

ANÁLISES GENÔMICAS DE TRÊS ISOLADOS DO GÊNERO
Stenotrophomonas ORIUNDOS DE VERMICOMPOSTO

FRANCISNEI PEDROSA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ
Fevereiro de 2019

ANÁLISES GENÔMICAS DE TRÊS ISOLADOS DO GÊNERO
Stenotrophomonas ORIUNDOS DE VERMICOMPOSTO

FRANCISNEI PEDROSA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ
Fevereiro de 2019

ANÁLISES GENÔMICAS DE TRÊS ISOLADOS DO GÊNERO
Stenotrophomonas ORIUNDOS DE VERMICOMPOSTO

FRANCISNEI PEDROSA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada no dia 28/02/2019

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Daniel Basílio Zandonadi – UFRJ

Prof. Dra. Aline Chaves Intorne – IFRJ

Dr. Evenilton Pessoa Costa – UENF

Prof. Dr. Thiago Motta Venâncio – UENF (orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Francisco (*in memoriam*) e Sônia, meus irmãos Thiago (*in memoriam*), Carla, Cláudia, Kátia e Inês que me apoiaram e me deram forças para enfrentar os momentos mais difíceis desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele não teria forças e nem esperanças para buscar meus objetivos;

Ao meu orientador Thiago Venâncio, pelo exemplo de profissionalismo, pela oportunidade de estar no meio de uma equipe enriquecedora e por me incentivar a buscar cada vez mais o melhor;

Aos meus amigos e pesquisadores do laboratório: Filipe Matteoli, Kanhu Moharana, Rajesh Gazara, Gustavo Lima, Hemanoel Passarelli, Daniella Canedo, Késia Dias, Dayana Kelly, Fabrício Brum e Fabrício Almeida, pelo companheirismo, força e incentivo nos momentos difíceis e nos felizes;

Agradeço a todos os meus amigos do LQFPP, especialmente: Cida Bertoncelli, Deise Paes e aos professores Fábio Olivares, Clícia Grativol e Olga Machado pelos grandes ensinamentos e pelo apoio nas mais diversas situações;

Agradeço a Letícia Rocha do grupo NUDIBA, pela dedicação e pela ajuda extraordinária durante os testes experimentais;

Ao professor Arnoldo Rocha e todos os membros do programa de pós-graduação, pelo exemplo de competência e profissionalismo;

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo financiamento durante a pesquisa.

RESUMO

O aumento contínuo da população mundial e a adoção de práticas agrícolas intensivas são diretamente associados ao uso de grandes quantidades de fertilizantes químicos e poluição ambiental. Uma das alternativas para mitigar esses danos é o manejo sustentável do solo. Dentre as técnicas utilizadas, destaca-se a vermicompostagem, processo de biotransformação da matéria orgânica mediada por microrganismos e minhocas para produção de substâncias ricas em nutrientes. Ademais, vermicompostos são uma fonte rica de diversidade microbiana, especialmente de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*Plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR). Dentre as PGPR, bactérias do gênero *Stenotrophomonas* têm demonstrado características de interesse biotecnológico para biocontrole de fitopatógenos, bioremediação e bioestimulação. Nosso grupo de pesquisa isolou e sequenciou o genoma de diversas bactérias isoladas de vermicompostos com potencial para promoção do crescimento vegetal, incluindo três isolados de *Stenotrophomonas* sp. (UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII). A análise genômica e identificação destes isolados é o tema deste trabalho. Os dados brutos do sequenciamento (*reads*) foram montados com os programas SPAdes e GFINISHER, resultando em drafts genômicos de alta qualidade. Genes foram preditos com o programa PROKKA. Foi realizada extensa curadoria manual para localização de genes envolvidos com a promoção do crescimento vegetal e de interesse biotecnológico. Testes *in vitro* foram realizados para verificação do potencial para biorremediação e biocontrole. As análises de pangenoma e filogenia foram realizadas utilizando BPGA e RAxML, respectivamente. O resistoma foi predito utilizando a base de dados CARD. Os isolados apresentaram genes envolvidos em processos de biocontrole; resistência a metais pesados; biossíntese de espermidina e auxina (via do indol-3-piruvato, IPA); fosfatases; e genes envolvidos com a colonização em plantas. Nossas análises revelaram que os isolados pertencem a subgrupos diferentes da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* e possuem resistência antimicrobiana restrita. Em resumo, os isolados UENF apresentam importantes características genômicas para futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Genômica; Biotecnologia; PGPR.

ABSTRACT

The continuous increase in the world's population and the use of intensive agricultural practices are directly associated with the use of large quantities of chemical fertilizers and environmental pollution. In order to mitigate these negative effects, sustainable soil management is required. One of the main sustainable approaches is vermicomposting, a biotransformation process mediated by microorganisms and earthworms to produce substances rich in nutrients. Vermicomposts are rich sources of microbial diversity, including plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Among PGPRs, bacteria of the genus *Stenotrophomonas* have biotechnological properties, such as: phytopathogen biocontrol, bioremediation and biostimulation. Our research group isolated and sequenced the genome of several bacteria isolated from vermicompost with potential to promote plant growth, including three isolates of *Stenotrophomonas* sp. (UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII). The genome analysis and identification of these three isolates is the subject of this work. Reads were assembled using SPAdes and GFINISHER, resulting in highly contiguous and well-assembled genomes. Then gene prediction was carried out using PROKKA. Through extensive manual curation, we mined genes involved in plant growth promotion and biotechnological applications. *In vitro* tests were performed to verify the potential for bioremediation and biocontrol. Pan-genome and phylogenetic analysis were performed using BPGA and RAxML, respectively. Resistome analyses were performed using CARD database. UENF isolates presented genes involved in: biocontrol processes, heavy metal resistance, spermidine and auxin (indole-3-pyruvate (IPA) pathway) biosynthesis, phosphatases, and genes involved in plant colonization. Our phylogenetic analysis revealed that the isolates belong to different subgroups within *Stenotrophomonas maltophilia* and have restricted antimicrobial resistance. Overall, UENF isolates have important genomic characteristics for future biotechnological applications.

Keywords: Genomic; Biotechnology; PGPR

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxa do crescimento populacional mundial e do consumo de fertilizantes químicos com projeções para 2050.	13
Figura 2. Esquema da rizosfera e suas subdivisões.	15
Figura 3. Principais vias de biossíntese de auxina dependentes de triptofano descritas em bactérias.....	18
Figura 4. Transporte de Fe dependente de TonB em bactérias Gram-negativas.	21
Figura 5. Número de genomas procariotos submetidos no Genbank em relação ao custo de sequenciamento por genoma.	29
Figura 6. Fórmula de cobertura estimada do genoma sequenciado.	34
Figura 7. Avaliação de qualidade dos reads forward e reverse após etapa de trimming.	41
Figura 8. Resultado da Avaliação do BUSCO.....	43
Figura 9. Representação circular dos genomas UENF e a distribuição dos genes relacionados a processos de interesse biotecnológico.	45
Figura 10. Quantidade de genes envolvidos na promoção do crescimento de plantas, biocontrole de fitopatógenos e resistência a metais tóxicos para cada genoma UENF.	46
Figura 11. Apresentação gráfica da via alternativa de biossíntese de espermidina presente nos isolados UENF.....	47
Figura 12. Análise de tolerância à Cr6+.	50
Figura 13. Operon relacionado à biossíntese de sideróforo localizado nos isolados UENF.	51
Figura 14. Ensaio de inibição de duas espécies de fungos pelos isolados UENF.	53
Figura 15. Heatmap ANI calculado entre os 59 genomas <i>Stenotrophomonas</i> sp. mais próximos dos isolados UENF.	57
Figura 16. Gráfico de flor da distribuição do genoma core, acessório e único dos três subgrupos de <i>S. maltophilia</i>	58
Figura 17. Análise do core e pangenoma de três subgrupos de <i>S. maltophilia</i>	59
Figura 18. Árvore de máxima verossimilhança da abordagem cgMLSA representada em (A) filograma e (B) cladograma.	61
Figura 19. Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana e bomba de efluxo sobre a análise de pangenoma.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Relação das espécies que compõem o gênero <i>Stenotrophomonas</i> com base na origem e localização do primeiro organismo isolado.....	24
Tabela 2. Probabilidade de erro por base pelo algoritmo Phred.	30
Tabela 3. Origem do vermicomposto, identificação e perfil metabólico dos isolados UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII.....	32
Tabela 4. Quantidade de bases e quantidade total dos <i>reads</i> armazenados de cada isolado.....	34
Tabela 5. Métricas das montagens dos genomas UENF obtidas após finalização pelo GFinisher.....	42
Tabela 6. Anotação geral dos genomas UENF a partir do PROKKA.	43
Tabela 7. Anotação funcional dos genomas UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII pelo EggNOG.....	44
Tabela 8. Estirpes do gênero <i>Stenotrophomonas</i> com valores de ANI acima de 95% para cada isolado UENF.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	- ATP-binding cassette superfamily (superfamília de ligação ATP)
ADB	- ágar dextrose batata
AIA	- ácido indol acético
ANI	- average nucleotide identity (identidade média de nucleotídeos)
CARD	- comprehensive antibiotic resistance database (banco de dados de resistência aos antibióticos)
CDS	- coding Sequencing (codificantes de proteínas)
COG	- clusters of orthologous groups (cluster de grupos ortólogos)
CSM	- complexo <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
DDT	- diclorodifeniltricloroetano
DO	- densidade óptica
FBN	- fixação biológica de nitrogênio
HGT	- horizontal gene transfer (transferência horizontal de genes)
IAM	- via do indol-3-acetamida
IAN	- via do indol-3-acetonitrila
IPA	- via do indol-3-piruvato
MFS	- major facilitator superfamily (superfamília de facilitadores principais)
MIC	- minimal inhibitory concentration (concentração mínima inibitória)
ML	- maximum likelihood (máxima verossimilhança)
MLSA	- multi-locus sequence analysis (análises de sequência multilocus)
NAG	- n-acetilglicosamina
NGS	- next generation sequencing (sequenciamento de nova geração)
NRPS	- non-ribosomal peptide synthetases (sintetases peptídicas não-ribossomais)
ORF	- open reading frames (fase aberta de leitura)
PGAP	- prokaryotic genome annotation Pipeline (pipeline para anotação de genomas procarióticos)
PGPR	- plant growth promoting rhizobacteria (bactéria promotora do crescimento de plantas)
RND	- resistência-nodulação-divisão
SM	- <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SMR	- small multidrug resistance family (Pequena família de resistência a múltiplas drogas)
TAM	- via da triptamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A Revolução Verde e os desafios para agricultura sustentável	12
1.2. Tecnologias de compostagem e vermicompostagem	14
1.3. Rizobactérias	15
1.3.1. Produção de hormônios vegetais	17
1.3.2. Mineralização de fosfato orgânico	18
1.3.3. Quitinases	19
1.3.4. Sideróforos	20
1.4. Bactérias biorremediadoras do solo	22
1.5. O gênero <i>Stenotrophomonas</i>	23
1.5.1. O potencial biotecnológico de <i>S. maltophilia</i>	25
1.5.2. Genômica de <i>Stenotrophomonas</i>	26
1.6. Sequenciamento genômico	28
1.7. Montagem de genomas	29
1.8. Predição gênica e anotação funcional	31
1.9. Isolados UENF	32
2. OBJETIVO	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Isolados e dados brutos de sequenciamento	34
3.2. Avaliação de qualidade e tratamento dos <i>reads</i>	34
3.3. Montagem <i>de novo</i> e finalização dos genomas	35
3.3.1. Avaliação da montagem	35
3.4. Anotação dos genomas UENF	35
3.5. Análises de similaridade genômicas	36
3.6. Pangenoma	36
3.7. Filogenia MLSA do <i>core</i> genoma (cgMLSA)	37
3.8. Resistoma	37
3.9. Testes <i>in vitro</i>	38

3.9.1. Fixação de nitrogênio.....	38
3.9.2. Solubilização de Fosfato de Cálcio	38
3.9.3. Interação fungo-bactéria	39
3.9.4. Crescimento bacteriano na presença de Cromo	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Análise de qualidade dos <i>reads</i>	40
4.2. Montagem <i>de novo</i> e avaliação dos genomas.....	41
4.3. Predição e anotação automática dos genes	43
4.4. Análise manual dos genes	45
4.4.1. Genes relacionados à biossíntese de auxinas	46
4.4.2. Genes relacionados à biossíntese de espermidina.....	47
4.4.3. Genes relacionados à mineralização de fosfato orgânico.....	48
4.4.4. Resistência a metais em <i>Stenotrophomonas</i>	49
4.4.5. Biocontrole de fitopatógenos.....	51
4.4.6. Interação bactéria-planta e colonização.....	53
4.5. Similaridade genômica.....	54
4.6. Análise de pangenoma	57
4.7. Análise filogenética <i>cgMLSA</i>	60
4.8. Resistoma	62
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Revolução Verde e os desafios para agricultura sustentável

A década de 1960 foi um período de preocupação em relação à capacidade do mundo de lidar com o equilíbrio entre crescimento populacional e a produção de alimentos, particularmente, nos países em desenvolvimento. Em diversos países, grande parte das terras disponíveis para a agricultura já se encontravam cultivadas, enquanto as taxas de crescimento populacional aceleravam devido à rápida diminuição das taxas de mortalidade resultantes dos avanços da medicina moderna e dos cuidados com a saúde (García-Fraile *et al.*, 2017). Este complexo cenário foi remediado com o aumento acentuado da produtividade de grãos de cereais em muitos países em desenvolvimento, que começou no final da década de 1960 através de um fenômeno que ficou posteriormente conhecido como “Revolução Verde” (McArthur e McCord, 2017).

A Revolução Verde teve um grande impacto na produção de alimentos, nas condições socioeconômicas e na sustentabilidade ambiental (Pingali, 2012). Este impacto deu-se, em grande parte, pelo desenvolvimento de cultivares de alto rendimento, pela mecanização das lavouras e pela distribuição em massa de fertilizantes e pesticidas sintéticos aos agricultores (Jain, 2010). A adoção massiva de fertilizantes sintéticos mudou consideravelmente as práticas agrícolas em virtude da alta produtividade conferida pelos nutrientes disponibilizados por tais insumos (Lu e Tian, 2017). No entanto, o uso contínuo e indiscriminado de fertilizantes químicos, especialmente, nitrogenados e fosfatados, resultou em graves danos ambientais. Como por exemplo, cita-se: a poluição atmosférica pela emissão de gases de efeito estufa (p. ex. óxido nitroso), contaminação de lençóis freáticos e eutrofização de ecossistemas aquáticos através da lixiviação, e escoamento destes produtos, além de condicionar a acidificação do solo, ocasionando alteração da biodiversidade de microrganismos e redução da produtividade (Gupta *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2006). O pacote tecnológico da Revolução Verde tornou a agricultura moderna extremamente dependente do uso de fertilizantes e agrotóxicos (Bodirsky *et al.*, 2014). Além de onerosa, a produção de fertilizantes químicos consome recursos não-renováveis como o petróleo e o gás natural, além de impor riscos para o homem e para o ambiente.

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU) estima-se que a população mundial atingirá 9,8 bilhões em 2050 (United Nations, 2017), aumentando a demanda por alimentos. Juntamente com o crescimento populacional, as projeções mostram que o uso de fertilizantes químicos também tende a se elevar (Figura 1), trazendo preocupações sobre o impacto ambiental destes insumos. Tendo em vista as consequências causadas pela Revolução Verde, estas estimativas colocam uma grande pressão no atual sistema agrícola no sentido do desenvolvimento de práticas agroecológicas sustentáveis e economicamente satisfatórias (Bodirsky *et al.*, 2015).

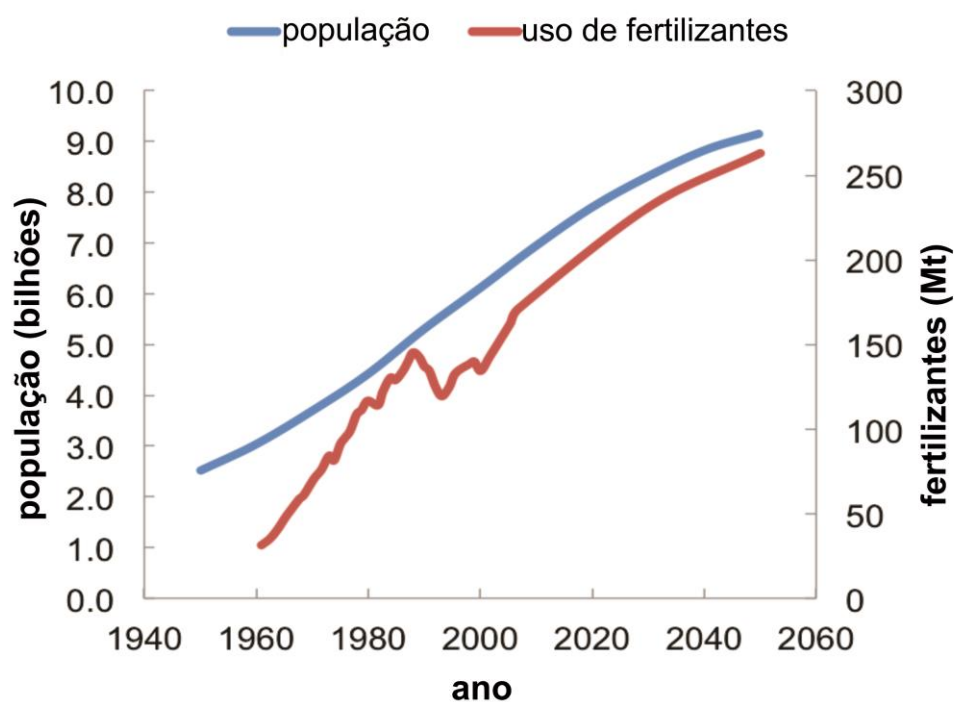


Figura 1. Taxa do crescimento populacional mundial e do consumo de fertilizantes químicos com projeções para 2050. Adaptado de Alexandratos e Bruinsma (2012).

Dentre as técnicas envolvidas na agricultura sustentável com impacto ambiental reduzido, a utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal (Kumar, 2016) e o uso de insumos orgânicos provenientes de compostagem e vermicompostagem têm se destacado cada vez mais, tornando-se um grande atrativo alternativo à agricultura convencional (Chattopadhyay, 2012; Guo *et al.*, 2015).

1.2. Tecnologias de compostagem e vermicompostagem

A produção diária de grandes quantidades de resíduos sólidos orgânicos de origem urbana, industrial e agrícola ocasiona sérios problemas de descarte, poluição ambiental e possíveis riscos à saúde (Hashemimajd *et al.*, 2004). Ademais, a aplicação direta de resíduos orgânicos no solo pode ter efeitos negativos sobre a fertilidade do solo e causar toxicidade às plantas (Lim *et al.*, 2016; Polprasert, 2007). Dessa forma, uma solução para o aproveitamento correto dos resíduos orgânicos está na conversão destes em compostos, que podem ser usados como condicionadores do solo e/ou fertilizantes orgânicos, por processos de compostagem e vermicompostagem (Dadhich *et al.*, 2012; Külcü e Yaldiz, 2014).

O processo de compostagem consiste na degradação termófila e aeróbica da matéria orgânica por microrganismos, efetuada em duas fases: a primeira quando ocorrem as reações bioquímicas predominantemente termofílicas e; a segunda, ou fase de maturação, quando ocorre o processo de humificação. Durante a compostagem pode-se identificar quatro fases distintas quanto à temperatura: fase mesofílica, com temperaturas moderadas, até cerca de 40 °C, que tem duração média de dois a cinco dias; fase termofílica, quando o material atinge sua temperatura acima de 40 °C e é degradado mais rapidamente, além de poder eliminar os patógenos à temperaturas acima de 55 °C (Lim *et al.*, 2016). Esta fase pode durar de poucos dias a vários meses, dependendo das características do material compostado; fase de resfriamento, que é marcada pela queda da temperatura para valores de temperatura ambiente e, finalmente; a fase de maturação, que é um período de estabilização, também em temperatura ambiente, e que resulta em um composto maturado, estável, altamente humificado e livre de patógenos (Lim *et al.*, 2016; MacGregor *et al.*, 1981).

O processo de vermicompostagem se inicia após a maturação do composto com participação das minhocas, que aceleram a decomposição e produzem insumos orgânicos estabilizados de alta qualidade, conhecidos como vermicomposto. Neste processo, a matéria orgânica é rapidamente ingerida por minhocas e decomposta em um substrato rico em Nitrogênio (N), Fósforo (P), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Potássio (K), elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas (Chattopadhyay, 2012). A vermicompostagem acelera a produção da matéria orgânica

humificada devido à ação de enzimas e microrganismos presentes no tubo digestivo das minhocas, além de alterar a abundância relativa dos microrganismos presentes no substrato compostado (Chen *et al.*, 2015).

Vermicompostos são considerados uma fonte segura, barata e rica de microrganismos e nutrientes benéficos para as plantas (Hashemimajd *et al.*, 2004). Os insumos orgânicos provenientes de vermicompostagem podem influenciar significativamente o crescimento e a produtividade de plantas (Sinha *et al.*, 2009). Vermicompostos também podem conter bactérias benéficas que produzem reguladores do crescimento vegetal e que possuam competência para biorremediação, podendo ser utilizadas como estratégia para descontaminar solos, enriquecer substratos e impulsionar o desenvolvimento das plantas (biofortificação de substrato) (Busato *et al.*, 2012; Busato *et al.*, 2017).

1.3. Rizobactérias

As plantas interagem com uma complexa comunidade de microrganismos, denominada microbioma vegetal. Este grupo de microrganismo possui caráter variável de acordo com o micro-habitat (Imam *et al.*, 2017). No que tange o interesse agrônomo, um dos sítios mais relevantes de microbioma vegetal é a rizosfera (Figura 2).

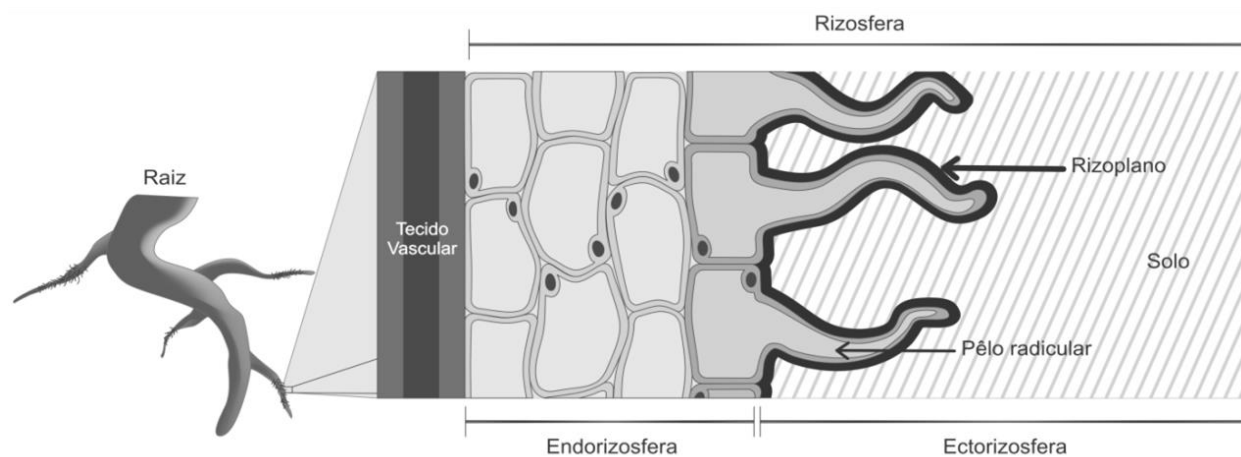


Figura 2. Esquema da rizosfera e suas subdivisões. Microrganismos podem colonizar o solo diretamente (ectorizosfera), se aderir à superfície da raiz (rizoplano, indicado por contorno espesso em preto) ou ocupar espaços vazios em porções do córtex e da endoderme (endorizosfera). Adaptado de McNear Jr. (2013).

A rizosfera é considerada o principal reservatório de microrganismos que interagem com plantas, sendo descrito como um dos ecossistemas mais biodiversos existentes (Umesha *et al.*, 2018). Comparada com outras regiões do solo, a rizosfera é uma região abundante em nutrientes, particularmente, devido ao acúmulo de uma variedade de exsudatos de plantas que são ricos em aminoácidos e açúcares que são usados pelos microrganismos (McNear-Jr, 2013). Por consequência, o número de microrganismos na rizosfera é geralmente de 10 a 100 vezes maior do que outras regiões do solo (Beneduzi *et al.*, 2012).

Bactérias que colonizam a rizosfera são chamadas de rizobactérias e podem ser classificadas em grupos benéficos, deletérios e neutros, com base em seus efeitos sobre o crescimento das plantas (McNear-Jr, 2013). As rizobactérias benéficas são referidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*; PGPR) e constituem um grupo filogeneticamente heterogêneo de microrganismos distribuídos entre proteobactérias, incluindo espécies dos gêneros: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* (Gouda *et al.*, 2017; Kakar *et al.*, 2018).

De acordo com o sítio colonizado nas plantas, as PGPR também podem ser classificadas em dois grupos: iPGPR (intracelular), que vivem dentro das células das plantas (endorizosfera) e estão localizadas dentro de estruturas especializadas (nódulos); e ePGPR (extracelular), que não produzem nódulos, mas estimulam o crescimento vegetal. As ePGPR podem ser subdivididas ainda em três tipos, baseado no grau de associação com as raízes das plantas: (1) aquelas que vivem perto, mas não em contato com as raízes; (2) as que colonizam a superfície da raiz; (3) e aquelas que vivem nos espaços intercelulares (Gray e Smith, 2005).

PGPRs podem desempenhar mecanismos diretos e indiretos na promoção do crescimento de plantas, enquanto se beneficiam de exsudatos radiculares (Bais *et al.*, 2006; Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Neste sentido, a promoção direta do crescimento vegetal ocorre quando a bactéria facilita a aquisição de nutrientes essenciais ou modula os níveis de hormônios dentro da planta, o que pode variar de acordo com a

cepa bacteriana e as espécies vegetais (Gouda *et al.*, 2017). Dentre estes mecanismos, destacam-se: a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (Glick, 2012), a solubilização de fosfato (Ahemad e Khan, 2012) e a produção de fitormônios (Duca *et al.*, 2014). Os mecanismos indiretos para promoção do crescimento vegetal ocorrem por processos através dos quais as PGPRs mitigam os efeitos de estresses bióticos (causados por fitopatógenos) e abióticos, como o estresse salino e o causado pelo excesso de metais (Habib *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017). Especificamente, no que tange a atividade antifúngica, várias PGPRs produzem enzimas hidrolíticas como quitinases, celulases e proteases (Kumar *et al.*, 2012; Mubarik *et al.*, 2010); antibióticos (Haas e Défago, 2005), sideróforos (Radzki *et al.*, 2013) e compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Tahir *et al.*, 2017). Alguns destes mecanismos serão melhor descritos a seguir.

1.3.1. Produção de hormônios vegetais

Bactérias associadas às plantas (benéficas ou fitopatogênicas) têm sido relacionadas cada vez mais com a habilidade de produzir diversos tipos de hormônios vegetais, dentre eles: giberelinas, citocininas e auxinas, como estratégia para modular o desenvolvimento e crescimento vegetal (Sureshbabu *et al.*, 2016). Muitos estudos têm evidenciado a capacidade das PGPRs sintetizarem auxinas, particularmente, ácido indolacético (AIA); sendo este fitormônio conhecido por atuar em processos cruciais ao desenvolvimento vegetal como na divisão e expansão celular (Taiz e Zeiger, 2010). Além disto, a produção de AIA bacteriana na rizosfera promove o enraizamento lateral e primário através do estímulo radicular.

O AIA pode ser sintetizado por bactérias em diferentes vias dependentes de triptofano (Figura 3), são elas: a via do indol-3-acetoamida (IAM), triptamina (TAM/TRM), indol-3-acetonitrila (IAN), via de oxidação das cadeias laterais de triptofano (TSO, *tryptophanside-chain oxidase*) e via do indol-3-piruvato (IPA), sendo este o melhor caracterizado (Duca *et al.*, 2014). Na via do IPA, o triptofano é convertido por uma transaminase (gene *lao*) em IPA, posteriormente descarboxilado em indol-3-acetaldeído (IAAId) pela enzima central da via, a indol-3-piruvato descarboxilase, que é codificada pelo gene *ipdC*. Então, o IAAId é oxidado em AIA por uma desidrogenase codificada pelo gene *y4wF* (Imada *et al.*, 2017).

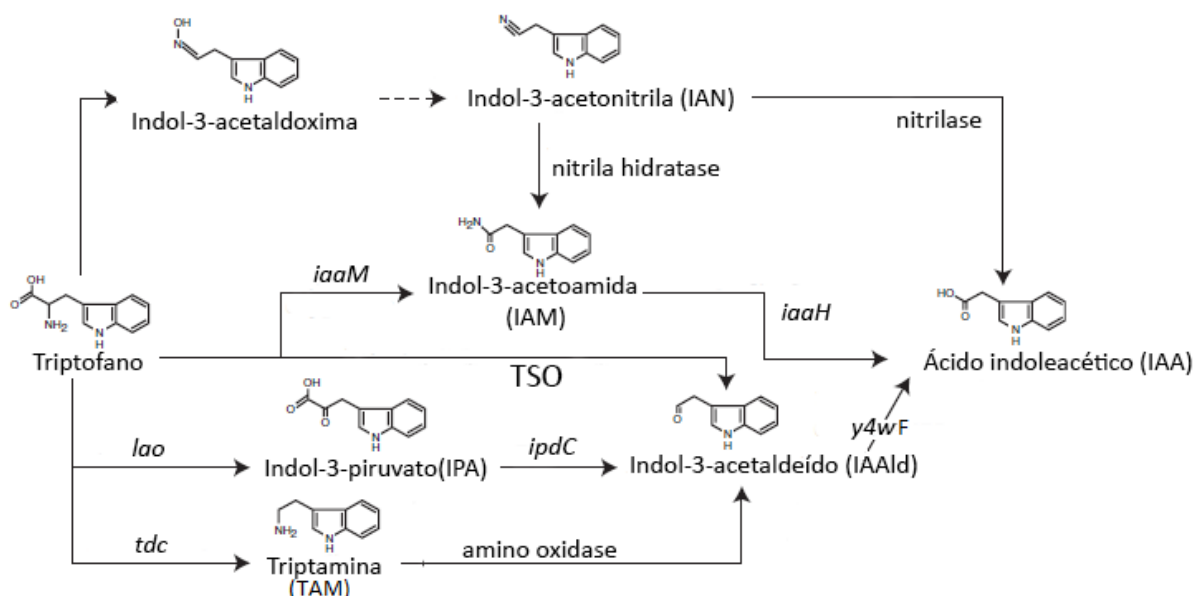


Figura 3. Principais vias de biossíntese de auxina dependentes de triptofano descritas em bactérias. Os genes conhecidos envolvidos em cada via estão destacados em itálico. Adaptado de Spaepen *et al.* (2011).

Na via do IAM, o triptofano é convertido em IAM, que é hidrolisado por *IaaH* em IAA. Na via do IAN, o triptofano é convertido em indol-3-acetaldoxima, posteriormente convertido em IAN. O IAN pode então ser desnitrificado em AIA por nitrilase ou ser convertido em IAM pela enzima nitrila hidratase. Na via do TAM, o triptofano é descarboxilado em triptamina, que é convertida em IAAld por uma amino oxidase. Na TSO, o triptofano é convertido diretamente em IAAld. A partir do IAAld, as vias TAM e TSO compartilham o mesmo caminho metabólico que IPA (Spaepen e Vanderleyden, 2011; Spaepen *et al.*, 2007).

1.3.2. Mineralização de fosfato orgânico

Considerado um macronutriente essencial ao crescimento vegetal, o fósforo participa do metabolismo energético e da biossíntese de biomembranas e ácidos nucleicos. Embora abundante no solo em formas orgânicas e inorgânicas, a maior parte deste nutriente encontra-se indisponível em decorrência de sua insolubilidade (Sharma *et al.*, 2013).

O fosfato orgânico (ou seja, a molécula de fosfato ligado a um grupo orgânico) constitui uma fração relevante (30-50%) do total de P no solo e desempenha um importante papel no ciclo do fósforo nos solos agrícolas. Dentre os vários tipos

diferentes encontrados, a forma predominante de fosfato orgânico é o fitato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$), que constitui de 10 a 35% de todo fosfato orgânico presente no solo, podendo variar significativamente a concentração de acordo com o tipo e com a forma de utilização solo. Porém, o fitato encontra-se fortemente ligado à fase sólida do solo, sendo de difícil assimilação pelas plantas (Mukhametzyanova *et al.*, 2012).

PGPRs são capazes de mineralizar fosfato orgânico por meio de interações com resíduos vegetais, animais e microbianos, disponibilizando este nutriente para plantas associadas. A mineralização é catalisada por fosfatases, fosfonatases e fitases (Rodríguez *et al.*, 2006). As fosfatases são secretadas como proteínas periplasmáticas solúveis ou ancoradas à membrana, classificadas como ácidas ou alcalinas, dependendo do seu pH ótimo. São formadas pelas classes moleculares A (gene *phoC*), B (gene *napA*) e C (gene *olpA*) (Behera *et al.*, 2014). Estas enzimas hidrolisam as ligações orgânicas de fosfoéster e fosfoanidrido, liberando fosfato inorgânico de nucleotídeos e fosfato de açúcar, por exemplo, enquanto os subprodutos orgânicos são incorporados pelo microrganismo (Gandhi e Chandra, 2012).

As fosfonatases (genes *phn*) disponibilizam fosfato através de hidrólise da ligação C-P de organofosfonatos, que na maioria das condições não estão entre as principais fontes de fosfato inorgânico (Rodríguez *et al.*, 2006). As fitases (genes *phy*) são enzimas sintetizadas por vários organismos, inclusive algumas espécies de plantas. Estas enzimas hidrolisam o anel inositol do fitato, podendo ser classificadas em três tipos: 3-fitases (a mais comum em bactérias), 4-/6-fitases e 5-fitases; com base na posição de especificidade da hidrólise inicial do fitato (Jorquera *et al.*, 2008).

1.3.3. Quitinases

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, depois da celulose (Suma e Podile, 2013). Estruturalmente rígido, este polímero é formado por unidades de N-acetilglucosamina (NAG) ligadas por ligações glicosídicas β -1,4. A quitina pode ser categorizada em três tipos: α -quitina, β -quitina e γ -quitina. A α -quitina é o tipo mais abundante, com estruturas cristalinas e compactas encontradas no exoesqueleto de insetos e na parede celular da maioria dos fungos (Deeba *et al.*, 2016).

Diversas bactérias do solo, inclusive PGPRs, degradam quitina através da produção de quitinases, utilizando os subprodutos como fonte de carbono (Beier e

Bertilsson, 2013). Na rizosfera, este mecanismo pode atuar no biocontrole de fungos, principalmente fitopatogênicos, auxiliando indiretamente no crescimento vegetal.

As quitinases se diferem em exo e endo-quitinases. Endo-quitinases quebram as ligações glicosídicas em pontos internos aleatórios, gerando unidades multiméricas menores, compostas de NAG (p. ex. quitotriose). As exo-quitinases dividem-se ainda em duas subcategorias que atacam as terminações da quitina: quitobiosidases e β -(1,4)-N-acetilglucosaminidases (Bibra *et al.*, 2017). Com base na sequência de aminoácidos, as enzimas quitinolíticas são ainda classificadas em 3 famílias principais de glicosil-hidrolases (18, 19 e 20). As quitinases bacterianas melhor caracterizadas pertencem à família glicosil-hidrolase 18, classificadas nas subfamílias A (gene *chiA*), B (gene *chiB*), C (gene *chiC*) e D (gene *chiD*), determinadas com base na conservação de domínios proteicos (Vaikuntapu *et al.*, 2016).

1.3.4. Sideróforos

Embora seja um dos minerais mais abundantes na Terra, o ferro encontra-se relativamente indisponível (como Fe^{3+}) no solo para a assimilação direta pelos organismos. Para estar disponível, o Fe deve estar na forma Fe^{2+} . Então, muitos microrganismos desenvolveram mecanismos de obtenção do Fe^{3+} por meio da produção de sideróforos, que são ligantes específicos (quelantes) de Fe^{3+} produzidos em condições de deficiência deste íon por fungos e bactérias (Behnsen e Raffatellu, 2016). A maioria dos sideróforos bacterianos são catecolatos (p. ex. enterobactina, genes *ent*). Outros sideróforos conhecidos são carboxilatos (p. ex. rizobactina, genes *rhb*) e hidroxamatos (p. ex. ferricromo, gene *fhuA*). Existem também certos tipos de sideróforos bacterianos que contêm uma mistura dos principais grupos funcionais, como por exemplo, a Pioverdina (genes *pvd*) (Cornelis, 2010).

Os sistemas de transporte de Fe variam entre bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas possuem diversos tipos de receptores de membrana externa dependentes de TonB, uma proteína envolvida na transporte ativo de sideróforos, que reconhecem os complexos de isômeros de Fe^{3+} na superfície celular (Ahmed e Holmström, 2014).

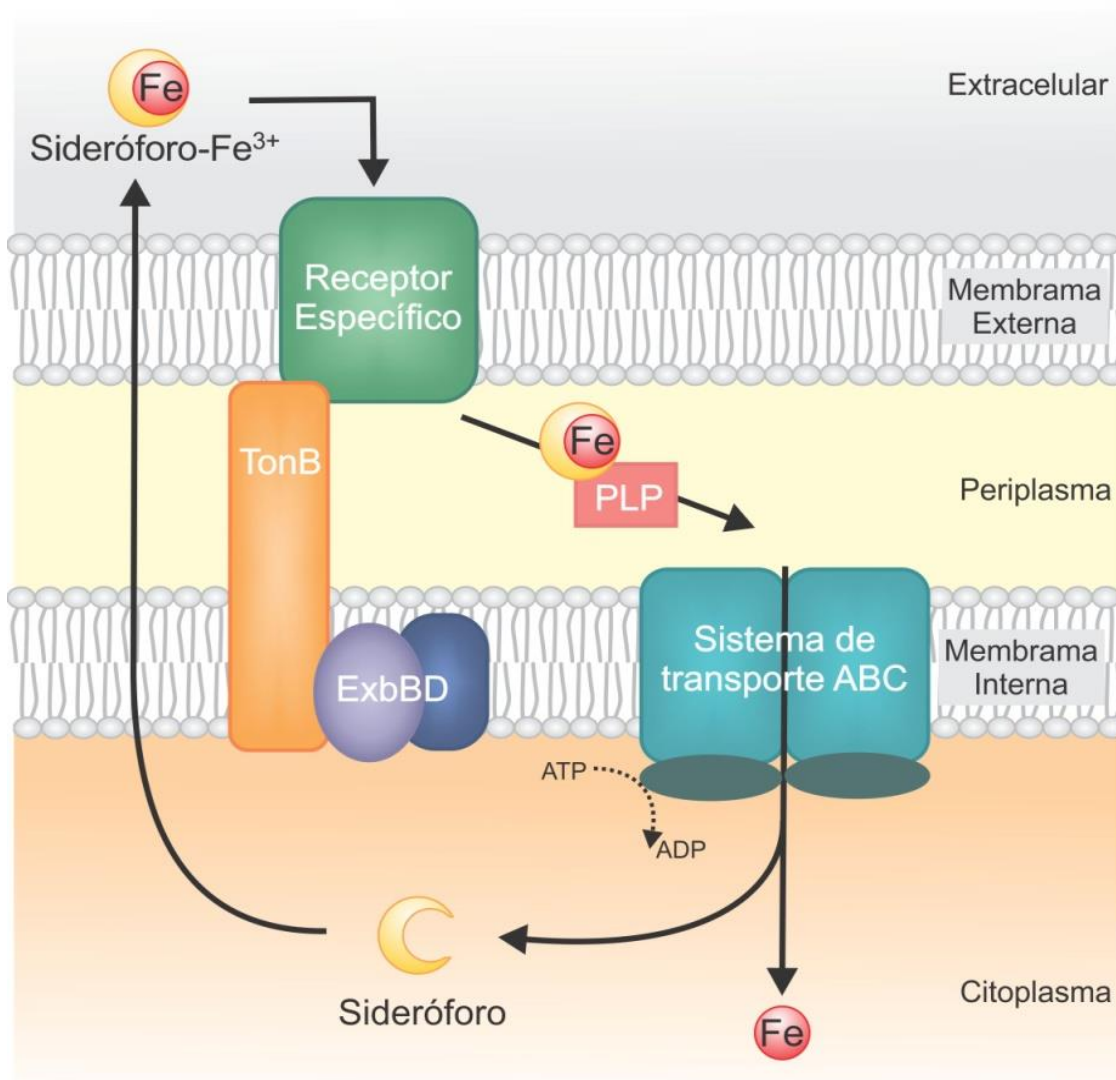


Figura 4. Transporte de Fe dependente de TonB em bactérias Gram-negativas. O complexo Fe-sideróforo é reconhecido pelo receptor específico na membrana externa. O transporte através da membrana externa depende da energia fornecida pelo complexo TonB. O transporte de sideróforos férricos através da membrana interna requer uma proteína de ligação periplasmática (PLP) e um transportador ABC. Uma vez que o complexo Fe-sideróforo entra no citoplasma, o íon férrico (Fe^{3+}) é reduzido ao íon ferroso (Fe^{2+}) e destinado ao armazenamento ou incorporação em enzimas. O sideróforo fica disponível para uma nova interação. Adaptado de Noinaj *et al.* (2010).

No meio ambiente a ligação Fe-sideróforo impede a proliferação de patógenos, devido ao sequestro deste íon. Exemplos de ePGPRs com esta atividade incluem *Pseudomonas fluorescens* e *S. maltophilia*. Estudos mostraram que a captação de Fe por *P. fluorescens* inibiu o crescimento do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Arya *et*

al., 2018), enquanto *S. maltophilia* inibiu o crescimento de *Ralstonia solanacearum*, um fungo patogênico da batata (Messiha *et al.*, 2007). Ao contrário dos fitopatógenos, as plantas não são prejudicadas com a depleção de Fe pelas ePGPRs, sendo que algumas delas internalizam o complexo, posteriormente liberando o Fe do sideróforo e usando como micronutriente (Crowley, 2006).

1.4. Bactérias biorremediadoras do solo

Um dos problemas ambientais causados pela indústria e pela agricultura moderna é o aumento da concentração de metais no solo. A liberação indiscriminada de metais nos ecossistemas é uma das principais preocupações de saúde em todo o mundo, já que eles não podem ser decompostos em formas não-tóxicas e têm efeitos duradouros no ecossistema (Ali *et al.*, 2013). Muitos metais são tóxicos para diversos organismos mesmo em concentrações muito baixas como o Arsênico (As), Cádmiio (Cd), Cromo (Cr), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni) e Selênio (Se). Outros, como Cobalto (Co), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), são micronutrientes essenciais para as plantas e microrganismos, mas se tornam tóxicos em quantidades maiores (Dixit *et al.*, 2015).

O acúmulo de metais tóxicos pode afetar adversamente o funcionamento biológico do solo, além de outras propriedades, levando à redução de fertilidade. Sendo assim, a remoção de metais tóxicos de ecossistemas (remediação) torna-se um processo crucial. Uma alternativa aos métodos de remoção desses poluentes é o uso de microrganismos benéficos, que podem atuar como biorremediadores na composição de biofiltros, compostagem e fitorremediação.

A fitorremediação é uma técnica biológica promissora que utiliza plantas com capacidade de acumular metais tóxicos para remover estes poluentes do solo, o que pode ser potencializado com o uso de PGPRs (Ullah *et al.*, 2015). Para compor o processo de fitorremediação, além de proporcionar o crescimento das plantas, é necessário que as PGPRs sobrevivam na presença de metais tóxicos por meio de diferentes estratégias como o efluxo de metais tóxicos, desintoxicação enzimática e bioacumulação (Glick, 2010).

Os mecanismos de efluxo conferem tolerância à bactéria a metais tóxicos através de bombas de efluxo de metais como, por exemplo: Cd, Co, Zn (genes *czc*) e

Ni (genes *cnr*, *ncc*)(Intorne *et al.*, 2012; Nies, 2003). A desintoxicação enzimática ocorre pela produção de enzimas redutoras de metais tóxicos, localizadas no espaço intracelular que catalisam a conversão do metal tóxico para formas com toxicidade reduzida. Dentre as enzimas produzidas pelas bactérias, as mais conhecidas são: cromato redutase (codificada pelo gene *chrR*), responsável pela oxidação de Cromo hexavalente (Cr^{6+}) para forma menos tóxica, o óxido de cromo (Cr^{3+}) (Thatoi *et al.*, 2014) e; a mercúrio redutase (gene *merA*), que reduz o óxido de mercúrio (Hg^{2+}) para forma volátil e menos tóxica (Hg^0) (Giovanella *et al.*, 2016). O mecanismo de bioacumulação extracelular proporciona a resistência de bactérias através de processos que envolvem o sequestro de metais tóxicos pelos exopolissacarídeos constituinte do biofilme, protegendo a comunidade bacteriana e a planta dos efeitos nocivos dos metais tóxicos (Hou *et al.*, 2013).

Diversas bactérias incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* têm sido descritos como candidatos promissores para atuar nos processos de biorremediação e fitorremediação devido à dualidade de características apresentadas para promoção do crescimento vegetal e resistência a metais tóxicos (Das e Dash, 2014).

1.5. O gênero *Stenotrophomonas*

Stenotrophomonas é um gênero composto por bactérias bacilares, flageladas, Gram-negativas, aeróbicas, não fermentadoras e não esporuladas. Foi primeiramente descrito por Palleroni e Bradbury (1993) com objetivo de acomodar linhagens da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, anteriormente conhecida como *Pseudomonas maltophilia* (Hugh e Ryschenkow, 1961) e posteriormente por *Xanthomonas maltophilia* (Swings *et al.*, 1983). Para os autores, *S. maltophilia* era nutricionalmente menos versátil que as demais espécies aeróbicas de *Xanthomonas*, desta forma, foi proposto o nome *Stenotrophomonas* (do grego: ‘stenos’ limitado; ‘trophus’ o que se alimenta e ‘monas’ um, unidade; p. ex., unidade que se alimenta de poucos substratos). Posteriormente, vários estudos demonstraram que o gênero detém uma grande versatilidade metabólica e heterogeneidade específica (Ryan *et al.*, 2009).

O gênero pertence à classe de Gammaproteobacteria e está incluso na família Xanthomonadaceae, juntamente com os gêneros *Xanthomonas* e *Xylella*. Os membros

dessa família são tipicamente caracterizados como ambientais, com exceção da espécie *S. maltophilia*, que tem algumas cepas relatadas como patógenos oportunistas em humanos (Assis *et al.*, 2017). Além disto, em contraste com gêneros filogeneticamente relacionados (*Xanthomonas* e *Xylella*), nenhuma espécie de *Stenotrophomonas* foi relatada como fitopatogênica (Ryan *et al.*, 2009).

Stenotrophomonas são ubíquas, com maior prevalência no solo e em associação com plantas, incluindo gramíneas de importância econômica como arroz, milho, trigo e cana-de-açúcar. Assim como outros microrganismos pertencentes nos gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*, as *Stenotrophomonas* são abundantes nas raízes e pode apresentar-se como um dos habitantes dominantes da rizosfera, desempenhando funções importantes como simbiotes (Na *et al.*, 2018; Ryan *et al.*, 2009). Atualmente, o gênero compreende dezesseis espécies descritas, das quais foram originalmente isoladas de ambientes diferentes conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Relação das espécies que compõem o gênero *Stenotrophomonas* com base na origem e localização do primeiro organismo isolado.

Origem	Localização	Espécie	Referência
Solo	Espanha	<i>S. bentonitica</i>	Sánchez-Castro <i>et al.</i> , 2017
	Coréia	<i>S. ginsengisoli</i>	Kim <i>et al.</i> , 2010
	Bélgica	<i>S. humi</i>	Heylen <i>et al.</i> , 2007
	Coréia do Sul	<i>S. panacihumi</i>	Yi <i>et al.</i> , 2010
	Escócia	<i>S. pictorium</i>	Ouattara <i>et al.</i> , 2017
	Bélgica	<i>S. terrae</i>	Heylen <i>et al.</i> , 2007
Planta	Brasil	<i>S. pavanii</i>	Ramos <i>et al.</i> , 2011
	Alemanha	<i>S. rhizophila</i>	Wolf <i>et al.</i> , 2002
Esgoto	México	<i>S. acidaminiphila</i>	Assih <i>et al.</i> , 2002
	Rússia	<i>S. chelatiphaga</i>	Kaparullina <i>et al.</i> , 2009
Máquina industrial	Alemanha	<i>S. indicatrix</i>	Weber <i>et al.</i> , 2018
	Alemanha	<i>S. lactitubi</i>	Weber <i>et al.</i> , 2018
Composto	República da Coréia	<i>S. koreensis</i>	Yang <i>et al.</i> , 2006
Biofiltro	Alemanha	<i>S. nitritireducens</i>	Finkmann <i>et al.</i> 2000
Sarcófago	Japão	<i>S. tumulicola</i>	Handa <i>et al.</i> , 2017
Hospital	Reino Unido	<i>S. maltophilia</i>	Palleroni and Bradbury, 1993

1.5.1. O potencial biotecnológico de *S. maltophilia*

S. maltophilia (SM), é a espécie mais bem estudada do gênero *Stenotrophomonas*, devido sua importância clínica e ambiental. Os isolados desta espécie são geneticamente diversos e formam grupos distintos, fazendo que a espécie seja reconhecida como o complexo *Stenotrophomonas maltophilia* (CSM) (Rhee *et al.*, 2013). Todavia, pouco se saiba sobre a quantidade de grupos no CSM. Caracterizada como uma espécie de baixa virulência e intrinsecamente resistente à múltiplos antibióticos, SM tem emergido como um patógeno oportunista associado a vários casos de óbito decorrente de bacteremias, endocardites e infecções do trato respiratório em pacientes gravemente debilitados, imunodeprimidos ou portadores de doenças pulmonares crônicas (Brooke, 2012).

Cosmopolita e ubíqua, SM pode ser encontrada em diversos habitats, incluindo os extremos. Na natureza, SM é prevalente na rizosfera, onde pode promover o crescimento e desenvolvimento vegetal, produzindo fitormônios (Suckstorff e Berg, 2003) e solubilizando fosfato (Xiao *et al.*, 2009). Já foi demonstrado, por exemplo, que SM aumentou o crescimento de leguminosas em solo altamente salino em mais de 180% (Egamberdieva *et al.*, 2011).

SM foi caracterizada como importante no controle biológico. Li e colaboradores (2015) demonstraram que *S. maltophilia* B418, isolada da rizosfera, inibiu o crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia cerealis* em plântulas de pepino e trigo através da produção de quitinases. Jankiewicz e colaboradores (2012) reportaram a atividade fungicida das quitinases de *S. maltophilia* MUJ em *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Alternaria*; em 2016 o mesmo grupo caracterizou a ação nematicida de *S. maltophilia* N4 através da produção de proteases extracelulares (Jankiewicz *et al.*, 2016). Além da atividade nematicida e antifúngica, um estudo recente reportou o potencial quitinolítico de *S. maltophilia* JF66 no biocontrole de cupins (Jabeen *et al.*, 2018), demonstrando versatilidade de SM em atividades de biocontrole e sugerindo sua potencialidade para a aplicação biotecnológica.

Ademais, SM apresenta envolvimento no ciclo biogeoquímico de Se, N e P. Dungan e colaboradores (2003) relataram a transformação selênio para selenato e selenito por *S. maltophilia*, sugerindo o papel da bactéria no ciclo biogeoquímico deste

nutriente. Um estudo conduzido por Park e colaboradores (2005) nas rizosferas de arroz, milho e trigo, demonstrou que SM apresenta grande potencial para fixação de nitrogênio. Outros estudos demonstraram a capacidade de *S. maltophilia* como competentes mineralizadores de fitato e como biofertilizante (Lim *et al.*, 2007; Piński e Hupert-Kocurek, 2017; Xiao *et al.*, 2009), muito provavelmente pela produção de fitase (Lim *et al.*, 2007).

SM também possui grande potencial para biorremediação de solos contaminados devido à tolerância a metais tóxicos e a capacidade de degradar compostos xenobióticos (Mukherjee e Roy, 2016). No estudo de Rousseaux e colaboradores (2001), SM foi capaz de degradar atrazina, um herbicida amplamente utilizado na agricultura, através da produção de hidrolases, transformando o herbicida em ácido cianúrico. Mukherjee e Roy (2013) relataram a degradação de tricloroetileno, substância tóxica utilizada como solvente industrial, por cepa *S. maltophilia* PM102. Além destas substâncias, SM também demonstrou potencial para degradação de compostos xenobióticos com atividade neurotóxica e cancerígena (p. ex. clorpirifós) por *S. maltophilia* MHF-ENV20 (Dubey e Fulekar, 2012) e diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Pan *et al.*, 2016).

Em relação à remoção de metais tóxicos de ambientes contaminados, Antonioli e colaboradores (2007) observaram o potencial da cepa *S. maltophilia* SeITE02 para remediar ambientes com alta concentração de selênio, através de sua redução em selenito, que é menos tóxico. Estudos recentes também demonstraram o potencial de SM para redução de Cr^{6+} em Cr^{3+} em solo com altas concentrações de Cr, através de mecanismos como a produção de enzimas redutoras deste metal (Raman *et al.*, 2018). SM também demonstrou eficácia na fitorremediação com *Populus trichocarpa* em solo afetado por petróleo. A estirpe R551-3, isolada da rizosfera, demonstrou capacidade de sobrevivência no solo e promoção do crescimento da planta através da produção de fitormônios, juntamente com outras bactérias (Taghavi *et al.*, 2009).

1.5.2. Genômica de *Stenotrophomonas*

O gênero *Stenotrophomonas* atualmente possui mais de 300 genomas depositados no GenBank, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Benson *et al.*, 2015). Dentre todas as espécies do gênero, *S. maltophilia* é a que

detêm a maior quantidade de genomas depositados. O primeiro genoma de *S. maltophilia* K279a (isolado clínico) foi sequenciado em 2008, sendo também o primeiro genoma completo sequenciado do gênero. Este genoma tem 4.851.126 pares de base (pb), com 66,7% de conteúdo de GC (guanina-citosina) e nenhum plasmídeo (Crossman *et al.*, 2008). Além de vários genes de resistência a antibióticos de diferentes classes, o genoma possui 9 sistemas de efluxo da família resistência-nodulação-divisão (RND); sistemas de secreção do tipo I, II, IV e V; um gene específico (*smf-1*) para síntese de fímbria, responsável pela motilidade; e 6 genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos (i.e. *manA*, *manB* e operon *rmBACD*), que são importantes na formação de biofilme (Huang *et al.*, 2006; Oliveira-Garcia *et al.*, 2003).

Estudos comparativos dos genomas de *S. maltophilia* R551-3 (endofítica) com *S. maltophilia* K279a forneceram informações sobre funções que poderiam estar associadas à adaptação a esses diferentes nichos. Aproximadamente 85% dos 4.175 genes de *S. maltophilia* R551-3 apresentaram homólogos em *S. maltophilia* K279a. Além de apresentar maior repertório de genes relacionados à resistência antimicrobiana, *S. maltophilia* K279a contém múltiplas cópias gênicas de enzimas hemolíticas que conferem melhor adaptação em hospedeiros humanos (Ryan *et al.*, 2009). Alavi e colaboradores (2014) demonstraram que o gene *speE*, envolvido na biossíntese de espermidina (poliamina promotora do crescimento vegetal), está presente nas espécies associadas à plantas (p. ex. cepa R551-3) e ausente na cepa K279a. Foram também encontrados genes codificadores de fatores de virulência e do gene de resistência a choque térmico (*hscC*) exclusivamente no isolado clínico.

Em 2011, Zhu e colaboradores publicaram o genoma de *S. maltophilia* RR-10, uma PGPR que vive em associação com o arroz. Este genoma tem 4.660.562 pb, 66,3% de conteúdo GC e um total de 4.292 genes codificadores de proteínas. De acordo com os autores, o genoma de *S. maltophilia* RR-10 apresenta um repertório gênico que capacita a bactéria para colonização epifítica (Zhu *et al.*, 2012).

Posteriormente, o genoma do isolado ambiental, *S. maltophilia* ZBG7B, foi sequenciado e analisado por Chan e colaboradores (2015). Este genoma apresenta 4.065.086 pb, compreendendo vários genes que indicam o potencial biotecnológico para biodegradação e biocontrole por codificarem xilosidades, xilanases, lacases e

quitinases. No mesmo ano, o genoma ambiental da cepa BurA1 com tamanho de 4.366.960 pb, mostrou ausência da bomba RND clássica da espécie (*SmeABC*) e presença de outra bomba de efluxo RND denominada *EbyCAB*, em uma ilha genômica adquirida via transferência gênica horizontal (HGT) (Youenou *et al.*, 2015).

Estudos comparativos com cepas ambientais e clínicas demonstraram que grande parte dos genes de resistência a antibióticos não estão associados a elementos genéticos móveis (p. ex. plasmídeos, fagos e transposons), sugerindo que a resistência de *S. maltophilia* a alguns antibióticos não possui relação com a seleção em ambientes clínicos (Ryan *et al.*, 2009). Em consonância com estas observações, foi ainda verificado que a presença de genes intrínsecos de resistência à quase todos os grupos de antibióticos β -lactâmicos (*blaL1* e *blaL2*) em SM não apresentam traços de HGT; ao contrário, as evidências sugerem que estes genes compartilham um ancestral comum dentro do gênero (Patil *et al.*, 2016). Esta análise só foi possível por conta do avanço no sequenciamento de genomas.

1.6. Sequenciamento genômico

O sequenciamento genômico teve início na década de 70, quando Sanger e colaboradores apresentaram ao mundo o método de sequenciamento de DNA (Sanger *et al.*, 1977), posteriormente, conhecido como integrante da primeira geração de sequenciamento. Porém, devido ao alto custo e metodologias laboriosas, o sequenciamento de larga escala ficou restrito apenas a grandes centros genômicos e a alguns laboratórios (Hall, 2007). As tecnologias de sequenciamento de primeira geração revolucionaram os estudos genéticos e promoveram o sequenciamento do primeiro genoma de um organismo de vida livre, a bactéria *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), do primeiro genoma de planta (TAG, 2000) e do primeiro genoma humano (Lander *et al.*, 2001) através do método de sequenciamento *shotgun*, uma das tecnologias mais importantes na história do sequenciamento genômico completo (Holst-Jensen *et al.*, 2016).

Anos depois, com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova (ou segunda) geração (*Next generation sequencing*; NGS) a partir de 2005, houve um crescimento enorme no número de genomas de procariontes sequenciados (Figura 5) (Tonder *et al.*, 2014). Os métodos de NGS revolucionaram o sequenciamento

genômico através de instrumentos que geram, rapidamente e a custos mais baixos (por base), um número muito maior de leituras (*reads*) por corrida. Dentre os sequenciadores de segunda geração, atualmente, destacam-se o Illumina Hiseq e Miseq. Além destes, temos ainda nos últimos anos a popularização de sequenciadores que geram *reads* longos (maiores que 20 Kb), como PacBio e Minlon (Liu *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2016).

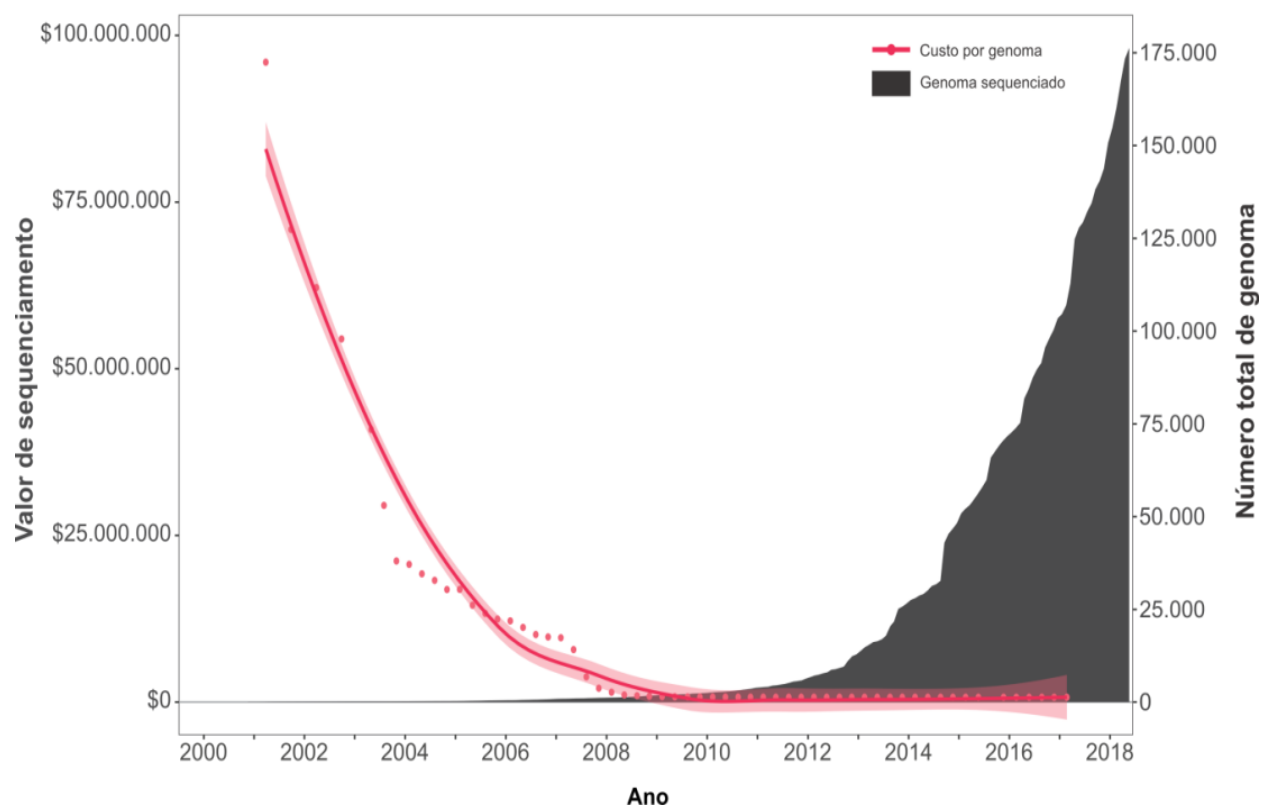


Figura 5. Número de genomas procaríotos submetidos no Genbank em relação ao custo de sequenciamento por genoma. Adaptado de Wetterstrand (2018).

1.7. Montagem de genomas

A montagem de genomas constitui no processo de ordenação e orientação dos *reads* obtidos por sequenciamento NGS (Miller *et al.*, 2010). Os processos de montagem e finalização de genomas a partir de abordagens recentes podem ser divididos em três etapas: análise de dados, montagem *de novo* e finalização (Del-Angel *et al.*, 2018). Antes de se processar montagens é necessário converter os dados do sequenciamento para padrões utilizados pelo programa de montagem (Zerbino, 2010).

O formato FASTQ é comumente utilizado por esses *softwares*, uma vez que o mesmo apresenta as sequências de nucleotídeos com dados sobre a qualidade obtida de cada base. Essa qualidade de base é calculada de acordo com o índice probabilístico do algoritmo *Phred* (Tabela 2), que consistem de um valor logarítmico de probabilidade de erro, onde para a variável Q, a qualidade é P; e para probabilidade de erro temos: $Q = -10 \cdot \log_{10}$ (Ewing *et al.*, 1998). Através de programas como FastQC, é possível visualizar a média de qualidade das bases e assim, avaliar a qualidade obtida do sequenciamento.

Tabela 2. Probabilidade de erro por base pelo algoritmo Phred.

Qualidade Phred (Q)	Probabilidade de erro (P)	Precisão
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1.000	99,9%
40	1 em 10.000	99,99%
50	1 em 100.000	99,999%
60	1 em 1.000000	99,9999%

A montagem *de novo* (do latim: “do início”) consiste na reconstrução da sequência genômica original através da identificação de sobreposição dos *reads* com objetivo de formar sequências contínuas (*contigs*) e, posteriormente, o conjunto de *contigs*, denominado de *scaffolds*. Programas de montagem *de novo* podem utilizar diferentes modelos de algoritmos como: *overlap-layout-consensus* e *Grafo de Bruijn*, sendo este último o mais utilizado para dados de NGS (Bankevich *et al.*, 2012).

O *Grafo de Bruijn* é considerado atualmente a principal estratégia de montagem de *reads* curtos devido ao seu alto desempenho ao processar grandes quantidades de dados (Bankevich *et al.*, 2012). Na montagem de genomas com *Grafo de Bruijn*, cada *read* é quebrado em uma sequência de *k-mers* (segmentos de tamanho fixo da sequência) sobrepostos, que são então adicionados ao grafo como vértices. Posteriormente, os vértices que tem sobreposições exatas de *k-1* nucleotídeos são conectados, o que permite a identificação das regiões de sobreposição. Para construir os *contigs*, os programas de montagem exploram as conexões presentes no grafo, passando pelos *k-mers* até achar o melhor conjunto de caminhos independentes (Bankevich *et al.*, 2012; Nagarajan e Pop, 2013).

A última etapa é o processo de finalização de montagem (*gap-closing*), que é a remoção de regiões desconhecidas da montagem denominadas *gaps*. Estas decorrem de falhas na montagem e precisam ser removidas para uma melhor representação do genoma. Esta etapa de *gap-closing* pode incluir genomas de referência e até mesmo montagens alternativas do mesmo genoma (Guizelini *et al.*, 2016). Após o processo de montagem os genomas, em geral, são submetidos à predição e a anotação funcional dos genes.

1.8. Predição gênica e anotação funcional

A anotação é o processo de identificar e rotular todas as características relevantes em uma sequência do genoma. Neste sentido, a anotação visa inferir conceitos biológicos às sequências de DNA e pode ser alcançada através de abordagens automáticas e/ou manuais (Richardson e Watson, 2013; Stein, 2001).

Na anotação automática, diversos programas são utilizados com o objetivo de realizar predições de regiões abertas para leituras - *Open Read Frames* (ORF's), através de cálculos *ab initio*, similaridade com outros organismos ou simplesmente pela localização de códons de iniciação e de terminação com um número "n" mínimo de códons entre eles. Além disto, através desta abordagem também se localiza regiões codificadores de proteínas – *Coding Sequencing* (CDS), presentes nas ORF's; bem como, RNAs ribossomais (rRNA) e RNAs transportadores (tRNA). Entretanto, por ser uma abordagem automatizada, apresenta limitações quando aplicados em genomas muito fragmentados, podendo resultar em predições erradas (Médigue e Moszer, 2007; Richardson e Watson, 2013).

A anotação manual, que depende da etapa automática, pode auxiliar na correção destas predições e aumentar a qualidade das anotações funcionais atribuídas aos genes (Médigue & Moszer, 2007). A anotação manual é feita a partir de curadoria de resultados de busca por similaridade em bancos de dados contendo sequências e domínios proteicos conservados (El-Gebali *et al.*, 2018), bem como vias metabólicas (Kanehisa *et al.*, 2016) e outras informações acerca da funcionalidade dos genes (Marchler-Bauer *et al.*, 2014).

1.9. Isolados UENF

A despeito das potencialidades dos vermicompostos discutidos anteriormente, a microbiota presente nestes insumos ainda não foram completamente exploradas. Neste sentido, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Fabio Olivares (UENF) vem prospectando microrganismos com potencial biotecnológico de diferentes tipos de vermicompostos. Em 2012, foram isoladas diversas bactérias de diferentes tipos de material vermicompostado (Aguiar, 2012). Dentre os isolados, foram selecionados os microrganismos mais promissores para sequenciamento genômico. Alguns destes, já foram temas da dissertação de mestrado do MSc. Gustavo Rodrigues (Rodrigues, 2018) e da tese de doutorado do DSc. Filipe Matteoli (Matteoli, 2018).

As cepas UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII isoladas por Aguiar (2012), demonstraram capacidade para promover o crescimento e aumento de massa fresca em plântulas de milho. Testes bioquímicos (Tabela 3) apontaram que as cepas UENF-4GII e UENF-5BGII solubilizam fosfato e que os três isolados fixam nitrogênio e produzem auxinas (Aguiar, 2012). Este conjunto de características de promoção do crescimento vegetal justificou o sequenciamento dos genomas destas cepas pelo nosso grupo de pesquisa, buscando prospectar os genes responsáveis por estas e outras propriedades. O sequenciamento foi realizado durante o desenvolvimento da tese do DSc. Filipe Matteoli, sendo a análise genômica dos isolados de *Stenotrophomonas* o foco desta dissertação.

Tabela 3. Origem do vermicomposto, identificação e perfil metabólico dos isolados UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII. Fonte: AGUIAR (2012)

Isolado	Origem do vermicomposto	Espécie	Fixação de nitrogênio	Produção de auxinas	Solubilização de Fosfato
UENF-4GII	Esterco bovino	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Sim	Sim	Sim
UENF-5BGII	Esterco bovino	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Sim	Sim	Sim
UENF-26GIII	Esterco bovino	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Sim	Sim	Não

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Investigar a composição genômica e identificar as cepas de *Stenotrophomonas* sp. isoladas de vermicomposto através de análises de bioinformática, colaborando com o entendimento da fisiologia destes isolados.

2.2. Objetivos específicos

- Montagem do genoma dos isolados UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII a partir de dados brutos de sequenciamento;
- Realizar a anotação dos elementos estruturais e do conjunto gênico de cada genoma com suas respectivas funções;
- Determinar a espécie dos isolados UENF com base nos dados genômicos e predizer as relações filogenéticas com outros genomas pertencentes ao gênero *Stenotrophomonas* disponíveis publicamente;
- Comparar os isolados UENF com outros genomas do mesmo gênero disponíveis publicamente por análises de pangenoma;
- Identificar *in silico* determinantes de resistência aos antimicrobianos;
- Buscar genes potencialmente envolvidos com a promoção do crescimento vegetal, biorremediação e outros interesses biotecnológicos;
- Realizar testes *in vitro* e correlacionar com os achados *in silico*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados e dados brutos de sequenciamento

Os dados brutos dos isolados UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII (Tabela 4) provenientes do sequenciamento pelo Illumina Hiseq2500 realizado no LaCTAD (Unicamp) e utilizados neste estudo, encontram-se armazenados no laboratório de química e função de proteínas e peptídeos (LQFPP) da UENF sob responsabilidade do Prof. Thiago Venâncio. Para realização de experimentos *in vitro*, foram utilizados os 3 isolados mantidos criopreservados na coleção de microrganismos LBCT da UENF na curadoria do Prof. Fábio Olivares. Tais isolados foram cultivados em meio de cultura DYGS por 48 h em incubadora rotativa a 32 °C e 180 rpm.

Tabela 4. Quantidade de bases e quantidade total dos *reads* armazenados de cada isolado.

Isolados	Nº de <i>reads</i>	Tamanho (GB)
UENF-4GII	60.186.890	15,5
UENF-5BGII	15.943.718	4,1
UENF-26GIII	38.174.643	9,8

3.2. Avaliação de qualidade e tratamento dos *reads*

A avaliação da qualidade e a quantidade dos dados brutos foi realizada pelo programa FastQC 0.11.5. Este programa permite uma análise gráfica da qualidade dos *reads*, auxiliando o tratamento dos dados que precede a montagem. Os adaptadores e *reads* com baixa qualidade foram removidos utilizando o programa Trimmomatic 0.36 (Bolger *et al.*, 2014), alterando os parâmetros *avgqual* para 30 e *slidingwindow* para 35. Adicionalmente, também foi avaliada a cobertura resultante do sequenciamento para cada genoma com base na fórmula de cobertura estimada (Figura 6) utilizando como base o tamanho médio esperado por bactérias do gênero *Stenotrophomonas*.

$$\text{Cobertura} = \frac{\text{TR} * \text{QR}}{\text{TE}}$$

Figura 6. Fórmula de cobertura estimada do genoma sequenciado. TR: tamanho dos reads; QR: quantidade de reads e TE: tamanho estimado do genoma. Adaptado de Lander e Waterman (1988).

3.3. Montagem *de novo* e finalização dos genomas

O processo de montagem dos genomas foi conduzido pelo programa SPAdes 3.10.1 (Bankevich *et al.*, 2012); um montador baseado em *Grafos de Bruijn* que utiliza múltiplos valores de *k-mer* (k) para obtenção de sequências *contigs* e do conjunto de *contigs* (*scaffolds*) que representem o genoma completo. Neste processo foram testados valores de k entre 77 a 97 para cada isolado sequenciado. Os genomas obtidos com menor número de *scaffolds* foram submetidos aos processos de otimização e finalização pelo programa GFinisher 1.4.0 (Guizelini *et al.*, 2016). O GFinisher utiliza genomas montados por outros algoritmos e genomas públicos fechados com maior similaridade para ordenar, realocar e combinar *scaffolds*, bem como remover os N's (regiões de *gaps*) existentes para obtenção de *drafts* genômicos de alta qualidade. Ademais, para busca de possíveis plasmídeos existentes nos genomas, foram utilizados os programas plasmidSPAdes 3.8.0 (Antipov *et al.*, 2016) e PlasFlow (Krawczyk *et al.*, 2018) com parâmetros *default*.

3.3.1. Avaliação da montagem

A qualidade das montagens foi avaliada tanto pela análise das métricas de montagem quanto pela detecção de genes conservados em Gammaproteobactérias. A avaliação das métricas para cada montagem foi conduzida pelo programa QUAST 3.0 (Gurevich *et al.*, 2013). A detecção de genes conservados foi realizada pelo algoritmo BUSCO 3.0 (Simão *et al.*, 2015).

3.4. Anotação dos genomas UENF

As anotações dos genomas foram realizadas em duas etapas: automática e manual. A etapa de anotação automática foi conduzida pelo programa PROKKA utilizando as configurações *default* (Seemann, 2014), que utiliza os algoritmos Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), Barrnap e Aragorn (Laslett e Canback, 2004) para anotação de genes codificadores de proteína, de rRNA e de RNAs transportadores (tRNA), respectivamente. As funções gênicas de cada genoma foram mapeadas por ortologia utilizando o sistema de anotação automática blastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016) (<http://www.kegg.jp/blastkoala>) que utiliza a base de dados KEGG (Kanehisa *et al.*,

2017) (<http://www.kegg.jp>); e eggNOG (<http://eggnogdb.embl.de/>), uma base de dados que classifica sequências baseadas em grupos ortólogos (COG) (Galperin *et al.*, 2014).

A segunda etapa foi realizada com auxílio da ferramenta BLASTp (Altschul *et al.*, 1997) para anotar manualmente os genes potencialmente envolvidos com a promoção do crescimento vegetal e de interesse biotecnológico a partir da predição das CDS pelo PROKKA, utilizando a base curada de sequências SwissProt (Boutet *et al.*, 2016). Neste processo, os genes selecionados e seus produtos foram extensivamente comparados com outros disponíveis publicamente. Como requisito mínimo, a anotação de um gene foi aceito nos casos de e-value menor que $1e^{-5}$ e conservação de domínios proteicos com a sequência de referência do SwissProt (Gupta *et al.*, 2014).

3.5. Análises de similaridade genômicas

Em decorrência do grande número de genomas depositados, técnicas que se valem da similaridade do genoma inteiro tem se tornado mais populares, especialmente para taxonomia bacteriana. Uma dessas técnicas se baseia na identidade média de nucleotídeos - *Average Nucleotide Identity* (ANI). Neste trabalho, as análises de ANI foram realizadas pelo módulo Pyani (Pritchard *et al.*, 2016) com base nos genomas UENF e na seleção de todos os genomas de *Stenotrophomonas* disponíveis no GenBank e *Joint Genome Institute* (JGI). Através do módulo Pyani, os genomas são fragmentados *in silico* em segmentos de 1.020 nucleotídeos, que são alinhados utilizando BLAST contra um genoma de referência para obtenção dos valores de ANI (Richter e Rossello-Mora, 2009). O programa considera os genomas com valores de ANI superiores a 95% como pertencentes à mesma espécie.

3.6. Pangenoma

Pangenoma é o termo utilizado para representar o repertório gênico completo de bactérias de uma mesma espécie (Zhang e Sievert, 2014). Tendo em vista a diversidade genômica resultante da rápida aquisição e perda de genes das bactérias (Vernikos *et al.*, 2015), a identificação de genes conservados e específicos constitui uma valiosa ferramenta no entendimento da espécie em questão. Neste trabalho, as análises de pangenoma foram realizadas com base nos genomas mais similares (> 95%) aos isolados UENF de acordo com as análises de ANI. Os genomas com valores

de ANI acima de 99,5% entre si foram removidos como forma de adquirir maior precisão dos resultados em relação a medida da variação intra-subespécies quanto ao conteúdo genético. A análise de pangenoma foi conduzida com o programa BPGA 1.3 (Chaudhari *et al.*, 2016). Este programa agrupa as proteínas codificadas em todos os genomas utilizando o módulo integrado USEARCH (Edgar, 2010) e, em seguida, compara os genomas utilizando BLASTp com *cutoff* predeterminado de 95% de identidade. Os resultados são comparados e o genoma *core*, acessório e único são obtidos e informados.

3.7. Filogenia MLSA do core genoma (cgMLSA)

A reconstrução filogenética através de análises de sequência multilocus - *multi-locus sequence analysis* (MLSA) foi baseada nas sequências dos genes de cópia única presente no *core* genoma dos isolados UENF com os genomas similares. A análise foi conduzida com o método, máxima verossimilhança - *Maximum Likelihood* (ML) (Felsenstein, 1981) através do programa RAxML 8.2.10 (Stamatakis, 2014). Para determinação dos genes ortólogos de cópia única do *core* genoma foi realizada uma pesquisa por ortólogos com o BUSCO, tendo a classe Gamaproteobacteria como referência. As sequências selecionadas foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE 3.8.31 (Edgar, 2004) e os alinhamentos concatenados com o programa FASTconCAT-G (Darriba *et al.*, 2011). A extração das regiões filogeneticamente relevantes e a remoção de regiões ambíguas necessárias para otimização da análise, foram conduzidas pelo algoritmo TrimAL (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009), com o uso do parâmetro *gappyout*. O modelo de substituição foi estimado com o algoritmo ProtTest 3 (Darriba *et al.*, 2011). A visualização da árvore foi realizada pela ferramenta iTOL3 (<https://itol.embl.de/>) (Letunic e Bork, 2016).

3.8. Resistoma

É a avaliação do conjunto de genes responsáveis pela resistência a antimicrobianos (resistoma) entre as espécies filogeneticamente mais próximas (Sánchez, 2015). Neste trabalho, as análises foram conduzidas com base na busca de genes de resistência utilizando a base de dados *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD; <https://card.mcmaster.ca>), que contém uma coleção

rigorosamente curada e atualizada de genes de resistência à antibióticos (Jia *et al.*, 2017). Os genomas selecionados para análise de pangenoma foram submetidos à análise de resistoma, utilizando a ferramenta BLASTp com parâmetro *evaluate* alterado para $1e^{-5}$ e, posteriormente, analisados com base na identidade (acima de 60%) e cobertura (acima de 80%). Os resultados de cada análise foram representados em um gráfico de presença e ausência associado com a árvore filogenética do *core* genoma.

3.9. Testes *in vitro*

Para fins de validação experimental e avaliação de propriedades promotoras do crescimento vegetal e biorremediadoras, testes *in vitro* foram realizados. Os experimentos foram executados no LBCT/CBB/UENF com auxílio da DSc Letícia Oliveira Rocha. Para todos os experimentos descritos abaixo foram obtidos um pré-inoculo de cada estirpe, conforme descrito no item 3.1

3.9.1. Fixação de nitrogênio

Para a confirmação da película aerotóxica, uma alíquota de 20 μ L da suspensão bacteriana foi transferida para o meio semi-sólido JNFb, cuja composição é: 5g de ácido málico, 6 mL de K_2HPO_4 (sol. 10 %), 18 mL de KH_2PO_4 (sol. 10 %), 2 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sol. 10 %), 1 mL de NaCl (sol. 10 %), 2 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (sol. 1 %), 4 mL de FeEDTA (sol. 1,64 %), 2 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH), 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de vitamina para meio de cultura, 4,5 g de KOH e 1,7 g de ágar, 1000 mL de H_2O destilada e pH 5,8. Após sete dias de incubação a 32 °C foi avaliada a presença ou não de película aerotóxica, uma película esbranquiçada em forma de véu na superfície do meio de cultura que pode caracterizar o crescimento de bactérias diazotróficas (Döbereiner *et al.*, 1995).

3.9.2. Solubilização de Fosfato de Cálcio

Alíquotas de 10 μ L das soluções bacterianas foram dispostas em placas de Petri com meio de cultura sólido para solubilização de fosfato cuja composição é 10 g de glicose, 5 g de cloreto de amônio (NH_4Cl), 1 g de cloreto de sódio (NaCl), 1 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), suplementado com 1,0 g de fosfato de Ca ($Ca_5(PO_4)_3OH$), 15 g de ágar, 1.000 mL de água destilada, ajustando o pH para 7,0. As

placas inoculadas foram incubadas em estufa de germinação a 32 °C durante sete dias. A avaliação deu-se pela presença do halo translúcido formado ao redor das colônias bacterianas e o índice de solubilização de fosfato (IS = diâmetro do halo (mm)/ diâmetro da colônia (mm)), classificado em baixo (IS < 2), médio (2 ≤ IS ≤ 4) e alto (IS > 4) (Marra *et al.*, 2015).

3.9.3. Interação fungo-bactéria

Para a interação fungo-bactéria, foram utilizados os fungos *Trichoderma* 476 e *F. solani*. Os fungos foram previamente inoculados em placas de ágar dextrose batata (ADB), por aproximadamente sete dias. Após este período, um *plug* do fungo foi colocado no centro de uma placa com meio ADB e três alíquotas de 10 µL do pré-inoculo da bactéria foi disposto ao redor deste *plug*. As placas foram deixadas em estufa de germinação por sete dias a 32 °C. Controles foram obtidos através da utilização apenas do fungo. A cada 24 h, o crescimento fúngico foi registrado com o auxílio de uma câmera fotográfica para confirmar o potencial de inibição ou não das estirpes de bactéria sobre cada fungo.

3.9.4. Crescimento bacteriano na presença de Cromo

As soluções contendo diferentes concentrações de Sulfato Dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) foram preparadas a partir de soluções estoque de 1 g/L. Para curva de crescimento bacteriano, uma alíquota de 20 µL da suspensão bacteriana previamente foi transferida para o meio caldo nutritivo suplementado com diferentes concentrações de K₂Cr₂O₇ de acordo com a metodologia de Kader e colaboradores (2007), sendo 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mg/L. O inóculo foi levado a incubadora rotativa à 32 °C e 180 rpm por 48 h. A cada 12 h, alíquotas de 200 µL foram transferidas para placas de 96 poços. O número de células bacterianas foi demonstrado através da densidade óptica (DO) sendo realizada a leitura em espectrofotômetro *Hidex Chameleon Multilabel Detection Platform* com absorvância de 595 nm pelo programa MikroWin 2000. O ensaio foi realizado em triplicatas e um controle contendo somente a suspensão e o meio NB. Ao final de 48 h uma alíquota foi retirada do controle e das concentrações de 20, 60 e 120 mg/L e a morfologia das

células foram visualizadas por meio de microscopia óptica de contraste de fase, em microscópio óptico *Zeiss Axioplan*, com uma câmera fotográfica digital acoplada.

Para o crescimento em placa, uma alíquota de 10 µL da suspensão bacteriana (item 4.1) foi transferida para placas de meio sólido NB suplementado com diferentes concentrações de metal 20, 60, 120 mg/L. As placas foram colocadas em estufa a 32 °C por 48 h e ao final do experimento, imagens foram obtidas das colônias com o auxílio de uma câmera fotográfica. O experimento foi realizado em triplicata e o controle foi obtido com placa contendo somente meio NB sólido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de qualidade dos *reads*

A qualidade dos *reads* de cada isolado UENF foi analisada com base no sistema *Phred* através do programa FastQC. Todos os genomas apresentaram estimativas acima de 87% de qualidade de *reads* superior a *Phred* 30 (1 erro a cada 1.000 pb). A análise de cobertura estimada para cada genoma apresentou os valores de 1.254x para UENF-4GII, 332x para UENF-5BGII e 795x para UENF-26GIII; valores elevados tendo em vista a taxa de cobertura mínima esperada (60x) (Del-Angel *et al.*, 2018). Devido a elevada taxa cobertura proporcionada para cada genoma, os *reads* com qualidade igual ou acima de *Phred* 30 foram mantidos pelo algoritmo Trimmomatic (Figura 7) e os demais excluídos com o uso do mesmo programa. De acordo com Carneiro e colaboradores (2012), utilizar apenas os *reads* de alta qualidade otimiza o processo de montagem.

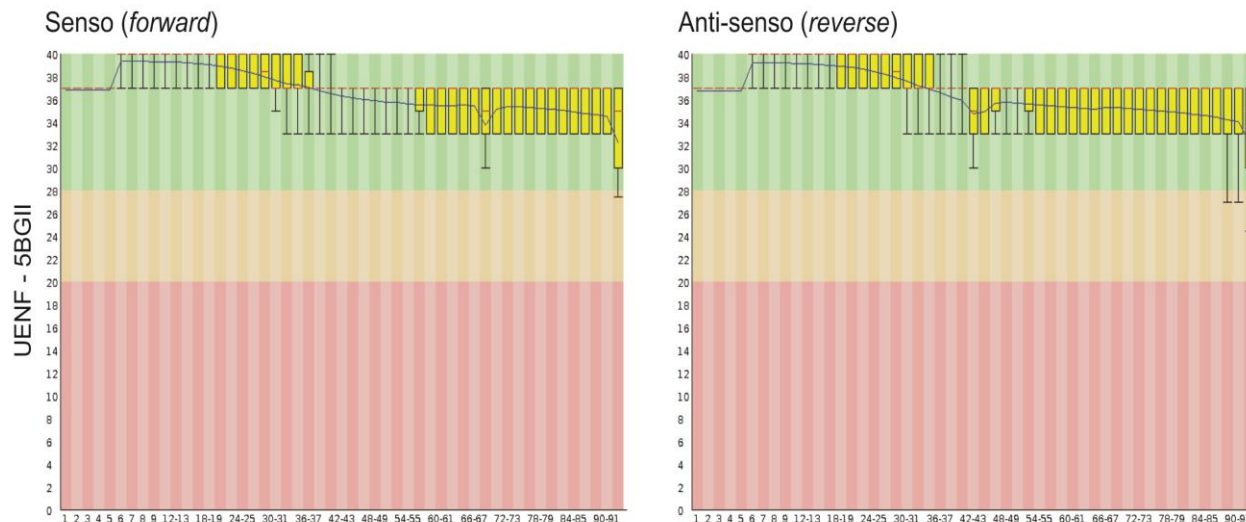


Figura 7. Avaliação de qualidade dos *reads forward* e *reverse* após etapa de trimming. O eixo Y representa o valor de qualidade *Phred*, o eixo X, a posição das bases dentro dos *reads* de 100 pb; a linha vermelha representa a mediana das leituras e a azul a média.

4.2. Montagem *de novo* e avaliação dos genomas

No processo de montagem do genoma pelo SPAdes 10.3.1, os melhores resultados foram obtidos, para todos os isolados, com o valor de $k = 97$ utilizado em conjunto com os valores de $k = 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93$ e 95 . As análises obtidas pelo plasmidSPAdes e PlasFlow não apresentaram nenhum resultado para presença de plasmídeos, demonstrando a ausência destes elementos móveis nos isolados UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII.

A etapa de avaliação da montagem de genomas é determinada pelas métricas de contiguidade. Em geral, as melhores montagens são as que possuem menor número de *scaffolds* (L50 e L75); e maiores valores de N50 e N75. As métricas L50 e L75 são utilizadas para descrever o número mínimo de *scaffolds* necessário para cobrir metade e 75% do genoma respectivamente. Com os *scaffolds* ordenados do maior ao menor, a métrica N50 é utilizada para indicar o tamanho do *scaffold* que está na metade da cobertura do genoma; e o valor de N75, o tamanho do *scaffold* na posição correspondente a 75% da cobertura (Gurevich *et al.*, 2013; Nagarajan e Pop, 2013). Após a finalização de cada montagem pelo GFinisher, todos os genomas UENF apresentaram métricas de contiguidade satisfatórias (Tabela 5).

Tabela 5. Métricas das montagens dos genomas UENF obtidas após finalização pelo GFinisher. Os valores em negrito destacam as melhores métricas.

Montagem	UENF-4GII	UENF-5BGII	UENF-26GIII
<i>scaffolds</i>	4	4	11
<i>scaffolds</i> >= 1000 pb	3	3	9
Maior <i>scaffold</i>	2.070.121	2.261.488	1.131.156
GC %	66,55	66,87	67,01
N50	1.378.831	1.213.989	762,65
N75	1.378.831	1.213.989	545,518
L50	2	2	3
L75	2	2	4
Nº de gaps por 100 kpb	0	0	0
Tamanho Total	4.440.053	4.536.003	4.479.133

A avaliação das montagens através da localização de genes ortólogos únicos pelo programa BUSCO 3.0 foi conduzida com base na seleção da base de dados para classe de Gammaproteobacteria (composta por 452 genes ortólogos únicos presentes em 751 espécies), com o conjunto de dados filogeneticamente mais próximo e disponível para o gênero *Stenotrophomonas*.

Os resultados demonstraram a ausência de 11 (2,43%) genes ortólogos únicos em todas as cepas UENF (Figura 8). Estes genes tampouco foram encontrados nos genomas de *S. maltophilia* D457e *S. maltophilia* JV3 (genomas de referência), indicando que esta observação deve ser uma característica da espécie, e não uma falha no processo de montagem. A margem de genes ausentes está de acordo com o preconizado pelos autores do programa BUSCO (Simão *et al.*, 2015). Em resumo, todos os isolados UENF apresentaram estimativas de qualidade superiores a 96,4%, comparáveis aos obtidos para cepas de referência.

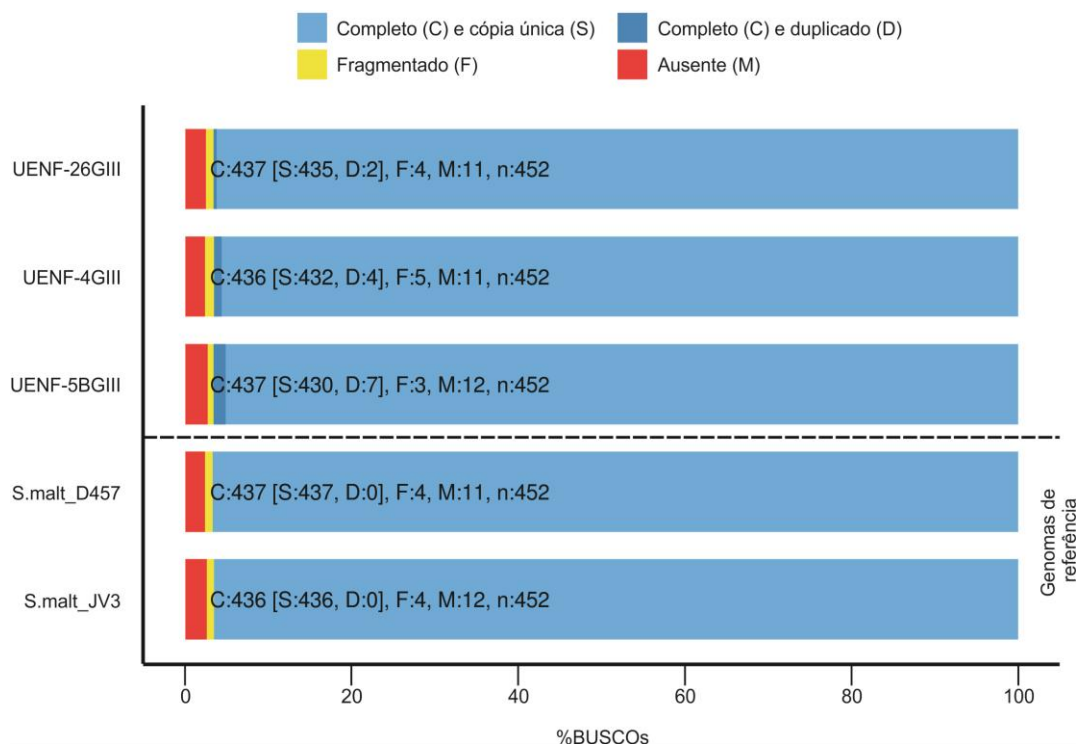


Figura 8. Resultado da Avaliação do BUSCO. Presença de genes ortólogos de cópia única pertencentes à Gammaproteobacteria nos isolados UENF-4GII, UENF-5BGII, UENF-26GIII e em dois genomas de referência pertencentes à espécie *S. maltophilia*.

4.3. Predição e anotação automática dos genes

A identificação de genes é um dos primeiros e mais importantes passos para compreender o genoma sequenciado (Yandell e Ence, 2012). Na predição gênica gerada pelo PROKKA, o isolado UENF-4GII revelou 4.034 genes, dos quais 2.514 (62,32%) tiveram sua função predita (Tabela 6). Já para os isolados UENF-5BGII e UENF-26GIII foram preditos 4.159 e 4.112 genes respectivamente, com anotação de 2.605 (64,4%) genes para UENF-5BGII e 2.532 (61,58%) para UENF-26GIII.

Tabela 6. Anotação geral dos genomas UENF a partir do PROKKA.

Métricas	UENF-4GII	UENF5-BGII	UENF-26GIII
CDS	3.955	4.081	4.035
Genes	4.034	4.159	4.112
RNAr	4	4	3
RNAt	74	73	73
CG(%)	66,55	66,87	67,01

A Tabela 7 mostra a classificação pelo COG através da base de dados EggNOG de todos os genes preditos pelo PROKKA dos isolados UENF. Algumas das funções representadas pelas letras K, T, U e P, na primeira coluna da tabela tiveram uma pequena variação de genes para cepa UENF-5BGII em relação aos demais genomas. Por se tratarem da mesma espécie, são esperadas pequenas diferenças na quantidade de genes responsáveis por cada uma das funções. Os genes anotados sem função conhecida (S) e classificados como sem anotação representam a maioria do conjunto gênico considerado pelo programa, indicando a existência de características gênicas inexploradas e desconhecidas dos isolados UENF.

Tabela 7. Anotação funcional dos genomas UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII pelo EggNOG. Os genes preditos para cada genoma encontram-se distribuídos entre as categorias funcionais do COG.

COG	FUNÇÃO	UENF-4GII	UENF-5BGII	UENF-26GIII
ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES				
A	Modificação e processamento de RNA	1	1	1
J	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	172	177	173
K	Transcrição	214	259	234
L	Replicação, recombinação e reparo	148	136	132
B	Estrutura e dinâmica da cromatina	1	1	1
PROCESSOS E SINALIZAÇÃO CELULAR				
D	Controle do ciclo celular e divisão celular	26	28	26
Y	Estrutura do núcleo	0	0	0
V	Mecanismos de defesa	71	75	74
T	Mecanismos de tradução de sinal	208	228	217
M	Parede celular/membrana/envelope biogenesis	236	235	236
N	Motilidade celular	71	74	72
Z	Citoesqueleto	0	0	0
W	Estruturas extracelulares	3	0	5
U	Trafego intracelular, secreção, transporte de vesículas	121	127	119
O	Modificação pós-tradução, protein turnover, chaperones	155	150	147
METABOLISMO				
C	Produção e conversão de energia	182	188	186
G	Transporte e metabolismo de carboidratos	144	138	147
E	Transporte e metabolismo de aminoácidos	208	214	212
F	Transporte e metabolismo de nucleotídeos	77	74	73
H	Transporte e metabolismo de coenzimas	108	110	100
I	Transporte e metabolismo de lipídios	109	118	108
P	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	212	226	208
Q	Biossíntese de metabólitos, transporte e catabolismo secundário	62	68	61
BAIXA CARACTERIZAÇÃO				
R	Predição de funções gerais	0	0	0
S	Sem função conhecida	820	836	846
SEM ANOTAÇÃO		246	270	267

4.4. Análise manual dos genes

Estudos prévios de Aguiar (2012) com os isolados UENF demonstraram algumas características fenotípicas para promoção do crescimento vegetal, entretanto pouco se sabe sobre as bases genéticas de tais características. No intuito de averiguar estas características, buscamos anotar genes específicos que desempenham papéis centrais nos fenótipos observados (Tabela 3), assim como genes relacionados à promoção do crescimento vegetal, biorremediação e outros processos ecofisiológicos. Os resultados estão sumarizados na Figura 9.

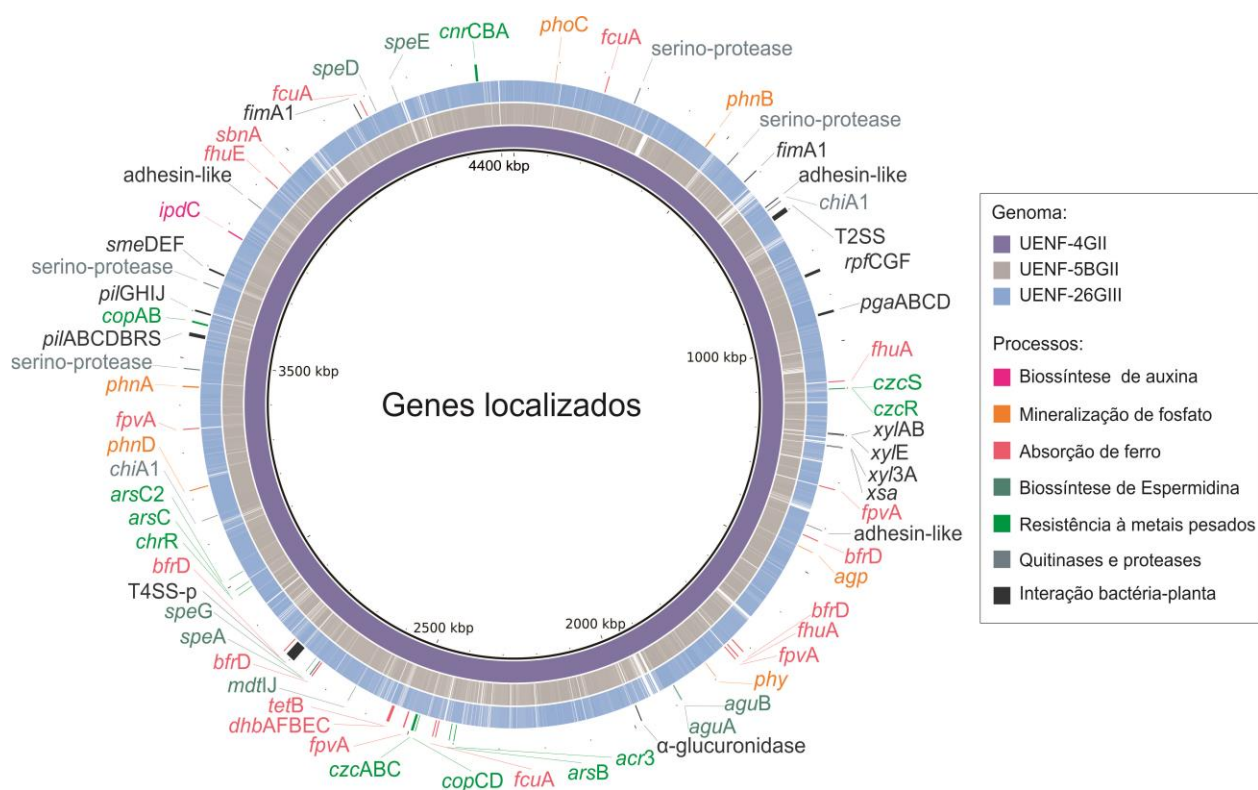


Figura 9. Representação circular dos genomas UENF e a distribuição dos genes relacionados a processos de interesse biotecnológico. O genoma UENF-4GII foi utilizado como referência para mapeamento.

Os isolados UENF apresentaram as mesmas características genotípicas de interesse biotecnológico, com pequenas diferenças na quantidade de cópias dos genes (Figura 10). Os genes clássicos relacionados à fixação de nitrogênio (*nif*) e a solubilização de fosfato (*pqq* e *gdh*) não foram localizados. Os testes *in vitro* realizados para estas características nos isolados UENF não apresentaram resultados estatísticos

inativação do gene *ipdC* ocasiona diminuição drástica da produção de AIA (Malhotra e Srivastava, 2008). Ademais, sequências com alta similaridade ao gene *ipdC* têm sido reportadas em vários gêneros (p. ex. *Serratia* e *Xanthomonas*) e relacionadas com capacidade de produção de compostos indólicos (Patten *et al.*, 2013). Estudos com *S. maltophilia* já demonstraram a capacidade desta espécie para produção de compostos indólicos (Hassan e Bano, 2016), embora os genes responsáveis por esta característica não tenham sido identificados. Nossos dados sugerem que os isolados UENF produzem AIA através da via dependente de triptofano, a IPA.

4.4.2. Genes relacionados à biossíntese de espermidina

Poliaminas (p. ex. espermidina) são essenciais para o desenvolvimento celular e são correlacionadas com o desenvolvimento de raízes laterais, resistência a patógenos e atenuação de estresses oxidativos, osmóticos e ácidos (Xie *et al.*, 2014). A espermidina pode ser sintetizada através da via de biossíntese canônica pela ornitina descarboxilase ou, alternativamente, em duas etapas catalisadas pela arginina descarboxilase (*speA*), agmatinase (*speB*) e espermidina sintase (*speE*). Nesta via, o transporte específico de espermidina é possível graças ao sistema de transporte codificado pelos genes do operon *potFGHI* (Miller-Fleming *et al.*, 2015).

Nos genomas UENF, foram identificados genes que codificam enzimas do caminho alternativo de biossíntese (*speA*, *aguA*, *aguB*, *speD*, *speE* e *speG*) e transporte de espermidina (genes *mdtI*) (Figura 11), sugerindo a capacidade dos isolados UENF de produzir e secretar espermidina.

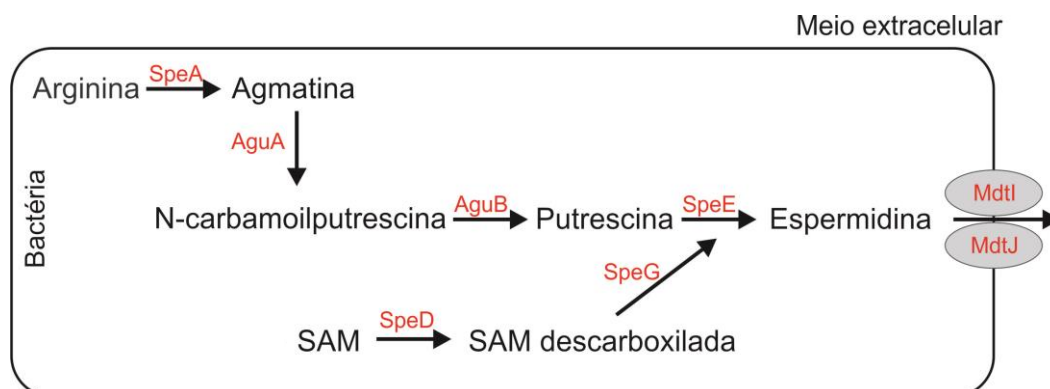


Figura 11. Apresentação gráfica da via alternativa de biossíntese de espermidina presente nos isolados UENF. SAM: S-adenosilmetionina. Adaptado de Xie *et al.* (2014).

Estudos demonstraram que a aplicação de poliaminas exógenas pode aumentar a tolerância ao estresse abiótico. Zhou e colaboradores (2016) demonstraram que a biossíntese de espermidina por *Bacillus megaterium* BOFC15 resultou em maior biomassa, maior capacidade fotossintética e maior atividade das enzimas antioxidantes em *Arabidopsis thaliana*, quando comparadas com o controle. Desta forma, a produção de espermidina pelos genomas UENF, possivelmente, contribui para o crescimento vegetal e proteção das plantas contra estresses abióticos.

4.4.3. Genes relacionados à mineralização de fosfato orgânico

A deficiência de P no solo é um grande obstáculo para a produção agrícola. O fitato é a principal forma de P orgânico no solo e encontra-se indisponível para as plantas como fonte de Fósforo devido à forte interação deste com componentes do solo (Singh e Satyanarayana, 2011). Além do fitato, estão presentes no solo moléculas organofosforadas que contêm a ligação C-P altamente estável e insolúvel, dificultando a assimilação de P pelas plantas. Neste sentido, a ação de microrganismos mineralizadores de P é crucial às plantas em sistemas agrícolas onde almeja-se reduzir o uso de insumos químicos (Rodríguez *et al.*, 2006).

Os isolados UENF apresentam diversos genes relacionados à mineralização de P, como as fosfatases ácidas, *agp* e *phoC* (Rodríguez e Fraga, 1999); e o gene codificante de 3-fitase (*phyA*) (Kim *et al.*, 1998). Dentre os dezessete genes do operon *phn*, envolvido na degradação e absorção de fosfonato (Xie *et al.*, 2016), apenas *phnA* (fosfonoacetaldeído hidrolase) e os genes *phnB* e *phnD*, envolvidos no transporte de fosfonato, foram encontrados (Figura 9).

Estudos anteriores já demonstraram que a produção de enzimas relacionadas à mineralização de P orgânico possui efeito direto na promoção do crescimento vegetal (Singh *et al.*, 2014). Embora a presença das fitases em *Stenotrophomonas* ainda permaneça pouco explorada, segundo Fuentes e colaboradores (2009), bactérias oriundas de processos de compostagem apresentam alta atividade para degradação de fitato e, portanto, apresentam-se como candidatos promissores a bioinoculantes.

4.4.4. Resistência a metais em *Stenotrophomonas*

Ao longo da evolução, as bactérias desenvolveram vários mecanismos para atenuar a toxicidade do excesso de metais. Sistemas de efluxo, síntese de compostos de ligantes, bioacumulação e redução de metais à formas menos tóxicas são as principais estratégias utilizadas por estes microrganismos, despertando interesse por aplicações biotecnológicas (Das *et al.*, 2016). *Stenotrophomonas maltophilia* é conhecida por apresentar resistência intrínseca a diversos metais tóxicos. No entanto, os mecanismos bioquímicos empregados por esta espécie permanecem inexplorados.

Os isolados UENF possuem os genes *copA*, *copB*, *copC* e *copD*, que codificam proteínas de ligação cruciais na homeostase e resistência ao cobre (Lawton *et al.*, 2016); genes da arsenato redutase (*arsC* e *arsC2*) e de permeases de efluxo com alta especificidade ao arsenito (*arsB* e *acr3*), envolvidos na resistência bacteriana ao Arsênio (Yang *et al.*, 2012); o operon *czcCBA*, responsável por codificar o fator de membrana externa CzcC, a proteína de fusão de membrana CzcB e a bomba de efluxo de membrana interna CzcA, que confere a resistência ao Cádmio, Cobalto e Zinco em diversas espécies de bactérias, incluindo *Stenotrophomonas* (Aslam *et al.*, 2018; Stahl *et al.*, 2015); o operon *czcRS* regulador de *czcCBA*; e o operon *cnrCBA*, que confere resistência ao Níquel e Zinco através de proteínas com estruturas similares ao *czcCBA* (Nies, 2003) (Figura 10).

Além disto, foi localizado nos genomas o gene da cromato redutase (*chrR*), que confere sobrevivência à bactéria na presença de Cr^{6+} através da oxirredução do metal (Raman *et al.*, 2018). Sendo assim, os genomas apresentaram bases gênicas de resistência ao Cd, Co, Zn, As, Ni, Cu e Cr, demonstrando serem capazes de sobreviver em ambientes contaminados com estes metais e, possivelmente, melhorar a eficiência da fitoextração.

Como forma de avaliar uma das capacidades de resistência a metais tóxicos, realizamos testes *in vitro* de tolerância ao Cromo hexavalente nos isolados UENF. Os resultados mostraram o crescimento regular (em relação ao controle) das cepas em placas contendo concentrações de 20, 60 e 120 mg/L de Dicromato de potássio (Figura 12a), indicando que estas concentrações não afetam o desenvolvimento e o crescimento das colônias. A avaliação do crescimento em meio líquido mostrou

resultados diferentes entre as cepas (Figura 12b). O isolado UENF-4GII apresentou maior taxa de crescimento nas concentrações de 120 mg/L de Cr^{6+} em relação aos isolados UENF-5BGII e UENF-26GIII.

No gráfico também é possível observar que nas concentrações de 40 e 60 mg/L no período de 36 e 48 h, o isolado UENF-4GII apresentou maior crescimento em relação ao controle (0 mg/L). Esta característica peculiar também foi observada na UENF-5BGII com concentração de 20 mg/L do metal durante todo período avaliado.

A análise demonstrou que a concentração de 120 mg/L não foi suficiente para inibir o crescimento dos isolados UENF, sendo necessários testes posteriores para determinação da concentração mínima inibitória (MIC). No estudo de Raman e colaboradores (2018), *S. maltophilia* NA2 apresentou níveis satisfatórios de tolerância na presença de 1.950 mg / L de Cr^{6+} e MIC de 7.400 mg/L, demonstrando o potencial que a espécie possui para resistência ao Cr.

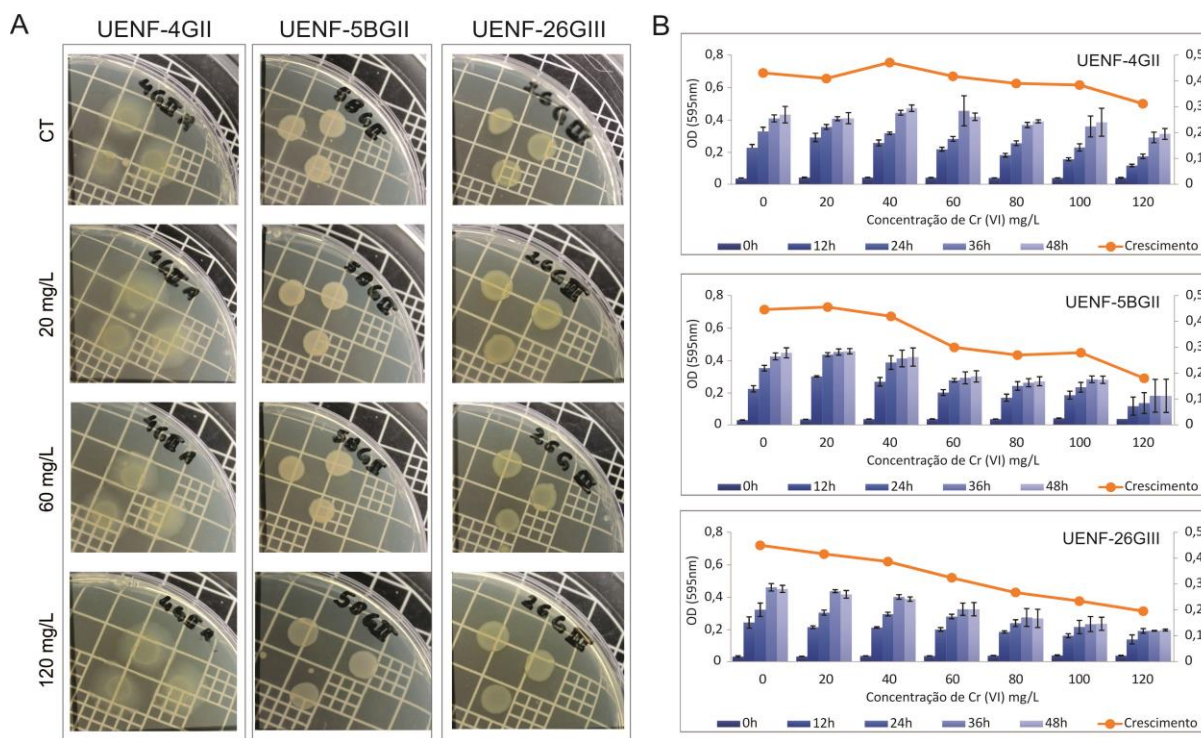


Figura 12. Análise de tolerância à Cr^{6+} . (A) Crescimento em placa dos isolados UENF contendo diferentes concentrações de Dicromato de potássio. CT= Controle. (B) Curva de crescimento dos isolados UENF em caldo nutritivo na presença e ausência de Dicromato de potássio em diferentes concentrações. Barras na cor preta representam o desvio padrão. Linhas na cor laranja mostram a taxa de crescimento para cada concentração observada em 48 h.

4.4.5. Biocontrole de fitopatógenos

Obter vantagem em um ambiente de intensa competitividade é um desafio para os microrganismos. Algumas bactérias relacionadas ao biocontrole produzem sideróforos como um dos mecanismos para competir com patógenos microbianos no solo e plantas (p. ex. rizosfera) e esta habilidade têm se tornado um grande atrativo para aplicações biotecnológicas (Ahmed e Holmström, 2014). Localizamos nos genomas dos isolados UENF, um operon (Figura 13) relacionado com a biossíntese de sideróforo por sintetases peptídicas não-ribossomais - *non-ribosomal peptide synthetases* (NRPS). Este operon é composto por 10 genes sendo 6 homólogos ao *cluster* gênico responsável pela síntese de bacilibactina, um sideróforo produzido pela PGPR *Bacillus subtilis* (May *et al.*, 2001).

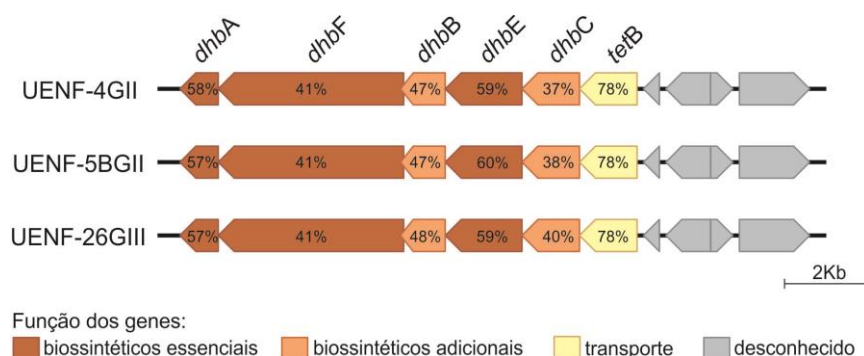


Figura 13. Operon relacionado à biossíntese de sideróforo localizado nos isolados UENF. Dentro de cada representação gênica anotada está a porcentagem de identidade correspondente aos genes de síntese do sideróforo bacilibactina produzido por *B. subtilis*.

Além do operon, os genomas UENF possuem diversos tipos de genes relacionados à captação de sideróforos (*fcuA*, *fhuA*, *fhuE*, *fpvA* e *bfrD*) distribuídos em diferentes quantidades de cópias. *fcuA* e *fhuA* codificam proteínas (que ancoram na membrana externa) receptoras de ferricromo, um sideróforo do tipo hidroxamato produzido por diversas bactérias gram-negativas (Silver e Walden, 2012). O gene *fhuE* codifica uma proteína receptora de alta afinidade com coprógeno, um sideróforo produzido por diversos fungos (Renshaw *et al.*, 2002). O gene *fpvA* é conhecido pela produção de receptores do sideróforo ferripioverdina em *Pseudomonas aeruginosa* e; *bfrD*, por codificar um sideróforo sem especificidade conhecida. A presença de

diferentes tipos de receptores pode capacitar a bactéria a captar sideróforos produzidos por outros microrganismos e aumentar a vantagem competitiva, inclusive em microrganismos fitopatogênicos.

Além dos sideróforos, a secreção de enzimas quitinolíticas por bactérias é considerada um dos mecanismos importantes no biocontrole (Santamarina *et al.*, 2017). Encontramos nos genomas UENF dois genes de quitinases (Figura 10). Através de análises com BLASTp contra a base de dados Swissprot, verificamos que as sequências são pertencentes à família glicosil-hidrolase 18, especificamente, na subfamília A (*chiA*).

Proteases extracelulares também podem contribuir para a inibição do crescimento de patógenos de plantas, como fungos e nematoides (Kupferschmied *et al.*, 2013). Genes de serino-proteases estão presentes nos genomas UENF (Figura 9).

Quitinases e proteases podem atuar sinergicamente no biocontrole de fitopatógenos. Desta forma, nossas análises mostram que todos os três isolados UENF são geneticamente equipados para biocontrole de patógenos bacterianos e fúngicos.

Stenotrophomonas são conhecidos como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos. Em estudos anteriores, as quitinases de *S. maltophilia* 34S1 suprimiram a doença *patch* de verão, causada no capim-branco pelo fungo rizosférico, *Magnaporthe poae* (Kobayashi *et al.*, 2002). Outro trabalho demonstrou a deformação de hifas fúngicas com preparações de quitinase purificada da cepa *S. maltophilia* C3, demonstrando o papel da quitinase da espécie no biocontrole (Zhang e Yuen, 2000).

Com base nas evidências genômicas localizadas para biocontrole, realizamos testes *in vitro* de interação fungo-bactéria com os isolados UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII sobre isolados fúngicos: *F. solani* e *Trichoderma* 476.

Os resultados mostraram que as cepas UENF não inibiram o crescimento de *Trichoderma* 476, um fungo benéfico e abundante na rizosfera; enquanto que apenas o isolado UENF-4GII foi capaz de inibir *F. solani*, um fungo fitopatogênico que infecta culturas como feijão, soja e muitas outras (Figura 14).

Os dados se correlacionam com estudos anteriores que demonstraram o potencial antifúngico de *Stenotrophomonas* sobre o gênero *Fusarium* (Jankiewicz *et al.*, 2012; Suma e Podile, 2013). Entretanto, os resultados obtidos para as cepas UENF-

5BGII e UENF26GIII criopreservadas, sugerem um resequenciamento para confirmação de pureza da colônia, devido a diferença de resultados em relação a cepa UENF-4GII, tendo em vista que estes genomas possuem o mesmo perfil e características genotípicas.

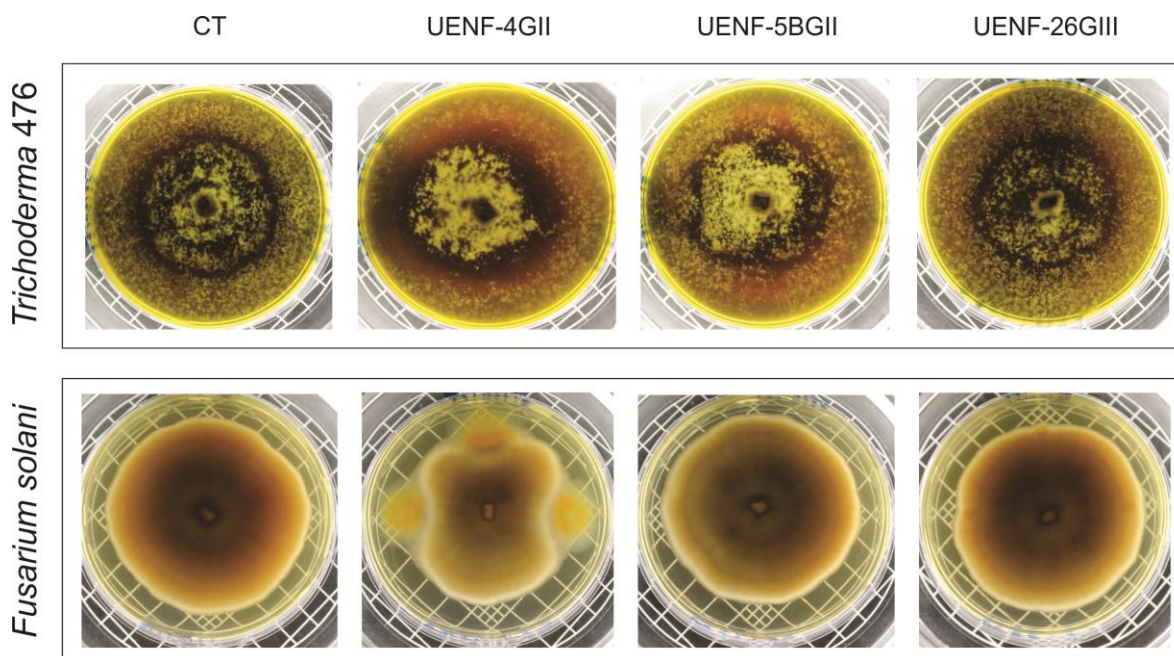


Figura 14. Ensaio de inibição de duas espécies de fungos pelos isolados UENF. As imagens foram capturadas após 120 h de co-inoculação das cepas UENF com os fungos. CT = controle.

4.4.6. Interação bactéria-planta e colonização

Exsudados radiculares atraem bactérias que, por sua vez, se acumulam na rizosfera. O deslocamento bacteriano na rizosfera pode ser em resultado dos fluxos de água ou pelo uso de flagelos e pili do tipo I e IV (Taghavi *et al.*, 2010). Nos genomas UENF foram localizados todo o aparato gênico (*fimA1*, *pilGHIJ* e *pilDCABRS*) que codificam proteínas estruturais de flagelo e pili, responsáveis pelo movimento quimiotático das *Stenotrophomonas*.

O próximo passo na colonização bacteriana é a adesão na raiz que pode ser possível devido à produção de adesinas, pili do tipo IV e formação de biofilme (Compant *et al.*, 2010). Foram localizados nos genomas UENF os genes de produção de adesinas (67% de identidade de *Xanthomonas*) da espécie *S. maltophilia*. Ademais, foram localizados o operon *pgaABCD*, que codificam enzimas responsáveis pela

formação e exportação do homopolímero linear, a poli- β -1.6-N-acetil-D-glucosamina, uma das principais substâncias presente no biofilme (Itoh *et al.*, 2008).

A bomba de efluxo SmeDEF também desempenha um papel importante na colonização de plantas. A expressão de genes que codificam esta bomba é regulada positivamente por flavonoides produzidos pelas plantas, sendo a deleção de *smeE* prejudicial à colonização epifítica (García-León *et al.*, 2014). Em nossas análises, todos os genomas UENF possuem o operon *smeDEF*.

Durante a colonização, as bactérias podem se estabelecer em espaços intercelulares do rizoplano, através da atividade enzimas que degradam a parede celular, como celulase e xilanase (*xyI*) (Pedrosa *et al.*, 2011). Os isolados UENF-4GII e UENF-26GIII possuem genes da xilose isomerase (*xyIA*), xilose quinase (*xyIB*), proteína transportadora de xilose (*xyIE*), β -xylosidase (*xyI3A*), α -glucuronidase extracelular de xilano e o gene da xilosidase (*xsa*). Entretanto, no isolado UENF-5BGII foi encontrado apenas o gene *xyIB* (Figura 10).

Bactérias estabelecidas no rizoplano e endorizosfera podem se comunicar com células vegetais através da produção e secreção de proteínas efetoras, a fim de evitar a resposta do sistema imune das plantas (Ali *et al.*, 2014). A secreção de proteínas efetoras pode ocorrer através do sistema de secreção tipo II e IV, codificados por diversos genes presentes nos genomas UENF.

O sistema de comunicação célula-célula, conhecido como *quorum sensing*, no gênero *Stenotrophomonas*, se baseia nas moléculas da família do fator difusível de sinal - *Diffusible Signal Factor* (DSF) e pode influenciar positivamente a colonização e a promoção do crescimento das plantas (Alavi *et al.*, 2013). A produção e percepção de DSF é carregada pelos genes *rpfC*, G e F, sendo estes presentes em todos os genomas UENF. Nossos resultados indicam que os isolados UENF produzem e detectam DSF que podem influenciar a colonização das plantas.

4.5. Similaridade genômica

A utilização de ferramentas de bioinformática como o ANI são úteis para definir a taxonomia de procariotos (Figueras *et al.*, 2014). O ANI estima a identidade média de nucleotídeos entre dois genomas, sendo o limiar mínimo de 95% (Pritchard *et al.*, 2016) um dos principais critérios para considerar duas estirpes como da mesma espécie.

A análise de ANI dos isolados UENF foi conduzida com todos os genomas de *Stenotrophomonas* sp. disponíveis nos bancos de dados Genbank e JGI até julho de 2018, incluindo os genomas do gênero *Stenotrophomonas* sem espécie identificada. No total, 302 genomas foram obtidos dos bancos de dados. Foram identificados 59 genomas de *Stenotrophomonas* com porcentagens de ANI superior a 95 % quando comparadas com os isolados UENF (Tabela 8).

Tabela 8. Estirpes do gênero *Stenotrophomonas* com valores de ANI acima de 95% para cada isolado UENF.

Organismo	Estirpe	ANI		
		UENF_4GII	UENF_5BGII	UENF_26GIII
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	UENF-4GII	100,00%	92,53%	92,82%
<i>S. maltophilia</i>	DF07	97,88%	92,46%	92,82%
<i>S. maltophilia</i>	SmF22	97,80	92,50%	92,70%
<i>S. maltophilia</i>	Sm32COP	97,72	92,48%	92,79%
<i>S. maltophilia</i>	SmSOFb1	97,70%	92,40%	92,62%
<i>S. maltophilia</i>	B1	97,67%	92,52%	92,83%
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HMSC10F07	97,64%	92,56%	92,83%
<i>S. maltophilia</i>	mecca	96,88%	92,43%	92,73%
<i>S. maltophilia</i>	594	96,83%	92,41%	92,73%
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	DDT-1	96,25%	92,37%	92,73%
<i>S. maltophilia</i>	MC_2011_STM2	95,80%	92,53%	93,04%
<i>S. maltophilia</i>	MC_2010_STM2	95,78%	92,50%	93,02%
<i>S. maltophilia</i>	MC_2013	95,78%	92,53%	93,04%
<i>S. maltophilia</i>	MC_2012	95,77%	92,59%	93,02%
<i>S. maltophilia</i>	MC_2014	95,77%	92,55%	93,03%
<i>S. maltophilia</i>	E999	95,75%	92,50%	93,03%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2007_STM1	95,75%	92,43%	93,04%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2005	95,75%	92,43%	93,02%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2014_STM2	95,74%	92,43%	93,06%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2013	95,74%	92,41%	93,04%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2009_STM2	95,73%	92,42%	93,07%
<i>S. maltophilia</i>	1162_SMAL	95,73%	92,51%	93,06%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2007_STM2	95,72%	92,43%	93,05%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2006_STM2	95,72%	92,43%	93,03%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2008_STM1	95,72%	92,45%	93,06%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2008_STM2	95,71%	92,43%	93,01%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2012_STM2	95,71%	92,45%	93,04%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2006_STM1	95,70%	92,44%	93,05%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2009_STM1	95,70%	92,43%	93,03%
<i>S. maltophilia</i>	1247_SMAL	95,69%	92,53%	93,03%

<i>S. maltophilia</i>	TG_2014_STM1	95,69%	92,42%	93,03%
<i>S. maltophilia</i>	1182_SMAL	95,69%	92,52%	93,01%
<i>S. maltophilia</i>	TG_2012_STM1	95,68%	92,38%	93,02%
<i>S. maltophilia</i>	1100_SMAL	95,64%	92,49%	93,00%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	UENF-5BGII	92,44%	100,00%	93,76%
<i>S. maltophilia</i>	JV3	92,21%	96,27%	93,02%
<i>S. maltophilia</i>	CSM2	92,42%	95,93%	93,80%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	TD3	92,51%	95,80%	93,94%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	WZN-1	92,33%	95,36%	93,46%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	UENF-26GIII	92,78%	93,81%	100,00%
<i>S. maltophilia</i>	A2	92,80%	93,82%	99,04%
<i>S. maltophilia</i>	447_SMAL	92,80%	93,84%	98,74%
<i>S. maltophilia</i>	UV74	92,74%	93,77%	98,74%
<i>S. maltophilia</i>	1038	92,77%	93,83%	98,74%
<i>S. maltophilia</i>	F2	92,72%	93,70%	98,71%
<i>S. maltophilia</i>	1318	92,79%	93,76%	98,71%
<i>S. maltophilia</i>	ISMMS5	92,76%	93,82%	98,69%
<i>S. maltophilia</i>	S2722A9	92,83%	93,87%	98,67%
<i>S. maltophilia</i>	E729	92,62%	93,71%	98,66%
<i>S. maltophilia</i>	1136	92,75%	93,83%	98,64%
<i>S. maltophilia</i>	1302	92,73%	93,81%	98,61%
<i>S. maltophilia</i>	1304	92,72%	93,78%	98,61%
<i>S. maltophilia</i>	CV_2013	92,68%	93,73%	98,60%
<i>S. maltophilia</i>	941_SMAL	92,74%	93,79%	98,59%
<i>S. maltophilia</i>	AB550	92,76%	93,82%	98,58%
<i>S. maltophilia</i>	942_SMAL	92,77%	93,80%	98,56%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	UENF-5BGII	92,44%	100,00%	93,76%
<i>S. maltophilia</i>	JV3	92,21%	96,27%	93,02%
<i>S. maltophilia</i>	CSM2	92,42%	95,93%	93,80%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	TD3	92,51%	95,80%	93,94%
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	WZN-1	92,33%	95,36%	93,46%

Além disto, a porcentagem de identidade dos isolados UENF foram superiores a 95% para *S. maltophilia*, confirmando a designação de espécie dos mesmos. Observamos ainda que os valores de ANI de *Stenotrophomonas sp.* TD3, *Stenotrophomonas sp.* WZN-1, *Stenotrophomonas sp.* HMSC10F07 e *Stenotrophomonas sp.* DDT-1 sugerem que estas cepas pertencem à espécie *S. maltophilia* (Tabela 8).

No gráfico de calor (*heatmap*) de identidade genômica (Figura 15), fica evidenciado que os genomas UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII estão posicionados em três grupos distintos, aqui denominados G1, G2 e G3,

respectivamente. Embora da mesma espécie, os isolados UENF apresentaram valores de ANI com média de 93% de identidade entre si. Este fenômeno é comum em complexos específicos de espécies com grande diversidade metabólica, como o complexo *Ralstonia solanacearum* analisado por Remenant e colaboradores (2011).

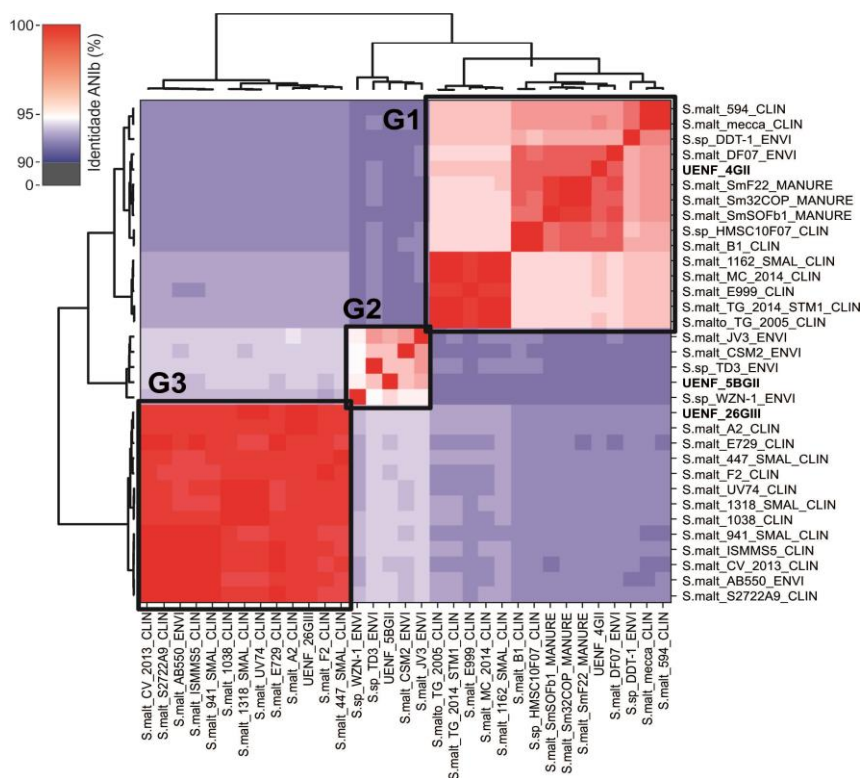


Figura 15. Heatmap ANI calculado entre os 59 genomas *Stenotrophomonas* sp. mais próximos dos isolados UENF. Áreas vermelhas correspondem à alta similaridade genômica e as áreas em azul indicam similaridade menor que 95%.

4.6. Análise de pangenoma

Análises de pangenoma podem proporcionar informações sobre a diversidade genômica de um grupo bacteriano específico (Tettelin *et al.*, 2008). Para obter informações sobre o *core* genoma, os genes específicos de subespécies e conteúdo genético específico (genoma único) dos isolados UENF, realizamos análises de pangenoma dos três subgrupos de *S. maltophilia* a qual estão inseridos.

A análise conduzida com 33 genomas (após a remoção de genomas redundantes) constituiu um pangenoma com 137.765 genes distribuídos em 18.067 famílias gênicas. Os genes ortólogos compartilhados entre todos os membros (*core*

genoma) são 1.788, o que representa 9,89% do tamanho do pangenoma. O genoma acessório (presente em mais de um genoma, porém não em todos) é composto por 70.114 genes distribuídos em 8.503 famílias gênicas (Figura 16).

O *core* genoma específico de cada subgrupo variou de 2.335 a 3.174 famílias gênicas, representando 12,92% (G1); 14,44% (G2) e 17,56% (G3) do tamanho do pangenoma. Os genes específicos das estirpes (genoma único) variaram de 17 a 640, sendo 182 presentes no genoma da UENF-4GII, 329 genes no UENF-5BGII e 122 no isolado UENF-26GIII.

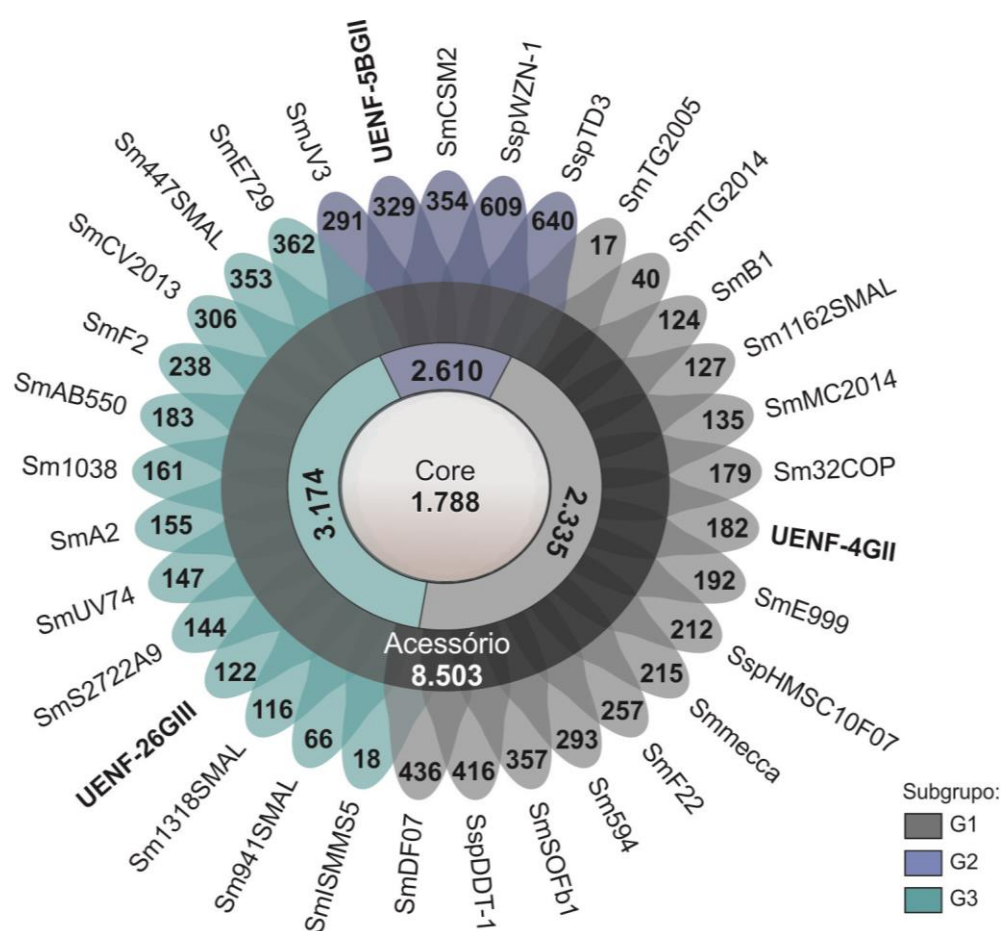


Figura 16. Gráfico de flor da distribuição do genoma core, acessório e único dos três subgrupos de *S. maltophilia*. De dentro para fora, o primeiro e o segundo círculo representam o número de genes core compartilhados entre todas as cepas e em cada subgrupo. O terceiro círculo representa o genoma acessório. O genoma único de cada isolado está representado em cada pétala.

O gráfico de pangenoma (Figura 17) mostra que, após a adição de todos os genes de 33 genomas, a curva ainda não atingiu um limite estável, o que sugere que o CSM possui um pangenoma do tipo aberto, ou seja, está em expansão e a adição de novos genomas é necessária para identificar com maior precisão os genes neste complexo. Pangenomas abertos são típicos de espécies que colonizam grande quantidade de ambientes e possuem um sistema múltiplo de troca de material genético, como no caso *S. maltophilia* (Deschamps *et al.*, 2014).

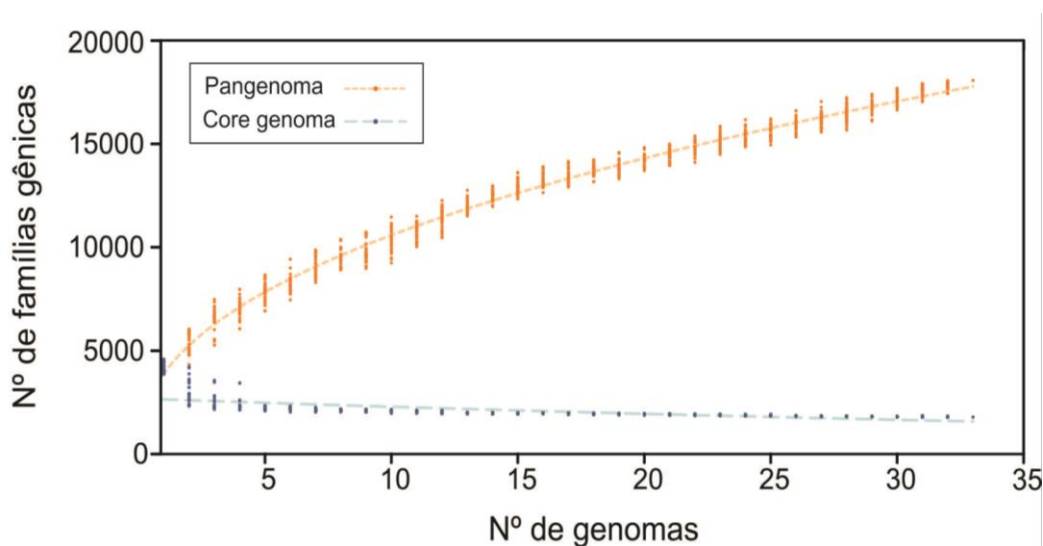


Figura 17. Análise do core e pangenoma de três subgrupos de *S. maltophilia*. O tamanho do pangenoma (laranja) e do conjunto de genes compartilhados (azul) foram plotados em função da inserção subsequente dos genomas considerados para análise.

Na análise é possível observar também que o tamanho do *core* genoma diminui com a inclusão de cada genoma na análise, demonstrando uma alta diversidade genética e heterogeneidade genômica entre os isolados. Além disto, o tamanho do pangenoma, que é quase dez vezes maior do que o *core* genoma, sugere que a variação mediada por transferência gênica não homóloga esteja desempenhando um papel na diversificação dos isolados de *S. maltophilia*.

Os estudos publicados com pangenoma de *Stenotrophomonas* são escassos. Yu e colaboradores (2016) determinaram o *core* genoma de *S. maltophilia*, usando 17 estirpes. As estirpes analisadas compartilharam 887 genes, dentro de um pangenoma aberto com 14.955 famílias gênicas. Em outro estudo, Patil e colaboradores (2016)

determinaram um pangenoma aberto de 9.031 genes e um *core* genoma de 1.917 genes para 33 genomas compreendendo estirpes de SM. Essas disparidades podem estar relacionadas com a quantidade de espécies distintas utilizadas, quanto mais distantes as espécies, maiores serão as diferenças nos genomas, bem como o uso de genomas completos e *draft*, reduzindo o número de genes presentes no *core* genoma, além da metodologia empregada nas análises.

4.7. Análise filogenética cgMLSA

A reconstrução filogenética cgMLSA foi realizada através das sequências de 255 genes cópia-única presentes no *core* genoma, que estão também presentes como cópia-única no banco de dados de referência de bactérias do BUSCO. Na análise, foram utilizados os genomas de *S. maltophilia* presentes no pangenoma e os genomas das espécies de *Stenotrophomonas* como grupo externo, totalizando 50 genomas. A árvore filogenética foi gerada com o método ML com o modelo de matriz MTMAM definido pelo programa Prottest 3.

O filograma apresentado na Figura 18a demonstra a quantidade de mutações entre as espécies do gênero ao longo da análise. É possível observar que todos os genomas inseridos nos subgrupos G1, G2 e G3 formaram um ramo bem delimitado com a espécie *S. maltophilia*. O baixo acúmulo de mutações genéticas da espécie justifica a distância de SM em relação às outras espécies do gênero. Além disto, a análise mostra que as estirpes pertencentes ao CSM estão inseridas no mesmo ramo que *S. pavanii*. De acordo com os estudos de Patil e colaboradores (2016), *S. pavanii* e *S. maltophilia* são relacionadas e pertencem ao CSM.

A partir dos resultados na figura 18b nota-se que dentro do ramo CSM a cepa UENF-5BGII formou um grupo contendo apenas cepas ambientais. O isolado UENF-4GII está inserido no ramo contendo isolados clínicos, ambientais e isolados oriundos de esterco; e o isolado UENF-26GIII, presente no clado contendo cepas predominantemente clínicas. O suporte estatístico para cada isolado foi satisfatório (suporte de bootstrap acima de 95%) e os resultados se correlacionam com as análises de ANI quanto à proximidade de cepas pertencentes ao mesmo subgrupo. Além disso, as estirpes *Stenotrophomonas* sp. TD3, *Stenotrophomonas* sp. WZN-1, *Stenotrophomonas* sp. DDT-1 e *Stenotrophomonas* sp. HMSC10F07, previamente

4.8. Resistoma

Com base nos resultados da filogenia cgMLSA, realizamos também a análise do perfil de genes resistência antimicrobiana pela base de dados CARD, que revelou a presença de 43 genes de resistência (Figura 19). Destes, 22 genes estão presentes em todos os isolados analisados, incluindo as beta-lactamases (*blaL1* e *blaL2*), situadas no cromossomo e características de *S. maltophilia*. Além destas enzimas também estão presentes no core genoma o gene da ribosiltransferase (*arr-2*), que confere a resistência à rifamicina e o gene *aph(3')-IIC*, que codifica uma aminoglicosídeo fosfotransferase que confere resistência intrínseca à aminoglicosídeos (Huang *et al.*, 2015).

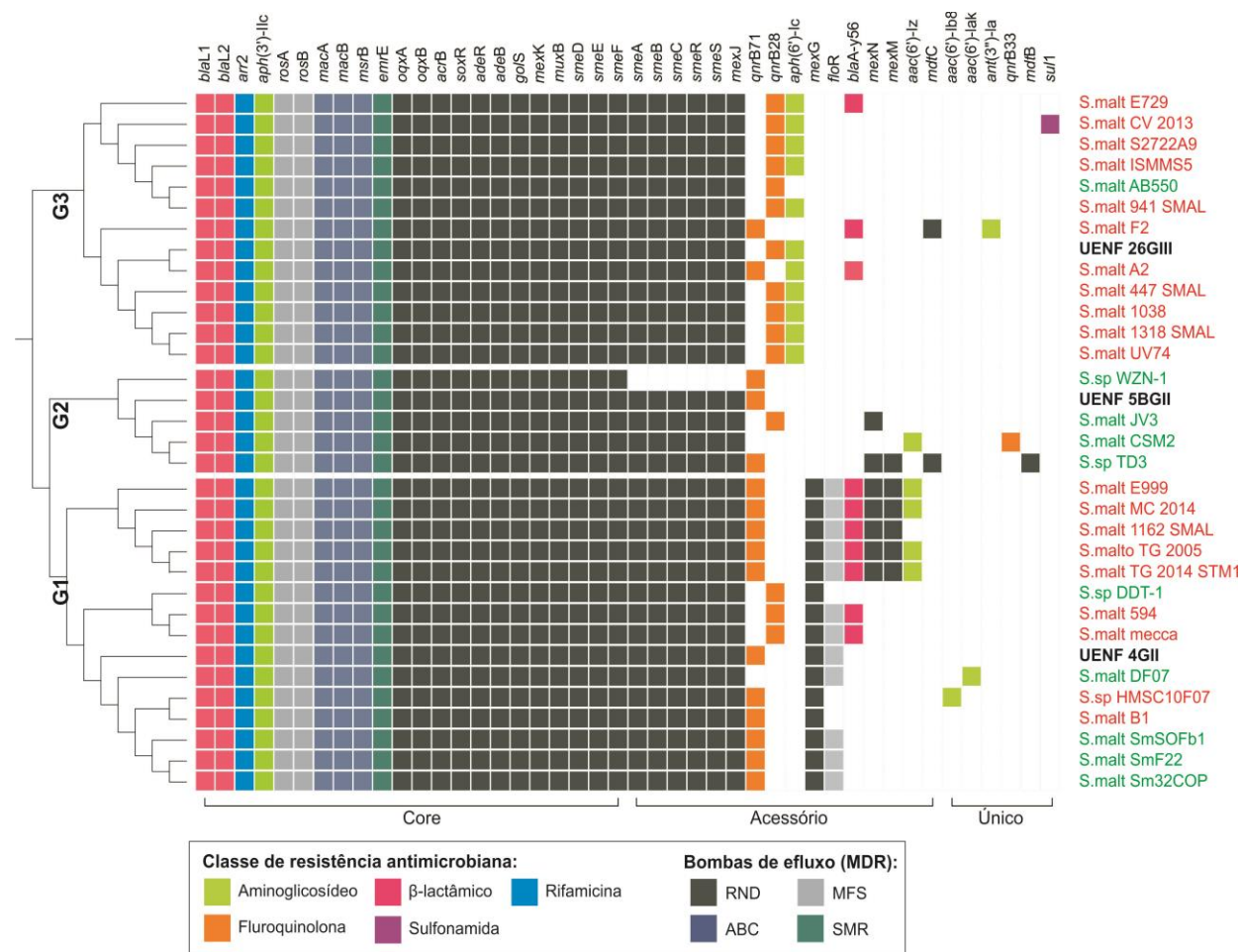


Figura 19. Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana e bomba de efluxo sobre a análise de pangenoma. As cepas oriundas de ambiente clínico estão destacadas na cor vermelha e as cepas de origem ambiental, na cor verde. Os isolados UENF estão destacados em negro.

Todas as cepas, exceto DF07, possuem o gene *qnr*, responsável pela resistência às quinolonas. O gene *blaA-y56*, envolvido na biossíntese da beta-lactamase de classe A (enzima isolada de *Yersinia enterocolitica*) e que confere resistência à carbenicilina (De la Prieta *et al.*, 2006), está presente apenas nos isolados clínicos distribuídos nos subgrupos G1 e G3. O gene *sul1*, responsável pela resistência à classe de antibióticos trimetoprim e sulfametoxazol (Toleman *et al.*, 2007), está presente exclusivamente no isolado CV2013.

O core genoma de *S. maltophilia* possui quatro famílias de bombas de efluxo clássicas: MFS (*rosAB*), SMR (*emrE*), ABC (*msrB* e *macAB*) e RND (Sánchez, 2015; Youenou *et al.*, 2015). Os genes da bomba de efluxo do tipo RND (i.e. *smeABC*) foi perdido apenas em *Stenotrophomonas* sp. WZN-1. O complexo MexNM está presente em cinco isolados clínicos do subgrupo G1 e a cepa TD3 do subgrupo G2. Ademais, o homólogo do gene *mexG*, responsável pela regulação da bomba MexGHI, está presente em todos os genomas do subgrupo G1, incluindo do isolado UENF-4GII, sugerindo o possível envolvimento deste em outros processos regulatórios do subgrupo (Sun *et al.*, 2014).

O gene *floR*, que confere resistência ao cloranfenicol através da síntese de uma proteína exportadora do tipo MFS, encontra-se distribuído no genoma acessório do subgrupo G1, com exceção dos isolados *Stenotrophomonas* sp. DDT-1, *Stenotrophomonas* sp. HMSC10F07 e *S. maltophilia* B1 (He *et al.*, 2014).

Os isolados UENF não apresentaram genes exclusivos relacionados a resistência antimicrobiana. No genoma acessório estão presentes genes de enzimas modificadoras de quinolonas (*qnrB71* e *qnrB28*) e aminoglicosídeos (*aph(6')*-Ic), sendo estes relacionados à resistência antimicrobiana intrínseca da espécie. A maior parte dos antibióticos relacionados aos genes de resistência encontrados foram originalmente isolados de *Streptomyces*, um gênero extremamente abundante na composição do solo (total de 576 espécies descritas) (Labeda, 2011). Portanto, a resistência a antibióticos de *Streptomyces* é essencial para a sobrevivência de *Stenotrophomonas* no solo.

5. CONCLUSÃO

A montagem dos dados de sequenciamento das cepas UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII apresentaram genomas de alta qualidade.

As anotações de cada isolado UENF revelaram o potencial genômico para promoção do crescimento vegetal, biorremediação e biocontrole com genes envolvidos na mineralização de fosfato, produção de auxina, biossíntese de espermidina, resistência a metais tóxicos e produção de enzimas contra fitopatógenos.

Os testes *in vitro*, confirmaram a capacidade dos isolados de tolerar diferentes concentrações de Cr hexavalente e a habilidade fenotípica para inibição de fungos pela cepa UENF-4GII.

As cepas UENF-4GII, UENF-5BGII e UENF-26GIII foram caracterizadas como pertencentes a diferentes subgrupos do complexo *S. maltophilia*. O pangenoma realizado com os genomas mais similares aos isolados UENF revelou alta diversidade genética e diversidade genômica dos três subgrupos do CSM.

O resistoma dos isolados UENF não apresentou genes exclusivos de resistência antimicrobiana, sendo a maior parte do conjunto de resistência constituída por bombas de efluxo e outros genes intrínsecos da espécie.

Este trabalho servirá como base para futuros projetos envolvendo os isolados UENF, particularmente quanto às suas aplicações biotecnológicas.

6. REFERÊNCIAS

- Aguiar, K. P. (2012). *Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Biociencias e Biotecnologia, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). *Assessment of plant growth promoting activities of rhizobacterium Pseudomonas putida under insecticide-stress* (Vol. 62).
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, 7(3), 196-208.
- Alavi, P., Müller, H., Cardinale, M., *et al.* (2013). The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. *PLOS ONE*, 8(7), e67103.

- Alavi, P., Starcher, M. R., Thallinger, G. G., *et al.* (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC genomics*, *15*(1), 482.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. *ESA Working Paper No. 12-03*.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869-881.
- Ali, S., Duan, J., Charles, T. C., *et al.* (2014). A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *Journal of theoretical biology*, *343*, 193-198.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, *25*(17), 3389-3402.
- Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., *et al.* (2016). plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, *32*(22), 3380-3387.
- Antonioli, P., Lampis, S., Chesini, I., *et al.* (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(21), 6854-6863.
- Arya, N., Rana, A., Rajwar, A., *et al.* (2018). Biocontrol efficacy of siderophore producing indigenous *Pseudomonas* strains against *Fusarium* wilt in tomato. *National Academy Science Letters*, *41*(3), 133-136.
- Aslam, F., Yasmin, A., & Thomas, T. (2018). Essential gene clusters identified in *Stenotrophomonas* MB339 for multiple metal/antibiotic resistance and xenobiotic degradation. *Current microbiology*, *75*(11), 1484-1492.
- Assis, R. A. B., Polloni, L. C., Patané, J. S. L., *et al.* (2017). Identification and analysis of seven effector protein families with different adaptive and evolutionary histories in plant-associated members of the Xanthomonadaceae. *Scientific Reports*, *7*(1), 16133.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., *et al.* (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), 233-266.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., *et al.* (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, *19*(5), 455-477.
- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., *et al.* (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *3*(2), 97-110.
- Behnsen, J., & Raffatellu, M. (2016). Siderophores: more than stealing iron. *MBio*, *7*(6), e01906-01916.
- Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 149.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, *35*, 1044-1051.

- Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., *et al.* (2015). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D30.
- Bibra, M., Krishnaraj, R. N., & Sani, R. K. (2017). An overview on extremophilic chitinases *Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy* (pp. 225-247): Springer.
- Bodirsky, B. L., Popp, A., Lotze-Campen, H., *et al.* (2014). Reactive nitrogen requirements to feed the world in 2050 and potential to mitigate nitrogen pollution. *Nat Commun*, 5, 3858.
- Bodirsky, B. L., Rolinski, S., Biewald, A., *et al.* (2015). Global food demand scenarios for the 21st century. *PLOS ONE*, 10(11), e0139201.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., *et al.* (2016). UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View. *Methods Mol Biol*, 1374, 23-54.
- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2-41.
- Busato, J. G., Lima, L. S., Aguiar, N. O., *et al.* (2012). Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresource technology*, 110, 390-395.
- Busato, J. G., Zandonadi, D. B., Mol, A. R., *et al.* (2017). Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. *J Sci Food Agric*, 97(3), 949-955.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973.
- Carneiro, A. R., Ramos, R. T. J., Barbosa, H. P. M., *et al.* (2012). Quality of prokaryote genome assembly: indispensable issues of factors affecting prokaryote genome assembly quality. *Gene*, 505(2), 365-367.
- Chan, K. G., Chong, T. M., Kher, H. L., *et al.* (2015). Whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* ZBG7B reveals its biotechnological potential. *Genome announcements*, 3(6), e01442-01415.
- Chattopadhyay, G. N. (2012). Use of vermicomposting biotechnology for recycling organic wastes in agriculture. *International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 1(1), 8.
- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., & Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific Reports*, 6, 24373.
- Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, Q., *et al.* (2015). Earthworms modify microbial community structure and accelerate maize stover decomposition during vermicomposting. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 17161-17170.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1637-1645.

- Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., *et al.* (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome biology*, 9(4), R74.
- Crowley, D. E. (2006). Microbial siderophores in the plant rhizosphere *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms* (pp. 169-198): Springer.
- Dadhich, S., Pandey, A., Prasanna, R., *et al.* (2012). *Optimizing crop residue-based composts for enhancing soil fertility and crop yield of rice** (Vol. 82).
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., *et al.* (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27(8), 1164-1165.
- Das, S., & Dash, H. R. (2014). Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 1-21): Elsevier.
- Das, S., Dash, H. R., & Chakraborty, J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2967-2984.
- De la Prieta, M. C., Francia, M. V., Seoane, A., *et al.* (2006). Characterization of defective β -lactamase genes in *Yersinia enterocolitica*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 58(3), 661-664.
- Deeba, F., Abdullah, S., Irfan, M., *et al.* (2016). Chitinase production in organisms: a review. *Punjab University Journal of Zoology*, 31(1), 101-106.
- Del-Angel, V. D., Hjerde, E., Sterck, L., *et al.* (2018). Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. *F1000Research*, 7.
- Deschamps, P., Zivanovic, Y., Moreira, D., *et al.* (2014). Pangenome evidence for extensive interdomain horizontal transfer affecting lineage core and shell genes in uncultured planktonic thaumarchaeota and euryarchaeota. *Genome biology and evolution*, 6(7), 1549-1563.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., *et al.* (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212.
- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*: Embrapa SPI.
- Dubey, K. K., & Fulekar, M. (2012). Chlorpyrifos bioremediation in Pennisetum rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1715-1725.
- Duca, D., Lory, J., Patten, C. L., *et al.* (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125.
- Dungan, R. S., Yates, S. R., & Frankenberger Jr, W. T. (2003). Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. *Environmental Microbiology*, 5(4), 287-295.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792-1797.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.

- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., *et al.* (2011). Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and fertility of soils*, 47(2), 197-205.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., *et al.* (2018). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D427-D432.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., *et al.* (1998). Base-calling of automated sequencer traces usingPhred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, 8(3), 175-185.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368-376.
- Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M. J., *et al.* (2014). Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis. *Genome announcements*, 2(6), e00927-00914.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. *Science*, 269(5223), 496-512.
- Fuentes, B., Jorquera, M., & de la Luz Mora, M. (2009). Dynamics of phosphorus and phytate-utilizing bacteria during aerobic degradation of dairy cattle dung. *Chemosphere*, 74(2), 325-331.
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., *et al.* (2014). Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res*, 43(D1), D261-D269.
- Gandhi, N. U., & Chandra, S. B. (2012). A comparative analysis of three classes of bacterial non-specific acid phosphatases and archaeal phosphoesterases: evolutionary perspective. *Acta Informatica Medica*, 20(3), 167-173.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., *et al.* (2017). Bacterial Probiotics: A Truly Green Revolution *Probiotics and Plant Health* (pp. 131-162): Springer.
- García-León, G., Hernández, A., Hernando-Amado, S., *et al.* (2014). A function of the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF is the colonization of the roots of the plants. *Applied and environmental microbiology*, AEM. 01058-01014.
- Giovanella, P., Cabral, L., Bento, F. M., *et al.* (2016). Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas* sp. B50A. *New biotechnology*, 33(1), 216-223.
- Glick. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology advances*, 28(3), 367-374.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 15.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., *et al.* (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., *et al.* (2017). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412.

- Guizelini, D., Raittz, R. T., Cruz, L. M., *et al.* (2016). GFinisher: a new strategy to refine and finish bacterial genome assemblies. *Scientific Reports*, 6, 34963.
- Guo, L., Wu, G., Li, C., *et al.* (2015). Vermicomposting with maize increases agricultural benefits by 304 %. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(3), 1149-1155.
- Gupta, A., Gopal, M., Thomas, G. V., *et al.* (2014). Whole Genome Sequencing and Analysis of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Plantation Crops Coconut, Cocoa and Arecanut. *PLOS ONE*, 9(8), e104259.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., *et al.* (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7, 96-102.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., *et al.* (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307.
- Habib, S. H., Kausar, H., & Saud, H. M. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. *Biomed Res Int*, 2016.
- Hall, N. (2007). Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol*, 210(Pt 9), 1518-1525.
- Hashemimajd, K., Kalbasi, M., Golchin, A., *et al.* (2004). Comparison of Vermicompost and Composts as Potting Media for Growth of Tomatoes. *Journal of Plant Nutrition*, 27(6), 1107-1123.
- Hassan, T. U., & Bano, A. (2016). Comparative effects of wild type *Stenotrophomonas maltophilia* and its indole acetic acid-deficient mutants on wheat. *Plant Biology*, 18(5), 835-841.
- He, T., Shen, J., Schwarz, S., *et al.* (2014). Characterization of a genomic island in *Stenotrophomonas maltophilia* that carries a novel floR gene variant. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(4), 1031-1036.
- Holst-Jensen, A., Spilsberg, B., Arulandhu, A. J., *et al.* (2016). Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(17), 4595-4614.
- Hou, W., Ma, Z., Sun, L., *et al.* (2013). Extracellular polymeric substances from copper-tolerance *Sinorhizobium meliloti* immobilize Cu²⁺. *Journal of hazardous materials*, 261, 614-620.
- Huang, T.-P., Somers, E. B., & Wong, A. C. L. (2006). Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of bacteriology*, 188(8), 3116-3120.
- Huang, Y. W., Hu, R. M., Lin, Y. T., *et al.* (2015). The contribution of class 1 integron to antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microbial Drug Resistance*, 21(1), 90-96.
- Hugh, R., & Ryschenkow, E. (1961). *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *Microbiology*, 26(1), 123-132.

- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., *et al.* (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 119-119.
- Imada, E. L., Rolla, A. A. P. S., Oliveira, A. L. M., *et al.* (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. *Research in microbiology*, 168(3), 283-292.
- Imam, J., Shukla, P., Prasad-Mandal, N., *et al.* (2017). Microbial interactions in plants: perspectives and applications of proteomics. *Current Protein and Peptide Science*, 18(9), 956-965.
- Intorne, A. C., de Oliveira, M. V. V., Pereira, L. d. M., *et al.* (2012). Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Int Microbiol*, 15(2), 69-78.
- Itoh, Y., Rice, J. D., Goller, C., *et al.* (2008). Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly- β -1, 6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of bacteriology*, 190(10), 3670-3680.
- Jabeen, F., Hussain, A., Manzoor, M., *et al.* (2018). Potential of bacterial chitinolytic, *Stenotrophomonas maltophilia*, in biological control of termites. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 86.
- Jain, H. K. (2010). *Green revolution: history, impact and future: THE GREEN REVOLUTION: HISTOR.*
- Jankiewicz, U., Brzezinska, M. S., & Saks, E. (2012). Identification and characterization of a chitinase of *Stenotrophomonas maltophilia*, a bacterium that is antagonistic towards fungal phytopathogens. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(1), 30-35.
- Jankiewicz, U., Larkowska, E., & Brzezinska, M. S. (2016). Production, characterization, gene cloning, and nematocidal activity of the extracellular protease from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121(6), 614-618.
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., *et al.* (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D566-d573.
- Jorquera, M., Martinez, O., Maruyama, F., *et al.* (2008). Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. *Microbes and environments*, 23(3), 182-191.
- Joshi, K. K., Kumar, V., Dubey, R. C., *et al.* (2006). *Effect of Chemical Fertilizer-adaptive Variants, Pseudomonas aeruginosa GRC2 and Azotobacter chroococcum AC1, on Macrophomina phaseolina Causing Charcoal Rot of Brassica juncea* (Vol. 25).
- Kader, J., Sannasi, P., Othman, O., *et al.* (2007). Removal of Cr (VI) from aqueous solutions by growing and non-growing populations of environmental bacterial consortia. *Global Journal of Environmental Research*, 1(1), 12-17.
- Kakar, K. U., Nawaz, Z., Cui, Z., *et al.* (2018). Rhizosphere-associated *Alcaligenes* and *Bacillus* strains that induce resistance against blast and sheath blight diseases, enhance plant growth and improve mineral content in rice. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 779-796.

- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., *et al.* (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*, 45(Database issue), D353-361.
- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol*, 428(4), 726-731.
- Kim, Y. O., Lee, J. K., Kim, H. K., *et al.* (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 162(1), 185-191.
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J., *et al.* (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1047-1054.
- Krawczyk, P. S., Lipinski, L., & Dziembowski, A. (2018). PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res*, 46(6), e35.
- Külcü, R., & Yaldiz, O. (2014). The composting of agricultural wastes and the new parameter for the assessment of the process. *Ecological Engineering*, 69, 220-225.
- Kumar, A. (2016). Phosphate Solubilizing Bacteria in Agriculture Biotechnology: Diversity, Mechanism and their Role in Plant Growth and Crop Yield. *International Journal of Advanced Research*, 4(4), 116-124.
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8), 493-499.
- Kupferschmied, P., Maurhofer, M., & Keel, C. (2013). Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Frontiers in plant science*, 4, 287.
- Labeda, D. P. (2011). Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(10), 2525-2531.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *nature*, 409(6822), 860-921.
- Lander, E. S., & Waterman, M. S. (1988). Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis. *Genomics*, 2(3), 231-239.
- Laslett, D., & Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*, 32(1), 11-16.
- Lawton, T. J., Kenney, G. E., Hurley, J. D., *et al.* (2016). The CopC family: structural and bioinformatic insights into a diverse group of periplasmic copper binding proteins. *Biochemistry*, 55(15), 2278-2290.
- Letunic, I., & Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res*, 44(W1), W242-W245.
- Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., *et al.* (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1076-1086.

- Lim, B. L., Yeung, P., Cheng, C., *et al.* (2007). Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME journal*, 1(4), 321.
- Lim, S. L., Lee, L. H., & Wu, T. Y. (2016). Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *Journal of Cleaner Production*, 111, 262-278.
- Lira, F., Berg, G., & Martínez, J. L. (2017). Double-Face Meets the Bacterial World: The Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*, 8(2190).
- Liu, L., Li, Y., Li, S., *et al.* (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 11.
- Lu, C., & Tian, H. (2017). Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth Syst. Sci. Data*, 9(1), 181-192.
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5), 265-279.
- MacGregor, S. T., Miller, F. C., Psarianos, K. M., *et al.* (1981). Composting process control based on interaction between microbial heat output and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(6), 1321-1330.
- 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(4), 425-433.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., *et al.* (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 43(D1), D222-D226.
- Marra, L. M., Oliveira-Longatti, S. M., Soares, C. R. F. S., *et al.* (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 367-375.
- Matteoli, F. P. (2018). *Genômica de bactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas de vermicompostos*. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências Biotecnologia, UENF. Campos dos Goytacazes, RJ.
- May, J. J., Wendrich, T. M., & Marahiel, M. A. (2001). The dhb operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7209-7217.
- McArthur, J. W., & McCord, G. C. (2017). Fertilizing growth: Agricultural inputs and their effects in economic development. *Journal of Development Economics*, 127(Supplement C), 133-152.
- McNear-Jr, D. H. (2013). The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge*, 4(3).
- Médigue, C., & Moszer, I. (2007). Annotation, comparison and databases for hundreds of bacterial genomes. *Research in microbiology*, 158(10), 724-736.
- Messiha, N., Van Diepeningen, A., Farag, N. S., *et al.* (2007). *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *European journal of plant pathology*, 118(3), 211-225.

- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., *et al.* (2015). Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *J Mol Biol*, 427(21), 3389-3406.
- Miller, J. R., Koren, S., & Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95(6), 315-327.
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1706.
- Mubarik, N., Irni, M., Amaryllis, A., *et al.* (2010). *Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Its Application as Biocontrol for Whitefly (Bemisia tabaci Genn.)* (Vol. 5).
- Mukhametzyanova, A. D., Akhmetova, A. I., & Sharipova, M. R. (2012). Microorganisms as phytase producers. *Microbiology*, 81(3), 267-275.
- Mukherjee, P., & Roy, P. (2013). Purification and identification of trichloroethylene induced proteins from *Stenotrophomonas maltophilia* PM102 by immuno-affinity-chromatography and MALDI-TOF Mass spectrometry. *SpringerPlus*, 2(1), 207.
- Mukherjee, P., & Roy, P. (2016). Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment. *Frontiers in Microbiology*, 7(967).
- Na, X., Xu, T., Li, M., *et al.* (2018). Variations of Bacterial Community Diversity Within the Rhizosphere of Three Phylogenetically Related Perennial Shrub Plant Species Across Environmental Gradients. *Frontiers in Microbiology*, 9(709).
- Nagarajan, N., & Pop, M. (2013). Sequence assembly demystified. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 157.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2-3), 313-339.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., *et al.* (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual review of microbiology*, 64, 43-60.
- Oliveira-Garcia, D., Dall'Agnol, M., Rosales, M., *et al.* (2003). Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cellular Microbiology*, 5(9), 625-636.
- Palleroni, N. J., & Bradbury, J. F. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int J Syst Bacteriol*, 43(3), 606-609.
- Pan, X., Lin, D., Zheng, Y., *et al.* (2016). Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: characterization and genome functional analysis. *Scientific Reports*, 6, 21332.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., *et al.* (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2), 127-133.
- Patil, P. P., Midha, S., Kumar, S., *et al.* (2016). Genome sequence of type strains of genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 309.
- Patten, C. L., Blakney, A. J. C., & Coulson, T. J. D. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(4), 395-415.

- Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wassem, R., *et al.* (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS genetics*, 7(5), e1002064.
- Pingali, P. L. (2012). Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12302-12308.
- Piński, A., & Hupert-Kocurek, K. (2017). Genomic Analysis of Plant-Associated Bacteria and Their Potential in Enhancing Phytoremediation Efficiency. *Journal of Ecological Engineering*, 18(4).
- Polprasert, C. (2007). *Organic Waste Recycling : Technology and Management - Third Edition*. PB - IWA Publishing.
- Pritchard, L., Glover, R. H., Humphris, S., *et al.* (2016). Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Analytical Methods*, 8(1), 12-24.
- Radzki, W., Mañero, F. J. G., Algar, E., *et al.* (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(3), 321-330.
- Raman, N., Asokan, S., Sundari, N. S., *et al.* (2018). Bioremediation of chromium (VI) by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from tannery effluent. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(1), 207-216.
- Reinhardt, E., Ramos, P. L., Manfio, G. P., *et al.* (2008). Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 414-422.
- Remenant, B., Cambiaire, J. C., Cellier, G., *et al.* (2011). *Ralstonia solanacearum* Strains Form a Single Genomic Species Despite Divergent Lifestyles. *PLOS ONE*, 6(9), e24356.
- Renshaw, J. C., Robson, G. D., Trinci, A. P. J., *et al.* (2002). Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research*, 106(10), 1123-1142.
- Rhee, J., Choi, J. Y., Choi, M., *et al.* (2013). Distinct groups and antimicrobial resistance of clinical *Stenotrophomonas maltophilia* complex isolates from Korea. *Journal of medical microbiology*, 62(5), 748-753.
- Richardson, E. J., & Watson, M. (2013). The automatic annotation of bacterial genomes. *Briefings in Bioinformatics*, 14(1), 1-12.
- Richter, M., & Rossello-Mora, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(45), 19126-19131.
- Rodrigues, G. L. (2018). *Análises genômicas de duas Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas de fruteiras*. Dissertação
- (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências Biotecnologia, UENF. Campos dos Goytacazes, RJ.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., *et al.* (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1), 15-21.

- Rousseaux, S., Hartmann, A., & Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 211-222.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., *et al.* (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 514.
- Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 658.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Santamarina, M., Ibáñez, M., Marqués, M., *et al.* (2017). Bioactivity of essential oils in phytopathogenic and post-harvest fungi control. *Natural product research*, 31(22), 2675-2679.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., *et al.* (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.
- Silver, S., & Walden, W. (2012). *Metal ions in gene regulation*: Springer Science & Business Media.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., *et al.* (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011). Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 17(2), 93-103.
- Singh, P., Kumar, V., & Agrawal, S. (2014). Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. *International journal of microbiology*, 2014.
- Sinha, R. K., Heart, S., Valani, D., *et al.* (2009). Vermiculture and sustainable agriculture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5(S), 01-55.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(4).
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, 31(4), 425-448.
- Stahl, A., Pletzer, D., Mehmood, A., *et al.* (2015). *Marinobacter adhaerens* HP15 harbors two CzcCBA efflux pumps involved in zinc detoxification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(3), 649-658.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stein, L. (2001). Genome annotation: from sequence to biology. *Nature Reviews Genetics*, 2(7), 493.
- Suckstorff, I., & Berg, G. (2003). Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 656-663.

- Suma, K., & Podile, A. R. (2013). Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. *Bioresource technology*, 133, 213-220.
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.
- Sureshbabu, K., Amaresan, N., & Kumar, K. (2016). *Amazing Multiple Function Properties of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere Soil* (Vol. 5).
- Swings, J., De Vos, P., den MOOTER, M. V., *et al.* (1983). Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(2), 409-413.
- TAG, I. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature*, 408(6814), 796.
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., *et al.* (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and environmental microbiology*, 75(3), 748-757.
- Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Hoffman, A., *et al.* (2010). Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS genetics*, 6(5), e1000943.
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., *et al.* (2017). Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8, 171.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology, Fifth Edition*, Sinauer Associates, Inc.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., *et al.* (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current opinion in microbiology*, 11(5), 472-477.
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., *et al.* (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383-399.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., Bennett, D. M., *et al.* (2007). Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of *sul* genes. *Emerging infectious diseases*, 13(4), 559.
- Tonder, A. J. V., Mistry, S., Bray, J. E., *et al.* (2014). Defining the Estimated Core Genome of Bacterial Populations Using a Bayesian Decision Model. *PLOS Computational Biology*, 10(8), e1003788.
- Ullah, A., Heng, S., Munis, M. F. H., *et al.* (2015). Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 117, 28-40.
- Umesha, S., Singh, K. P., & Singh, P. R. (2018). Chapter 6 - Microbial Biotechnology and Sustainable Agriculture. In R. L. Singh & S. Mondal (Eds.), *Biotechnology for Sustainable Agriculture* (pp. 185-205): Woodhead Publishing.
- United Nations. (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. *ESA/P/WP/248*.

- Vaikuntapu, P. R., Rambabu, S., Madhuprakash, J., *et al.* (2016). A new chitinase-D from a plant growth promoting *Serratia marcescens* GPS5 for enzymatic conversion of chitin. *Bioresource technology*, 220, 200-207.
- Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., *et al.* (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Current opinion in microbiology*, 23, 148-154.
- Wetterstrand, K. A. (2018). DNA sequencing costs: data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). Retrieved 13/12/2018
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., *et al.* (2002). *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 6), 1937-1944.
- Wu, Y., Wang, Y., Li, J., *et al.* (2015). Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain B418, a promising agent for biocontrol of plant pathogens and root-knot nematode. *Genome announcements*, 3(1), e00015-00015.
- Xiao, C., Chi, R., He, H., *et al.* (2009). Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. *Journal of Central South University of Technology*, 16(4), 581-587.
- Xie, J., Shi, H., Du, Z., *et al.* (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific Reports*, 6, 21329.
- Xie, S. S., Wu, H. J., Zang, H. Y., *et al.* (2014). Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(7), 655-663.
- Yandell, M., & Ence, D. (2012). A beginners guide to eukaryotic genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, 13, 329.
- Yang, H. C., Fu, H. L., Lin, Y. F., *et al.* (2012). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Current topics in membranes* (Vol. 69, pp. 325-358): Elsevier.
- Youenou, B., Favre-Bonte, S., Bodilis, J., *et al.* (2015). Comparative genomics of environmental and clinical *Stenotrophomonas maltophilia* strains with different antibiotic resistance profiles. *Genome biology and evolution*, 7(9), 2484-2505.
- Yu, D., Yin, Z., Li, B., *et al.* (2016). Gene flow, recombination, and positive selection in *Stenotrophomonas maltophilia*: mechanisms underlying the diversity of the widespread opportunistic pathogen. *Genome*, 59(12), 1063-1075.
- Zerbino, D. R. (2010). Using the velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current protocols in bioinformatics*, 31(1), 11.15. 11-11.15. 12.
- Zhang, Y., & Sievert, S. M. (2014). Pan-genome analyses identify lineage- and niche-specific markers of evolution and adaptation in Epsilonproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 110.
- Zhang, Z., & Yuen, G. Y. (2000). The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*, 90(4), 384-389.
- Zhou, C., Ma, Z., Zhu, L., *et al.* (2016). Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 976.
- Zhu, B., Liu, H., Tian, W. X., *et al.* (2012). Genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* RR-10, isolated as an endophyte from rice root. *Journal of bacteriology*, 194(5), 1280-1281.