambientais (Sharma and Shukla, 2021).

No meio de cultura acrescido com 1 mmol dm^{-3} de Cu^{2+} , observamos um aumento da taxa de remoção do metal no meio de cultura nas primeiras 24 horas de cultivo, associado à curva de crescimento bacteriano, estas primeiras 24 horas correspondem à fase lag, uma fase em que a bactéria está reconhecendo o meio, se adaptando e preparando todo seu maquinário celular para as condições que se encontra. Neste momento os íons metálicos estariam se acumulando nas células bacterianas, por isso a quantidade de metal no meio de cultura se encontra menor. Considerando a expressão do gene *actP* pelo nosso isolado, a partir das 24 horas de cultivo, a bomba de efluxo estaria ativa e expulsando esse metal para fora da célula e se multiplicando concomitantemente. Embora, uma porcentagem do metal ainda continue bioacumulado nas células, pois a quantidade de metal final é menor que a inicial.

O isolado não foi capaz de se multiplicar no meio de cultura acrescido de Cd^{2+} , entretanto bioacumulou este metal intracelularmente. A curva de crescimento celular declina nas 48 horas iniciais de cultivo, enquanto a taxa de remoção de metais aumenta nesse período. Podemos supor que enquanto vivas, estas células estavam acumulando íons metálicos, porém, conforme foram morrendo, as células foram sofrendo lises e os compostos intracelulares, incluindo os metais, foram expostos no meio de cultura, por isso a quantidade de metal no meio de cultura aumenta. Após as 96 horas, esses íons metálicos podem ter sido adsorvidos pelas células mortas e se complexado a outras moléculas orgânicas presentes no meio de cultura. O processo de biossorção acontece sem gasto de energia e pode ocorrer tanto em células vivas quanto em células mortas por meio de troca de íons metálicos, complexação de superfície, coordenação, quelação e microprecipitação (Oves et al., 2017).

Quatro isolados bacterianos solubilizadores de fosfato foram selecionados para estudar seu potencial de desintoxicação de MPT em um experimento com múltiplos metais, na concentração de 100 mg L^{-1} , foi

observado, por microscopia eletrônica de varredura, que as bactérias sequestraram os íons metálicos extracelularmente, através da produção de exopolissacarídeos, os quais desempenham um papel vital na biossorção (Saranya et al., 2018). Outras substâncias extracelulares como proteínas, compostos húmicos e alguns grupos funcionais aniônicos de ligação a metais também são capazes de se ligar aos íons metálicos, evitando a internalização de tais metais pelas células bacterianas (Ahemad and Kibret, 2014).

No tratamento com Zn^{2+} , os genes *actS* e *actR* podem estar sendo expressos e conferindo resistência ao isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04, pois este foi capaz de se multiplicar nas 24 horas de cultivo e sem apresentar uma extensa fase lag. No entanto, o que pode ter acontecido para que após este período a bactéria entrasse em fase de declínio foi a escassez de nutrientes no meio de cultura, limitando o crescimento bacteriano. Todavia, as células foram capazes de bioacumular e/ou biossorver o metal ao longo das 120 horas de cultivo.

O mecanismo de resistência predito no isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 para Ni^{2+} seriam as bombas de efluxo codificadas pelos genes *dmeF* e *dmeR*. Dessa forma, elas permitiriam que o isolado crescesse no meio de cultura sem permitir que altas concentrações intracelulares do metal causassem toxidez e morte celular. Neste sentido, conforme o metal entra na célula, ele é expulso para fora, o que se confirma pela estabilidade na taxa de remoção do metal até as 48 horas de cultivo. Depois desse período, há um declínio da curva de crescimento e um aumento na taxa de remoção do metal; isto pode ter acontecido por estar faltando nutrientes nesse meio de cultivo, o que leva a uma falta de energia para que a bactéria consiga se multiplicar e também manter ativa a bomba de efluxo. Assim, os metais vão entrando nas células e elas, sem energia para expulsá-los, bioacumulam este metal. No entanto, depois das 96 horas de cultivo, o metal é devolvido ao meio de cultura, devido às lises celulares.

A resistência ao cromo predita em nosso estudo é conferida pelas helicases RuvB e RecG, são enzimas envolvidas no reparo aos danos no DNA causado por este metal. Em Cr^{3+} , o isolado teve uma fase lag para se adaptar

ao meio acrescido de metal e ativar os mecanismos necessários para se multiplicar, apresentando dessa forma, um crescimento bem próximo ao observado no controle. Entretanto, em relação à taxa de remoção do metal, ela diminuiu e aumentou ao longo das 120 horas de incubação, tendo dois picos de bioacumulação, com 24 e 96 horas.

Assim que a bactéria foi inoculada no meio de cultura, ela entra em uma fase de adaptação e reconhecimento do meio, neste período, os íons metálicos se adentraram para o interior da célula. Quando a bactéria reconheceu este meio, ela foi capaz de expressar um mecanismo de resistência e expulsar uma porcentagem dos íons metálicos para o meio de cultura, por isso a quantidade de metal no meio aumenta. Das 48 às 72 horas de cultivo, o isolado estava em sua fase exponencial de crescimento celular e a taxa de remoção passou a aumentar. Nesse período, a bactéria foi capaz de acumular o metal presente no meio de cultura e ainda se multiplicar, provavelmente, as helicases estariam reparando quaisquer prejuízos causados às células e /ou esta concentração não era tóxica para as células. Com 96 horas de cultivos, temos dois eventos importantes acontecendo juntos, é o início da fase de morte celular e diminuição da taxa de remoção do metal. Conforme as células vão morrendo e sofrendo lise celular, este metal é devolvido ao meio de cultura.

Para Cr^{6+} , a taxa de remoção de metal aumentou ao longo do tempo de cultivo. Mesmo o isolado não conseguindo se multiplicar neste meio houve bioacumulação e/ou adsorção dos íons metálicos. Todavia, assim como aconteceu no tratamento com Zn^{2+} , mesmo com a morte das células, este metal continuou aderido às células e não foi devolvido para o meio de cultivo.

Em processos de biorremediação, na qual se deseja utilizar microrganismos para remover contaminantes de águas, por exemplo, é importante conhecer quais genes estão presentes no genoma desse organismo para que a melhor técnica seja utilizada. Mesmo quando os mecanismos que conferem resistência aos metais são expressos por genes que codificam bombas de efluxo há sua valia em usar este microrganismo. No entanto, é importante saber quais os tempos de bioacumulação e de expulsão desse

metal pelas células, para que os processos de remoção sejam feitos em períodos adequados de maior acumulação pelo microrganismo.

4.14 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas para investigar a bioabsorção e a bioacumulação dos MPT, assim como as alterações morfológicas das células de rizóbios cultivados na presença dos MPT estudados. As eletromicrografias de transmissão do isolado *Rhizobium* sp. LBMP- C04 após 96 horas de cultivo revelaram claramente a presença de precipitados dos metais no citoplasma do nosso isolado, fato observado pela presença de grânulos dentro das células bacterianas (Figura 13). Entretanto, em nenhum dos tratamentos houve sinais aparentes de lise ou desintegração da parede e membrana celular, o que é consistente com as observações de que este isolado é capaz de bioacumular MPT no interior de suas células. Também não foi observada a presença de secreções de exopolissacarídeos em volta das células.

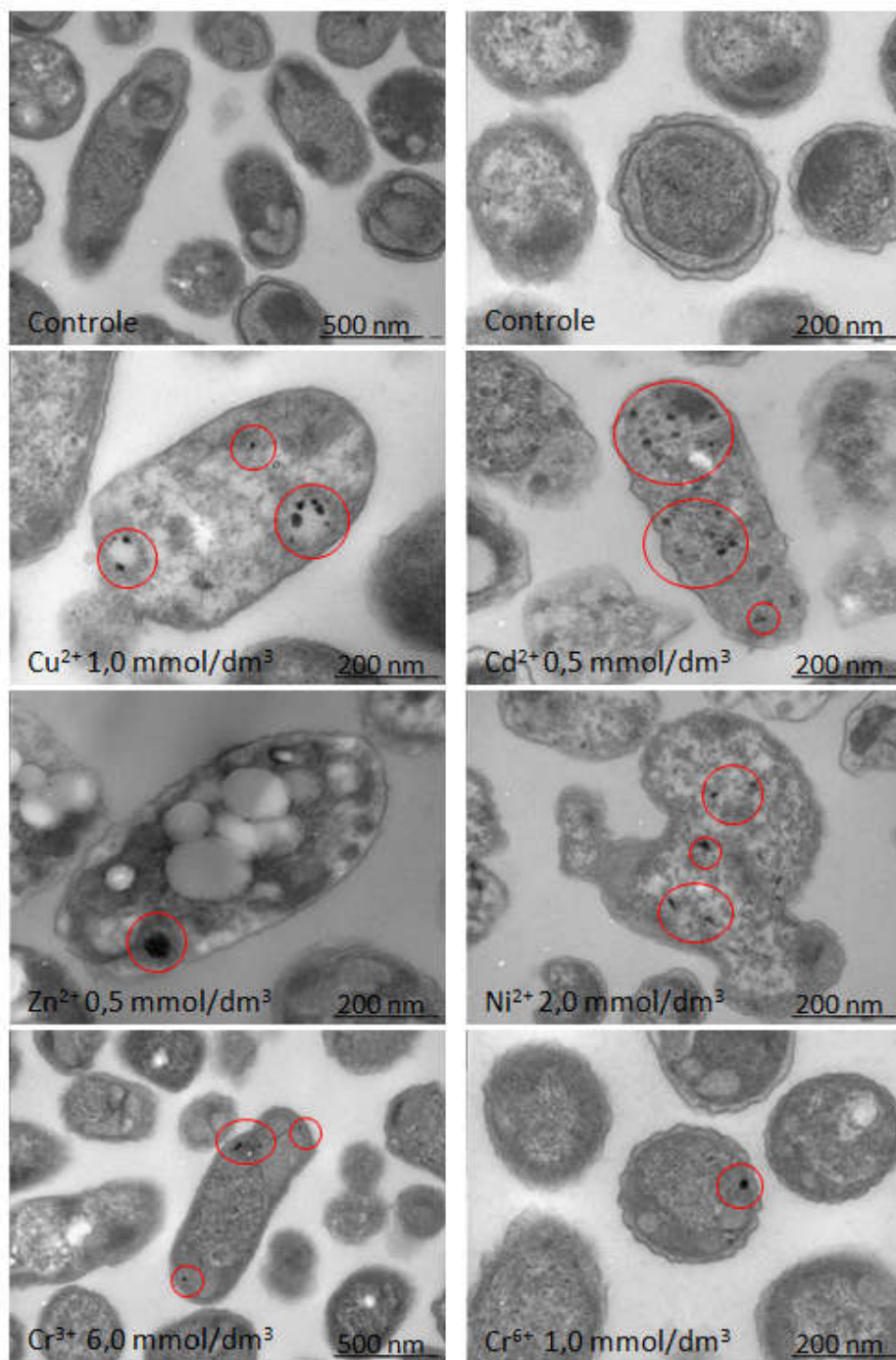


Figura 13. Eletromicrografias de transmissão do isolado *Rhizobium* sp. LBMP- C04 após 96 horas de cultivo nos tratamentos com MPT. Os depósitos com acúmulos de metais potencialmente tóxicos nas células bacterianas estão circulado em vermelho.

A presença de MPT intracelular demonstra qualitativamente que os metais não foram apenas adsorvidos pela parede celular, mas sim passados para o interior das células através da membrana celular. Este processo de acúmulo de MPT no espaço intracelular de células vivas é conhecido como bioacumulação, e depende do metabolismo celular. É um processo ativo, com gasto de energia, que inclui o transporte de íons metálicos para as células microbianas por meio de permeação complexa, endocitose e bomba de íons mediada por transportadores. Sendo que a quantidade de íons metálicos bioacumulados dentro das células bacterianas irá depender da composição genética das espécies dos microrganismos e das condições fisiológicas externas, como pH e temperatura (Chojnacka, 2010; Oves et al., 2017).

Nos tratamentos com Cd^{2+} ($0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$), Ni^{2+} (2 mmol dm^{-3}) e Cr^{6+} ($1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) foi perceptível uma mudança na parede celular, na qual estas células apresentaram uma rugosidade quando comparada à parede celular das células do tratamento controle, que é lisa. E para o tratamento com Ni^{2+} houve mudanças na morfologia celular, é possível perceber que a célula deixou de ter uma forma de bastonete para um formato mais irregular.

Um estudo foi conduzido para avaliar o efeito do Cr^{6+} dentro das células de *Bacillus subtilis* MNU16. A bactéria foi inoculada em concentrações crescentes do metal: 0, 100, 200 e 300 mg L^{-1} . Nos tratamentos com o metal, as células bacterianas apresentaram uma morfologia irregular e superfície rugosa em comparação com as células do controle, na qual tinham superfícies lisas. (Upadhyay et al., 2017). E em concentrações acima de 300 mg L^{-1} iniciou-se a lise celular, o que pode ser um efeito da deposição do Cr^{6+} no citoplasma e na superfície das células (Upadhyay et al., 2017).

(Ameen et al., 2020) também observaram mudanças na morfologia da bactéria *Lactobacillus plantarum* MF042018 quando avaliaram a capacidade de remoção dos metais Ni^{2+} e Cr^{2+} por este isolado após 24 horas de cultivo. Por análises de micrografias eletrônicas de transmissão, revelaram-se mudanças óbvias na morfologia da superfície celular bacteriana tratada com os metais em comparação com as células de controle. Houve o surgimento de depósitos de

metal densos adsorvidos à superfície externa da célula e acumulados dentro das células, bem como rugosidades na parede celular.

O estudo com os isolados *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 e *Ochrobactrum ciceri* BPS-26 mostram, através das imagens de microscopia eletrônica de varredura, mudanças morfológicas nas células desses microrganismos devido à ligação de íons metálicos após bioacumulação. As mudanças morfológicas incluíam irregularidade e agregação de células na parede bacteriana e aumento de comprimento com a projeção extracelular. A presença de secreção da camada de limo ao redor das células microbianas sugere que o EPS produzido aprisiona os íons de MPT. Evidenciando assim, que a superfície da célula bacteriana desempenha papel importante na absorção de metais (Sharma and Shukla, 2021a).

Em todos os tratamentos com MPT foi possível identificar os depósitos granulares dos íons metálicos no citoplasma da bactéria, além do acúmulo de poli-3-hidroxibutirato (PHB). Este biopolímero foi observado principalmente nos tratamentos com Ni^{2+} e Zn^{2+} , entretanto, não foi observado no citoplasma das células do controle (sem metal), pois elas exibiram um citoplasma homogêneo e sem grânulos densos.

O aumento da produção de PHB na presença dos MPT foi observado em outros trabalhos citados na literatura e parece estar envolvido com a tolerância bacteriana aos estresses ambientais (Chien et al., 2014; Ferreira et al., 2018a; Kamnev et al., 2012, 2002; Leonel et al., 2019). Estudando as características estruturais de *Azospirillum brasilense* Sp7 sob condições padrão e estressadas pelos MPT Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , (Kamnev et al., 2012) concluíram que o acúmulo de PHB induzido por metal é uma propriedade que contribui para a resposta da bactéria ao estresse por metais.

(Chien et al., 2014) estudaram a produção de PHB na presença de Cd^{2+} por *Cupriavidus taiwanensis* BCRC 17206^T e BCRC 17208. O peso seco das células e o teor de PHB sintetizado por essas cepas quando cultivadas em meio acrescido do metal ($0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ e 1 mmol dm^{-3}), por 24, 48 e 72 horas, foi muito maior do que em células cultivadas em meio sem Cd^{2+} . Os autores

concluíram que a síntese de PHB por essas cepas bacterianas podem aumentar sua resistência ao estresse de MPT, incluindo estresse de Cd^{2+} .

A bioacumulação dos íons metálicos dentro das células bacterianas confirma sua resistência e tolerância aos metais potencialmente tóxicos, propondo assim, seu uso na descontaminação de MPT por estratégia de biorremediação (Chojnacka, 2010; Malik, 2004), entretanto como pode ser observado nos nossos resultados o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 apesar de apresentar essa característica de bioacumulação, não tem capacidade de remover uma grande porcentagem de metal do meio de cultivo. Por outro lado, como essa bactéria apresenta características de ser uma promotora de crescimento de plantas, a sua resistência a metais pode significar uma importante contribuição em processos de fitorremediação.

5. CONCLUSÃO

É importante estudar os genes presentes no genoma do isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 a fim de predizermos quais estão presentes e associá-los aos mecanismos de resistência que temos descritos na literatura. Desta forma pode-se definir sobre a possibilidade ou não do uso desse organismo em processos de biorremediação. O isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 apresentou similaridade com a estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899, entretanto, os valores de ANI e DDH encontrados estão abaixo do limite necessário para inclusão na espécie *Rhizobium tropici*. Outros estudos são necessários para a classificação real desse isolado rizobiano.

Por outro lado, o *Rhizobium* sp. LBMP-C04 apresenta potencial para aplicação em processos de biorremediação. Foi observado nos estudos genômicos uma variedade de genes associados a mecanismos de resistência a MPT através de bombas de efluxo que são usadas para eliminar a sobrecarga desses metais no citoplasma, reparação de danos ao DNA e genes que codificam para proteínas reguladoras envolvidas na resistência aos MPT.

Características envolvidas com a capacidade de promoção de crescimento vegetal foram observadas pelos genes preditos e confirmadas por

testes de solubilização de fosfato, formação de sideróforos e produção de AIA. O isolado se mostrou resistente a diferentes metais, com capacidade de bioacumulação, mas sem grande capacidade de remoção desses elementos do meio de cultivo, o que novamente sugere o uso de bombas de efluxo como um dos principais mecanismos de resistência aos MPT estudados.

Os dados obtidos corroboram para selecionar o isolado *Rhizobium* sp. LBMP-C04 como uma bactéria que pode ser eficiente para processos de fitorremediação de ambientes contaminados por MPT, uma vez que nosso isolado pode se associar com plantas hiperacumuladores de MPT e estimular seu crescimento e ainda ser resistente a altas concentrações de metais presentes nesses ambientes contaminados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Morel, M., Iriarte, A., Jara, E., Musto, H., Castro-Sowinski, S., 1 Unidad Microbiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay, 2016. Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioeng.* 3, 156–175. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.2.156>
- Abbas, S.Z., Rafatullah, M., Ismail, N., Lalung, J., 2014. Isolation, Identification, and Characterization of Cadmium Resistant *Pseudomonas* sp. M3 from Industrial Wastewater. *J. Waste Manag.* 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/160398>
- Abbaszadeh-Dahaji, P., Masalehi, F., Akhgar, A., 2020. Improved Growth and Nutrition of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Plants in a Low-Fertility Calcareous Soil Treated with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Fe-EDTA. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20, 31–42. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00098-9>
- Abd-Alla, M.H., Morsy, F.M., El-Enany, A.-W.E., Ohyama, T., 2012. Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd²⁺ and Co²⁺. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 67, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.008>
- Abdollahi, S., Golchin, A., Shahryari, F., 2020. Lead and cadmium-resistant bacterial species isolated from heavy metal-contaminated soils show plant growth-promoting traits. *Int. Microbiol.* 23, 625–640. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00133-1>
- Ahemad, M., 2015. Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: a review. *3 Biotech* 5, 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0206-0>
- Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* 26, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alaylar, B., Egamberdieva, D., Gulluce, M., Karadayi, M., Arora, N.K., 2020. Integration of molecular tools in microbial phosphate solubilization research in agriculture perspective. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 93. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02870-x>

- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Ali, H., Khan, E., 2018. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’ – proposal of a comprehensive definition. *Toxicol. Environ. Chem.* 100, 6–19. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>
- Alnaimat, S., Shattal, S.A., Althunibat, O., Alsbou, E., Amasha, R., 2017. Iron (II) and other heavy-metal tolerance in bacteria isolated from rock varnish in the arid region of Al-Jafer Basin, Jordan. *Biodiversitas J. Biol. Divers.* 18, 1250–1257. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180350>
- Ameen, F.A., Hamdan, A.M., El-Naggar, M.Y., 2020. Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Sci. Rep.* 10, 314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57210-3>
- Auch, A.F., Klenk, H.-P., Göker, M., 2010. Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand. Genomic Sci.* 2, 142–148. <https://doi.org/10.4056/sigs.541628>
- Auda, I.G., Ali Salman, I.M., Odah, J.Gh., 2020. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Rep.* 20, 100666. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100666>
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Bamba, M., Aoki, S., Kajita, T., Setoguchi, H., Watano, Y., Sato, S., Tsuchimatsu, T., 2020. Massive rhizobial genomic variations associated with partner quality in *Lotus–Mesorhizobium* symbiosis (preprint). *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.983007>
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493–496.
- Berrada, H., 2014. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. *Br. Microbiol. Res. J.* 4, 616–639. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/5635>
- Bhardwaj, R., Gupta, A., Garg, J.K., 2018. Impact of heavy metals on inhibitory concentration of *Escherichia coli*—a case study of river Yamuna system, Delhi, India. *Environ. Monit. Assess.* 190, 674. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7061-0>
- Bianucci, E., Godoy, A., Furlan, A., Peralta, J.M., Hernández, L.E., Carpena-Ruiz, R.O., Castro, S., 2018. Arsenic toxicity in soybean alleviated by a symbiotic species of *Bradyrhizobium*. *Symbiosis* 74, 167–176. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0499-y>
- Boetzer, M., Henkel, C.V., Jansen, H.J., Butler, D., Pirovano, W., 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* 27, 578–579. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>
- Bornhorst, J., Kipp, A.P., Haase, H., Meyer, S., Schwerdtle, T., 2018. The crux of inept biomarkers for risks and benefits of trace elements. *TrAC Trends Anal. Chem.* 104, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.007>
- Branco, R., Chung, A.P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P., Zhitkovich, A., 2008. The Chromate-Inducible chrBACF Operon from the Transposable Element TnOtChr Confers Resistance to Chromium(VI) and Superoxide. *J. Bacteriol.* 190, 6996–7003. <https://doi.org/10.1128/JB.00289-08>
- Brígido, C., Glick, B.R., 2015. Phytoremediation Using Rhizobia, in: Ansari, A.A., Gill, S.S., Gill, R., Lanza, G.R., Newman, L. (Eds.), *Phytoremediation*. Springer International Publishing, Cham, pp. 95–114. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5_9
- Brooks, B.D., Brooks, A.E., 2014. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 78, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.027>
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>

- Carlos, M.-H.J., Stefani, P.-V.Y., Janette, A.-M., Melani, M.-S.S., Gabriela, P.-O., 2016. Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth-promoting bacteria. *Microbiol. Res.* 188–189, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.001>
- Chen, J., Li, J., Zhang, H., Shi, W., Liu, Y., 2019. Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China. *Front. Microbiol.* 10, 1916. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01916>
- Chen, J., Liu, Y.-Q., Yan, X.-W., Wei, G.-H., Zhang, J.-H., Fang, L.-C., 2018. Rhizobium inoculation enhances copper tolerance by affecting copper uptake and regulating the ascorbate-glutathione cycle and phytochelatin biosynthesis-related gene expression in *Medicago sativa* seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.001>
- Chen, S., Li, X., Sun, G., Zhang, Y., Su, J., Ye, J., 2015a. Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in *Bacterium LSJC7*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23390–23404. <https://doi.org/10.3390/ijms161023390>
- Chen, S., Li, X., Sun, G., Zhang, Y., Su, J., Ye, J., 2015b. Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in *Bacterium LSJC7*. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23390–23404. <https://doi.org/10.3390/ijms161023390>
- Chen, Y., Ye, W., Zhang, Y., Xu, Y., 2015. High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Res.* 43, 7762–7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>
- Chien, C.-C., Wang, L.-J., Lin, W.-R., 2014. Polyhydroxybutyrate accumulation by a cadmium-resistant strain of *Cupriavidus taiwanensis*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45, 1164–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2014.02.004>
- Chojnacka, K., 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environ. Int.* 36, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Contreras-Moreira, B., Vinuesa, P., 2013. GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>
- Cristaldi, A., Conti, G.O., Jho, E.H., Zuccarello, P., Grasso, A., Copat, C., Ferrante, M., 2017. Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environ. Technol. Innov.* 8, 309–326. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.08.002>
- Dall’Agnol, R.F., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M.A., Delamuta, J.R.M., Andrade, D.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M., 2013. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4167–4173. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052928-0>
- Darling, A.C.E., 2004. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Datta, B., Chakrabartty, P.K., 2014. Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum* L. *3 Biotech* 4, 391–401. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0164-y>
- de Lajudie, P.M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-Romero, E., Moulin, L., Mousavi, S.A., Nesme, X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian, C.-F., Vinuesa, P., Wei, G., Willems, A., Zilli, J., Young, P., 2019a. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 1852–1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>
- de Lajudie, P.M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-Romero, E., Moulin, L., Mousavi, S.A., Nesme,

- X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian, C.-F., Vinuesa, P., Wei, G., Willems, A., Zilli, J., Young, P., 2019b. Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 1852–1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>
- Didion, J.P., Martin, M., Collins, F.S., 2017. Atropos: specific, sensitive, and speedy trimming of sequencing reads. *PeerJ* 5, e3720. <https://doi.org/10.7717/peerj.3720>
- Diep, P., Mahadevan, R., Yakunin, A.F., 2018. Heavy Metal Removal by Bioaccumulation Using Genetically Engineered Microorganisms. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6, 157. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00157>
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., Kothe, E., 2009. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biol. Biochem.* 41, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.010>
- Dokpikul, T., Chaoprasid, P., Saninjuk, K., Sirirakphaisarn, S., Johnrod, J., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., Mongkolsuk, S., 2016. Regulation of the Cobalt/Nickel Efflux Operon *dmeRF* in *Agrobacterium tumefaciens* and a Link between the Iron-Sensing Regulator *RirA* and Cobalt/Nickel Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4732–4742. <https://doi.org/10.1128/AEM.01262-16>
- El-Deeb, B., Fayez, K., Gherbawy, Y., 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *J. Plant Interact.* 8, 56–64. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.680077>
- Elizalde-Díaz, J.P., Hernández-Lucas, I., Medina-Aparicio, L., Dávalos, A., Leija, A., Alvarado-Affantranger, X., García-García, J.D., Hernández, G., Garcia-de los Santos, A., 2019. *Rhizobium tropici* CIAT 899 *copA* gene plays a fundamental role in copper tolerance in both free life and symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Microbiology* 165, 651–661. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000803>
- Elmer, K.R., 2016. Genomic tools for new insights to variation, adaptation, and evolution in the salmonid fishes: a perspective for charr. *Hydrobiologia* 783, 191–208. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2614-5>
- Fagorzi, C., Checcucci, A., diCenzo, G., Debiec-Andrzejewska, K., Dziewit, L., Pini, F., Mengoni, A., 2018. Harnessing Rhizobia to Improve Heavy-Metal Phytoremediation by Legumes. *Genes* 9, 542. <https://doi.org/10.3390/genes9110542>
- Fan, M., Xiao, X., Guo, Y., Zhang, J., Wang, E., Chen, W., Lin, Y., Wei, G., 2018. Enhanced phytoremediation of *Robinia pseudoacacia* in heavy metal-contaminated soils with rhizobia and the associated bacterial community structure and function. *Chemosphere* 197, 729–740. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.102>
- Fashola, M., Ngole-Jeme, V., Babalola, O., 2016a. Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1047. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
- Fashola, M., Ngole-Jeme, V., Babalola, O., 2016b. Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1047. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
- Fashola, M., Ngole-Jeme, V., Babalola, O., 2016c. Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1047. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
- Ferreira, P.A.A., Bomfeti, C.A., Silva Júnior, R. da, Soares, B.L., Soares, C.R.F.S., Moreira, F.M. de S., 2012. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 47, 85–95. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000100012>

- Ferreira, P.A.A., Bomfeti, C.A., Soares, C.R.F. de S., Soares, B.L., Moreira, F.M. de S., 2018a. *Cupriavidus necator* strains: zinc and cadmium tolerance and bioaccumulation. *Sci. Agric.* 75, 452–460. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0071>
- Ferreira, P.A.A., Dahmer, S. de F.B., Backes, T., Silveira, A. de O., Jacques, R.J.S., Zafar, M., Pauletto, E.A., Santos, M.A.O. dos, Silva, K. da, Giachini, A.J., Antonioli, Z.I., 2018b. Isolation, Characterization and Symbiotic Efficiency of Nitrogen-Fixing and Heavy Metal-Tolerant Bacteria from a Coalmine Wasteland. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 42. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20170171>
- Ge, S., Ge, S.C., 2016. Simultaneous Cr(VI) reduction and Zn(II) biosorption by *Stenotrophomonas* sp. and constitutive expression of related genes. *Biotechnol. Lett.* 38, 877–884. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2057-8>
- Ghosh, P.K., Saha, P., Mayilraj, S., Maiti, T.K., 2013. Role of IAA metabolizing enzymes on production of IAA in root, nodule of *Cajanus cajan* and its PGP *Rhizobium* sp. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.04.002>
- Giner-Lamia, J., López-Maury, L., Florencio, F.J., 2015. CopM is a novel copper-binding protein involved in copper resistance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *MicrobiologyOpen* 4, 167–185. <https://doi.org/10.1002/mbo3.231>
- Glick, B.R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica* 2012, 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>
- Gomez-Fuentes, C., Department of Chemical Engineering, Universidad de Magallanes, Avda. Bulnes, 01855, Punta Arenas, Región de Magallanes y Antártica Chilena, Chile, Sabri, S., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia, Ahmad, S.A., National Antarctic Research Centre, B303 Level 3, Block B, IPS Building, Universiti Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia, 2020. Effects of heavy metals on Antarctic bacterial cell growth kinetics and degradation of waste canola oil. *J. Environ. Biol.* 41, 1433–1441. <https://doi.org/10.22438/jeb/41/6/MRN-1464>
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C.L.L., Krishnamurthy, L., 2015. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* 5, 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M., 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Gosal, S.K., Mehta, A., 2015. Molecular Approach to Study Soil Bacterial Diversity, in: Egamberdieva, D., Shrivastava, S., Varma, A. (Eds.), *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants, Soil Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 359–380. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13401-7_18
- Graham, P.H., Sadowsky, M.J., Keyser, H.H., Barnett, Y.M., Bradley, R.S., Cooper, J.E., De Ley, D.J., Jarvis, B.D.W., Roslycky, E.B., Strijdom, B.W., Young, J.P.W., 1991. Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 582–587. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-582>
- Granja-Travez, R.S., Bugg, T.D.H., 2018. Characterization of multicopper oxidase CopA from *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Involvement in bacterial lignin oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 660, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.10.012>
- Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Microbes and metals: interactions in the environment: Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47, 453–467. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700275>

- Haney, C.J., Grass, G., Franke, S., Rensing, C., 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 215–226. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0224-3>
- Hao, X., Xie, P., Johnstone, L., Miller, S.J., Rensing, C., Wei, G., 2012. Genome Sequence and Mutational Analysis of Plant-Growth-Promoting Bacterium *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 Isolated from a Zinc-Lead Mine Tailing. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5384–5394. <https://doi.org/10.1128/AEM.01200-12>
- Hassan, S.H.A., Abskharon, R.N.N., Gad El-Rab, S.M.F., Shoreit, A.A.M., 2008. Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *J. Basic Microbiol.* 48, 168–176. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700338>
- Herzberg, M., Bauer, L., Kirsten, A., Nies, D.H., 2016. Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* 8, 313–326. <https://doi.org/10.1039/C5MT00295H>
- Huang, F., Guo, C.-L., Lu, G.-N., Yi, X.-Y., Zhu, L.-D., Dang, Z., 2014. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere* 109, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.066>
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L.P., Szklarczyk, D., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2017. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. *Mol. Biol. Evol.* 34, 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M.C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2016. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 44, D286–D293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248>
- Imada, E.L., Rolla dos Santos, A.A. de P., Oliveira, A.L.M. de, Hungria, M., Rodrigues, E.P., 2017. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Res. Microbiol.* 168, 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.010>
- Imperi, F., Leoni, L., Visca, P., 2014. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00178>
- Imran, Md., Das, K.R., Naik, M.M., 2019. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere* 215, 846–857. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114>
- Iyer, B., Rajkumar, S., 2019. Succinate irrepressible periplasmic glucose dehydrogenase of *Rhizobium* sp. Td3 and SN1 contributes to its phosphate solubilization ability. *Arch. Microbiol.* 201, 649–659. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01630-2>
- Jain, C., Rodríguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9, 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jijón-Moreno, S., Marcos-Jiménez, C., Pedraza, R.O., Ramírez-Mata, A., de Salamone, I.G., Fernández-Scavino, A., Vásquez-Hernández, C.A., Soto-Urzuá, L., Baca, B.E., 2015. The ipdC, hisC1 and hisC2 genes involved in indole-3-acetic production used as alternative phylogenetic markers in *Azospirillum brasilense*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 1501–1517. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0444-0>
- Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, B.-Y., Petersen, L.M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S.R., Hanson, B.M., Agresta, H.O., Gerstein, M., Sodergren, E., Weinstock, G.M., 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat. Commun.* 10, 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

- Kamnev, A.A., Antonyuk, L.P., Tugarova, A.V., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., Gardiner, P.H.E., 2002. Fourier transform infrared spectroscopic characterisation of heavy metal-induced metabolic changes in the plant-associated soil bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Mol. Struct.* 610, 127–131. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00021-2)
- Kamnev, A.A., Tugarova, A.V., Tarantilis, P.A., Gardiner, P.H.E., Polissiou, M.G., 2012. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effects of copper(II). *Appl. Soil Ecol.* 61, 213–216. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.020>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M., 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M., 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10311-008-0155-0>
- Kim, K., Kim, W., Kim, S., 2011. ReMark: an automatic program for clustering orthologs flexibly combining a Recursive and a Markovclustering algorithms. *Bioinformatics* 27, 1731–1733. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr259>
- Kim, M., Park, S.-C., Baek, I., Chun, J., 2015. Large-scale evaluation of experimentally determined DNA G+C contents with whole genome sequences of prokaryotes. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.11.008>
- Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M., 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 2567–2572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102>
- Krawczyk, P.S., Lipinski, L., Dziembowski, A., 2018. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res.* 46, e35–e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
- Lebrazi, S., Fadil, M., Chraïbi, M., Fikri-Benbrahim, K., 2020. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production by *Rhizobium* sp. strain using response surface methodology. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 18, 21. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00035-9>
- Ledin, M., 2000. Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Sci. Rev.* 51, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00008-8)
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.-C., Chun, J., 2016a. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.-C., Chun, J., 2016b. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
- Leonel, T.F., Moretto, C., Castellane, T.C.L., da Costa, P.I., Lemos, E.G. de M., 2019. The Influence of Cooper and Chromium Ions on the Production of Exopolysaccharide and Polyhydroxybutyrate by *Rhizobium tropici* LBMP-C01. *J. Polym. Environ.* 27, 445–455. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1359-4>
- Li, X.-Z., Plésiat, P., Nikaido, H., 2015. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Li, Z., Song, X., Wang, J., Bai, X., Gao, E., Wei, G., 2018. Nickel and cobalt resistance properties of *Sinorhizobium meliloti* isolated from *Medicago lupulina* growing in gold mine tailing. *PeerJ* 6, e5202. <https://doi.org/10.7717/peerj.5202>
- Malhotra, M., Srivastava, S., 2008. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 425–433. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9207-x>

- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
- Mandal, S., Mandal, M., Das, A., Pati, B., Ghosh, A., 2009. Stimulation of indoleacetic acid production in a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* by root nodule phenolic acids. *Arch. Microbiol.* 191, 389–393. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0455-6>
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C., 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x>
- Mc Dermott, P.F., Walker, R.D., White, D.G., 2003. Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *Int. J. Toxicol.* 22, 135–143. <https://doi.org/10.1080/10915810305089>
- McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.), 2003. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*, Environmental science and technology. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P., Göker, M., 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Miller, S.H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J.P., O’Gara, F., 2009. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species: Inorganic P-solubilization in *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x>
- Miranda, A.T., González, M.V., González, G., Vargas, E., Campos-García, J., Cervantes, C., 2005. Involvement of DNA helicases in chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 578, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.05.018>
- Moretto, C., Castellane, T.C.L., Lopes, E.M., Omori, W.P., Sacco, L.P., Lemos, E.G. de M., 2015. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.056>
- Naamala, J., Jaiswal, S.K., Dakora, F.D., 2016. Antibiotics Resistance in *Rhizobium*: Type, Process, Mechanism and Benefit for Agriculture. *Curr. Microbiol.* 72, 804–816. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1005-0>
- Nath, S., Paul, P., Roy, R., Bhattacharjee, S., Deb, B., 2019. Isolation and identification of metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria from soil samples of Cachar district of Assam, India. *SN Appl. Sci.* 1, 727. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0762-3>
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Neeta, B., Maansi, V., Harpreet, S.B., 2016. Characterization of heavy metal (cadmium and nickel) tolerant Gram negative enteric bacteria from polluted Yamuna River, Delhi. *Afr. J. Microbiol. Res.* 10, 127–137. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7769>
- Neubauer, U., Furrer, G., Kayser, A., Schulin, R., 2000. Siderophores, NTA, and Citrate: Potential Soil Amendments to Enhance Heavy Metal Mobility in Phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* 2, 353–368. <https://doi.org/10.1080/15226510008500044>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2)

- Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A., 2007. Regulation of Multidrug Efflux Systems Involved in Multidrug and Metal Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189, 9066–9075. <https://doi.org/10.1128/JB.01045-07>
- Nokman, W., Benlucankar, V., Maria Packiam, S., Vincent, S., 2019. Screening and molecular identification of heavy metal resistant *Pseudomonas putida* S4 in tannery effluent wastewater. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18, 101052. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101052>
- Oladipo, O.G., Ezeokoli, O.T., Maboeta, M.S., Bezuidenhout, J.J., Tiedt, L.R., Jordaan, A., Bezuidenhout, C.C., 2018. Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal concentrations. *J. Environ. Manage.* 212, 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.038>
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L.E., Rogel, M.A., González, V., Peralta, H., Mora, J., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2015. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>
- Osman, G.E.H., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Shaaban, M.R., Samreen, S., Ahmad, I., 2019. Recent Progress in Metal-Microbe Interactions: Prospects in Bioremediation. *J. Pure Appl. Microbiol.* 13, 13–26. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.1.02>
- Oves, M., Khan, M.S., Qari, H.A., 2017. Ensifer adhaerens for heavy metal bioaccumulation, biosorption, and phosphate solubilization under metal stress condition. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 80, 540–552. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.026>
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2015. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 16, 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>
- Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2014. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 42, D737–D743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1252>
- Perry, E.K., Newman, D.K., 2019. The transcription factors ActR and SoxR differentially affect the phenazine tolerance of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 112, 199–218. <https://doi.org/10.1111/mmi.14263>
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- Prasad, M.N.V., 2004. Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H., Fraenzle, S., Wuenschmann, S., Markert, B., 2010. Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environ. Pollut.* 158, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.038>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., Cervantes, C., 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21, 321–332. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>
- Rangel, W.M., Thijs, S., Janssen, J., Oliveira Longatti, S.M., Bonaldi, D.S., Ribeiro, P.R.A., Jambon, I., Eevers, N., Weyens, N., Vangronsveld, J., Moreira, F.M.S., 2017. Native

- rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation* 19, 142–156. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207600>
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., Shankhdhar, S.C., 2021. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 21, 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>
- Reeve, W., O'Hara, G., Chain, P., Ardley, J., Bräu, L., Nandesena, K., Tiwari, R., Malfatti, S., Kiss, H., Lapidus, A., Copeland, A., Nolan, M., Land, M., Ivanova, N., Mavromatis, K., Markowitz, V., Kyrpides, N., Melino, V., Denton, M., Yates, R., Howieson, J., 2010. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. *Stand. Genomic Sci.* 2, 66–76. <https://doi.org/10.4056/sigs.44642>
- Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Kale, N.B., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., 2002. ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Mol. Microbiol.* 43, 981–991. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02791.x>
- Rissman, A.I., Mau, B., Biehl, B.S., Darling, A.E., Glasner, J.D., Perna, N.T., 2009. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics* 25, 2071–2073. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp356>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287, 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Rosariastuti, R., Mahardika, D.P., Supriyadi, Purwanto, Hartati, S., 2019. Soil Bioremediation of lead (Pb) polluted paddy field using Mendong (*Fimbristylis globulosa*), *Rhizobium* Sp₃, compost, and inorganic fertilizer. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 230, 012014. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012014>
- Rosariastuti, R., Sudadi, Supriyadi, Prasasti, F.S., 2020. A bioremediation process based on the application of *Rhizobium* sp. I3 and Ramie (*Boehmeria nivea* L.) in lead contaminated soils. *J. Cultiv. Plants* 40-48 Seiten. <https://doi.org/10.5073/JFK.2020.02-03.02>
- Rubio-Sanz, L., Brito, B., Palacios, J., 2018. Analysis of metal tolerance in *Rhizobium leguminosarum* strains isolated from an ultramafic soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny010>
- Rubio-Sanz, L., Prieto, R.I., Imperial, J., Palacios, J.M., Brito, B., 2013. Functional and Expression Analysis of the Metal-Inducible *dmeRF* System from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6414–6422. <https://doi.org/10.1128/AEM.01954-13>
- Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., 1977. Relationship between amino acid production and phosphate-dissolving capacity of bacteria. *Folia Microbiol. (Praha)* 22, 40–42. <https://doi.org/10.1007/BF02876992>
- Rupal K, S., Raval, V.H., Saraf, M., 2020. Biosynthesis and purification of indole-3-acetic acid by halotolerant rhizobacteria isolated from Little Runn of Kachchh. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 23, 101435. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101435>
- Saadani, O., Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Abdelkrim, S., Barhoumi, F., Jebara, M., Jebara, S.H., 2016. In situ phytostabilisation capacity of three legumes and their associated Plant Growth Promoting Bacteria (PGPBs) in mine tailings of northern Tunisia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 130, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.032>
- Samago, T.Y., Anniye, E.W., Dakora, F.D., 2018. Grain yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties is markedly increased by rhizobial inoculation and phosphorus application in Ethiopia. *Symbiosis* 75, 245–255. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0529-9>
- Sankoff, D., 2003. Rearrangements and chromosomal evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 583–587. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.10.006>

- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M., Valdez-Martínez, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., 2015. Induction of the homologous recombination system by hexavalent chromium in *Rhizobium etli*. *Microbiol. Res.* 170, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.06.003>
- Saranya, K., Sundaramanickam, A., Shekhar, S., Meena, M., Sathishkumar, R.S., Balasubramanian, T., 2018. Biosorption of multi-heavy metals by coral associated phosphate solubilising bacteria *Cronobacter muytjensii* KSCAS2. *J. Environ. Manage.* 222, 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.083>
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seiler, C., Berendonk, T.U., 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>
- Sharma, B., Shukla, P., 2021a. A comparative analysis of heavy metal bioaccumulation and functional gene annotation towards multiple metal resistant potential by *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 and *Ochrobactrum ciceri* BPS-26. *Bioresour. Technol.* 320, 124330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124330>
- Sharma, B., Shukla, P., 2021b. A comparative analysis of heavy metal bioaccumulation and functional gene annotation towards multiple metal resistant potential by *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 and *Ochrobactrum ciceri* BPS-26. *Bioresour. Technol.* 320, 124330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124330>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Suryawati, B., 2018. Zinc homeostasis mechanism and its role in bacterial virulence capacity. Presented at the THE 8TH ANNUAL BASIC SCIENCE INTERNATIONAL CONFERENCE: Coverage of Basic Sciences toward the World's Sustainability Challenges, East Java, Indonesia, p. 070021. <https://doi.org/10.1063/1.5062819>
- Tahir, U., Sohail, S., Khan, U.H., 2017. Concurrent uptake and metabolism of dyestuffs through bio-assisted phytoremediation: a symbiotic approach. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 22914–22931. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0029-8>
- Tang, G., Wang, S., Lu, D., Huang, L., Li, N., Luo, L., 2017. Two-component regulatory system ActS/ActR is required for *Sinorhizobium meliloti* adaptation to oxidative stress. *Microbiol. Res.* 198, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.005>
- Tatusov, R.L., 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28, 33–36. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
- Thompson, C.C., Chimento, L., Edwards, R.A., Swings, J., Stackebrandt, E., Thompson, F.L., 2013. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 14, 913. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-913>
- Trimble, M.J., Mlynářčík, P., Kolář, M., Hancock, R.E.W., 2016. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>
- Udumula, V., Ham, Y.W., Fosso, M.Y., Chan, K.Y., Rai, R., Zhang, J., Li, J., Chang, C.-W.T., 2013. Investigation of antibacterial mode of action for traditional and amphiphilic aminoglycosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 1671–1675. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.073>

- Ullah, A., Heng, S., Munis, M.F.H., Fahad, S., Yang, X., 2015. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environ. Exp. Bot.* 117, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>
- Upadhyay, N., Vishwakarma, K., Singh, J., Mishra, M., Kumar, V., Rani, R., Mishra, R.K., Chauhan, D.K., Tripathi, D.K., Sharma, S., 2017. Tolerance and Reduction of Chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 Isolated from Contaminated Coal Mining Soil. *Front. Plant Sci.* 8, 778. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00778>
- Vargas, L.K., Volpiano, C.G., Lisboa, B.B., Giongo, A., Beneduzi, A., Passaglia, L.M.P., 2017. Potential of Rhizobia as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, in: Zaidi, A., Khan, M.S., Musarrat, J. (Eds.), *Microbes for Legume Improvement*. Springer International Publishing, Cham, pp. 153–174. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_7
- Verma, S., Kuila, A., 2019. Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environ. Technol. Innov.* 14, 100369. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L.E., Contreras-Moreira, B., 2018. GET_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. *Front. Microbiol.* 9, 771. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00771>
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., 2014. Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 633–659. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12051>
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A., 2008. Effects of Heavy Metal Toxicity on Growth, Symbiosis, Seed yield and Metal Uptake in Pea Grown in Metal Amended Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 152–158. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9383-z>
- Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., Fan, Y., Wei, Z., 2018. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresour. Technol.* 247, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.092>
- Wiener, P., 1996. Experimental studies on the ecological role of antibiotic production in bacteria. *Evol. Ecol.* 10, 405–421. <https://doi.org/10.1007/BF01237726>
- Wu, S., Xia, X., Wang, D., Zhou, Z., Wang, G., 2019. Gene function and expression regulation of RuvRCAB in bacterial Cr(VI), As(III), Sb(III), and Cd(II) resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 2701–2713. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09666-6>
- Xia, X., Wu, S., Zhou, Z., Wang, G., 2021. Microbial Cd(II) and Cr(VI) resistance mechanisms and application in bioremediation. *J. Hazard. Mater.* 401, 123685. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123685>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Young, J.P.W., 2016. Bacteria Are Smartphones and Mobile Genes Are Apps. *Trends Microbiol.* 24, 931–932. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.002>

