

KARENT JURLEYD ROMERO GUTIÉRREZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE *Burkholderia* spp. ISOLADAS DE
DIFERENTES HOSPEDEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO

2019

KARENT JURLEYD ROMERO GUTIÉRREZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FISIOLÓGICA DE *Burkholderia* spp. ISOLADAS DE
DIFERENTES HOSPEDEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gutiérrez, Karent Jurleyd
Diversidade genética e fisiológica de
Burkholderia spp. isoladas de diferentes
hospedeiros / Karent Jurleyd Gutiérrez; orientador
Wellington Luiz Araújo. -- São Paulo, 2019.
75 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ecologia Microbiana. 2. Biotecnologia. 3.
Controle Biológico. 4. Burkholderia spp.. 5.
Complexo Burkholderia cepacia. I. Luiz Araújo,
Wellington, orientador. II. Título.



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **829/2016** referente ao projeto intitulado: "**Diversidade genética e fisiológica de *Burkholderia spp.* isoladas de diferentes hospedeiros**" sob a responsabilidade de **Karent Jurleyd Romero Gutiérrez** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Gabriel Padilla Maldonado**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 17 de agosto de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Recebi em 5/09/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Karent Jurleyd Romero Gutiérrez.

Título da Dissertação: Diversidade genética e fisiológica de *Burkholderia* spp. isoladas de diferentes hospedeiros.

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz Araújo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, pela orientação, apoio e oportunidade dada para concretizar um importante passo profissional e acadêmico na minha vida.

A minha família, Elsa Marina Gutiérrez Almansa (mãe), Cesar Augusto Romero Hernandez (pai), e Juan Sebastian Romero Gutiérrez (irmão), pelo amor, orações, credibilidade, e apoio incondicional dado, mesmo na distância que nos separa de um país ao outro.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana do Professor Dr. Welington Luiz de Araújo: Joha, Lina, Aleja, Jeni, Lari, Ricardo, Manu, Lele, Pricila, Sarina e agregados.

A todos os amigos, colegas e integrantes do laboratório de Bioprodutos do Prof. Dr. José Gregório Gomez e Prof. Dra Luizina Ferreira da Silva, que me acompanharam e apoiaram do início ao fim do meu mestrado: Mire, Rosy, Sofi, Edimar, Henrique, Pedro, Aline, Jeffrey e agregados.

Aos meus amigos Juan Manuel Carvajalino, Almir José Ferreira, Faride Lamadrid Feris, Alan Góis, Ximena Valencia, e Alexis Guzman, que foram meus companheiros de moradia durante meu mestrado no Brasil, com quem compartilhei inúmeros jantares e cafés da manhã gostosos, risadas, viagens, datas especiais, troca de cultura, pensamentos, crenças, e é claro, também foram meu apoio em momentos de tristeza, fazendo com que este tempo no Brasil se tenha tornado mais divertido, cheio de aprendizados e boas lembranças.

Ao meu parceiro Lucas Cardoso da Rosa Xavier por me acompanhar desde meus primeiros dias neste país maravilhoso até hoje, sempre me apoiando, acompanhando, motivando e ajudando no que estivesse a seu alcance para eu conseguir cumprir este grande logro de vida.

Aos meus amigos de vida Fernanda Esposito, Yashini Sagoenie, Daniela Teruya, Isabel Casillas e Agustín Camacho pelo companheirismo, troca de experiências e amizade sempre dada.

A Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, professor do laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas - ICB II - 2º andar - sala 240, pela disponibilização do espaço e materiais para o desenvolvimento dos testes de antagonismo.

A todos os companheiros, professores, e funcionários do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade dos equipamentos e espaços acadêmicos que contribuíram para o meu crescimento científico.

A meus chefes Otto Heringer e Danilo Zamprônio, e companheira de trabalho Dayane Castro, da empresa LOTAN aonde trabalho atualmente, porque me tem brindado todo seu apoio e motivação, além de flexibilidade no meu trabalho para assim poder finalizar os meus compromissos com o meu mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que foram cruciais no suporte e motivação para a realização desta pesquisa.

Muito Obrigada!

Muchas Gracias!

Thank you!

RESUMO

Gutiérrez K J. Diversidade genética e fisiológica de *Burkholderia* spp. isoladas de diferentes hospedeiros. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bactérias do gênero *Burkholderia* são dominantes na rizosfera de cana-de-açúcar. Este gênero inclui mais de 117 espécies capazes de colonizar diferentes nichos no solo, água, plantas ou animais, podendo ser patogênicas para as plantas e animais, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Além disso, apresentam potencial aplicação no controle biológico de fitopatógenos, como promotores de crescimento vegetal, biorremediação e produtores de moléculas de interesse na medicina, agricultura e indústria. A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, isolada endofiticamente de raiz de cana-de-açúcar, tem a capacidade de inibir fungos e bactérias patogênicas. Estudos anteriores mostraram que esta linhagem pode controlar fitopatógenos in planta e in vitro. Tendo em vista que membros do gênero *Burkholderia* podem viver comensalmente em plantas e serem patogênicas a animais, no presente estudo, a diversidade genética e fisiológica de quinze isolados de *Burkholderia* spp. obtidos de diferentes ambientes foi avaliada por meio da a) técnica de MLSA (Multilocus sequence analysis) utilizando a sequência dos genes *rRNA 16S*, *atpD* (subunidade beta da ATP sintase), *gltB* (Glutamato sintase de cadeia curta) e *gyrB* (DNA girase, subunidade B), b) antagonismo contra os fungos fitopatogênicos (*Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum* sp., *Ceratocystis fimbriata*) e bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente), c) virulência a *Galleria mellonella* (inseto), d) controle da necrose de orquídea causada por *B. gladioli* e e) suscetibilidade a antibióticos de diferentes classes. A análise genotípica permitiu identificar a população de *Burkholderia* com isolados pertencentes às espécies *B. stabilis*, *B. seminalis*, *B. contaminans*, *B. gladioli* e *B. cenocepacia*. Foi observado que 100% dos isolados foi capaz de inibir o fungo *C. fimbriata* e *Colletotrichum* sp., 93% inibiu o fungo *C. paradoxa* e *A. fumigatus*. Em relação a atividade antibacteriana, foi observada que 67% dos isolados inibiu a bactéria *E. coli*, 87% *Bacillus* sp., 100% *S. aureus* e nenhum isolado foi capaz de inibir à cepa multi-resistente de *P. aeruginosa*. Foi observado que 70% dos isolados foi capaz de controlar a necrose de orquídea, inibindo

completamente os sintomas de *B. gladioli*. E 40% dos isolados causaram 100% de mortalidade de larvas. Adicionalmente, na análise da sensibilidade a diferentes antibióticos, foi observado que 100% das linhagens é sensível a Ceftazidima e Cefepima (Cefalosporinas), Levofloxacin (Quinolona), Meropenem (Carbapenem), Tigeciclina (Gliciliciclina), Piperacilina+Tazobactam (β -lactama) e cloranfenicol (anfencol), enquanto 33% foi sensível a Piperacilina, 13% a Carbenicillin, 66% a Aztreonam (Monobactâmicos), 80% a Imipenema (Carbapenêmicos), 93% a Sulfametozol-Trimetoprima (Sulfonamidas), 53% a Doxiciclina, 53% a Tetraciclina e 73% Minociclina (Tetraciclina). Nenhum dos isolados avaliados foram sensíveis a Ticarcilina+Ac.Clavulanico (Beta-lactâmico). Não foi observada correlação entre a resistência a antimicrobianos clinicamente utilizados e a atividade antimicrobiana, porém foi identificada correlação entre a similaridade genética, por meio de MLSA e a produção de antimicrobianos. Embora, *Burkholderia* spp. possa ser considerado um patógeno oportunista, o presente estudo reforça a possibilidade da sua aplicação como agente de controle biológico de fitopatógenos, além de uma potencial fonte de moléculas de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Ecologia Microbiana. Biotecnologia. Controle Biológico. *Burkholderia* spp.. Complexo *Burkholderia cepacia*

ABSTRACT

Gutiérrez K J. Diversidade genética e fisiológica de *Burkholderia* spp. isoladas de diferentes hospedeiros. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bacteria of the genus *Burkholderia* are dominant in the rhizosphere of sugarcane. This genus includes more than 117 species capable of colonizing different niches in soil, water, plants or together with plants and animals, and in some cases can cause diseases in plants and humans, especially in immunocompromised patients. In addition, they present a biotechnological application in the biological control of phytopathogens, such as plant growth promoters, bioremediation and producers of molecules of interest in medicine, agriculture and industry. The *B. seminalis* strain TC3.4.2R3, endophytically isolated from sugarcane root, has the ability to inhibit fungi and pathogenic bacteria. Previous studies have shown that this lineage can control plant pathogens *in plant* and *in vitro*. Considering that members of the genus *Burkholderia* can live on plants in a common way and are pathogenic to animals, in the present study, the genetic and physiological diversity of fifteen isolates of *Burkholderia* spp. obtained from different environments was evaluated using a) the MLSA (Multilocus sequence analysis) technique using the sequence of the 16S rRNA genes, *atpD* (ATP synthase beta subunit), *gltB* (short chain Glutamate synthase), and *gyrB* (DNA gyrase, subunit B), b) antagonism against phytopathogenic fungi (*Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum* sp., *Ceratocystis fimbriata*) and pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistant), c) virulence of *Galleria mellonella* (insect), d) control of orchid necrosis caused by *B. gladioli* and e) susceptibility to antibiotics of different classes. The genotypic analysis allowed the identification of the population of *Burkholderia* with isolates belonging to species *B. stabilis* (93RZ and 67SI), *B. seminalis*, *B. contaminans*, *B. gladioli* and *B. cenocepacia*. It was observed that 100% of the isolates were able to inhibit the fungi *C. fimbriata* and *Colletotrichum* sp., 93% inhibited *C. paradoxa*, 87% inhibited *F. verticillioides* and *A. fumigatus*. Regarding antibacterial activity, 67% of the isolates inhibited *E. coli* bacteria, 87% *Bacillus* sp., 100% *S. aureus* and none isolates were able to inhibit the *P. aeruginosa* multi-resistant strain. 70% of the isolates were able to control orchid necrosis,

completely inhibiting the symptoms of *B. gladioli*. 40% of the isolates caused 100% mortality of larvae. In the analysis of sensitivity to different antibiotics, it was observed that 100% of the strains were sensitive to Ceftazidime and Cefepima (Cephalosporins), Levofloxacin (Quinolone), Meropenem (Carbapenem), Tigecycline (Glycyclic), Piperacillin + Tazobactam (β -lactam) and chloramphenicol (amphenicol), while 33% was sensitive to Piperacillin, 13% to Carbenicillin, 66% to Aztreonam (Monobactams), 80% to Imipenem (Carbapenems), 93% to Sulfametonazole-Trimethoprim (Sulfonamides), 53% to Doxycycline, 53% to Tetracycline and 73% Minocycline (Tetracycline). None of the isolates evaluated were sensitive to Ticarcillin + Ac.Clavulanico (Beta-lactam). No correlation was observed between the resistance to antimicrobial agents used clinically and antimicrobial activity, but a correlation between the genetic similarity, through MLSA and antimicrobial production was identified. Although *Burkholderia* spp. can be considered an opportunistic pathogen, this study reinforces the possibility of its application as a biological control agent of phytopathogens, in addition to a potential source of interesting biotechnological molecules.

Keywords: Microbial Ecology. Biotechnology. Biological control. *Burkholderia* spp.. *Burkholderia cepacia* complex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 01.** Código de identificação, local de isolamento e observações das linhagens de *Burkholderia* sp. avaliadas.....30
- Tabela 02.** Primers dos genes específicos utilizados na análise MLST.....33
- Tabela 03.** Classe de antimicrobiano utilizado e concentração dos discos.....35
- Figura 01.** Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA das linhagens com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank.....39
- Figura 02.** Árvore fenética baseada na análise filogenética de multilocus (MLSA) dos genes *atpD*, *gltB*, e *gyrB* das linhagens avaliadas, comparadas com sequências de linhagens disponíveis no banco de dados.....
40
- Figura 03.** Curva de crescimento das quinze linhagens de *Burkholderia* spp. avaliadas no presente trabalho.....
42
- Tabela 04.** Virulência à *Galleria mellonella*, controle da necrose das orquídeas, solubilização fosfato, produção de sideróforos e endoglucanase, e atividade antimicrobiana de *Burkholderia* spp. contra fungos e bactérias.....42
- Figura 04.** Resultado do teste de controle da necrose em orquídeas 'Aloha Iwanaga'.....
44
- Tabela 05.** Sensibilidade *in vitro* de cepas de *Burkholderia* (N = 15) para os 9 antibióticos testados.....46

SUMÁRIO

2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 GÊNERO Burkholderia.....	16
2.1.1 Diversidade filogenética de Burkholderia	17
2.1.1.2 Espécies patogênicas de Burkholderia.....	21
2.1.2 Potencial biotecnológico de bactérias do gênero Burkholderia	23
3 OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL.....	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BANCO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO Burkholderia sp....	31
4.1.1 Curva de crescimento dos isolados do gênero Burkholderia sp.....	32
4.1.2 Caracterização genotípica dos isolados de Burkholderia spp.	32
4.1.3 Análise MLSA.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE Burkholderia spp.	34
4.2.1. Análise da capacidade de inibir bactérias patogênicas.....	34
4.2.2. Análise da capacidade de inibir fungos fitopatogênicas	35
4.2.3. Avaliação de virulência a <i>Galleria mellonella</i>	35
4.2.4. Resistência a antibióticos	36
4.2.5. Biocontrole da necrose da orquídea cauda por <i>B. gladioli</i>	37
4.2.6. Solubilização de fosfato e produção de sideróforos e endoglicanase	37
5 RESULTADOS	39
5.1 BANCO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO Burkholderia sp. E SUA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	39
5.2 CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE Burkholderia spp.....	42
5.3 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.	45
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES.....	59
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
REFERÊNCIAS*	62

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Burkholderia* (Classe β -proteobacteria) contém mais de 122 espécies, muitas das quais são amplamente distribuídas nos mais diferentes ambientes, colonizando a água, solo, plantas e animais. Esta habilidade é, em parte, determinada pela sua capacidade de metabolizar mais de 200 diferentes fontes orgânicas de carbono, a qual possibilita que ocupem diferentes nichos nestes ambientes. Esta e outras características de importância industrial favorecem que bactérias deste gênero sejam utilizadas no manejo agrícola, promoção do crescimento vegetal, biocontrole de fitopatógenos, biodegradação e biorremediação, mostrando a grande importância ecológica e biotecnológica do grupo. No entanto, algumas espécies de *Burkholderia* são patógenos de plantas e podem causar doenças em uma grande variedade de espécies de importância agrícola, tais como arroz, cebola e orquídeas. Outras espécies de *Burkholderia* estão envolvidas em infecções pulmonares humanas, as quais podem ser devastadoras para pacientes com fibrose cística e, portanto, problemas de biossegurança devem ser avaliados antes da sua aplicação biotecnológica.

Nesta questão de biossegurança, uma atenção especial tem sido dada a um grupo de espécies de *Burkholderia*, as quais em conjunto formam o *complexo Burkholderia cepacia* (Bcc), atualmente representado por pelo menos 18 espécies estreitamente relacionadas. As bactérias do complexo Bcc são contaminantes universais de soluções cosméticas e farmacêuticas, e podem provocar contaminação do abastecimento de água, soluções estéreis, e equipamentos descartáveis levando a infecções hospitalares e epidêmicas. No entanto, membros deste complexo Bcc também tem sido avaliado para diferentes propósitos, incluindo controle biológico de patógenos de plantas, biorremediação de compostos xenobióticos recalcitrantes e promoção de crescimento vegetal.

Embora bactérias promotoras de crescimento vegetal utilizem uma série de diferentes mecanismos para promover o crescimento do hospedeiro, sem dúvida, uma característica que parece ser relevante para esta função é a capacidade de sintetizar ácido indol-acético (AIA), controlando muitos processos fisiológicos importantes, efeitos profundos sobre o crescimento e desenvolvimento da planta. Outro regulador vegetal, o etileno, é sintetizado na planta a partir do precursor aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). *Burkholderia* spp. podem apresentar a enzima ACC deaminase, a qual é responsável pela quebra da ACC (usado como

fonte de carbono pela bactéria), reduzindo assim os níveis deste regulador na planta e, conseqüentemente reduzindo a resposta a estresse e promovendo o crescimento das plantas.

Tendo em vista os benefícios que membros do gênero *Burkholderia* podem proporcionar para a produção agrícola, se fazem necessários estudos para entender os riscos à saúde humana e animal, bem como os mecanismos envolvidos no controle biológico e promoção de crescimento vegetal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GÊNERO *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* é descrito como um grupo de bactérias Gram-negativas, não fermentativas, aeróbias, taxonomicamente pertencente à classe β -proteobacteria. O gênero *Burkholderia* foi catalogado por algum tempo como membro do gênero *Pseudomonas*, porém no estudo desenvolvido por Yabuuchi e colaboradores (1992) foram feitos experimentos de hibridação do DNA/DNA, reconhecendo que *B. cepacia* não está relacionado com *P. fluorescens*. Estudos posteriores confirmaram que este gênero pertence à classe Beta das proteobactérias, em vez da classe Gama, comum das espécies do gênero *Pseudomonas* (Yabuuchi et al, 1992).

O gênero foi identificado pela primeira vez nos anos 50, quando William Burkholder diferenciou *Burkholderia cepacia*, previamente reconhecido como *Pseudomonas cepacia*, como o fitopatógeno agente causando pele azeda da cebola que é caracterizada por uma podridão das escamas externas do bulbo (Burkholder 1950). Em 1992, Yabuuchi et al., descreveram depois de analisar e identificar as características bioquímicas e fisiológicas, a composição dos ácidos graxos, lipídeos celulares, e comparar as sequências do gene *16S rRNA* das linhagens diferentes de *Burkholderia* e *Pseudomonas aeruginosa*, sete linhagens designadas com gênero pertencentes a um gênero distinto, criando assim o novo gênero. Este novo gênero era membro do grupo II de homologia ao RNA do gênero *Pseudomonas*, excluindo *P. picketti* e *P. solanacearum*, espécies que foram transladadas para o gênero *Ralstonia* (Yabuuchi et al., 1992). Atualmente, o gênero é composto por 122 espécies válidas segundo a Lista de Nomes Procarióticos (LPSN, 2018).

Estas bactérias do gênero *Burkholderia* tem uma rápida expansão na maioria dos ambientes, como em solos simples ou em água doce, e as que têm sido majoritariamente reconhecidas são aquelas que estão em associação com hospedeiros, como humanos, animais (vertebrados e invertebrados), plantas e fungos. Essas interações podem ser benéficas e/ou prejudiciais (Depoorter et al., 2016). Dentro do gênero *Burkholderia*, o complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), tem despertado maior interesse na comunidade científica, visto que são eficientes agentes de controle biológico e estão associados com quadros epidêmicos de pneumonia em pacientes com fibrose cística. Membros deste complexo Bcc podem viver comensalmente em plantas, em íntima associação com as raízes, sendo uma das bactérias

mais predominantes na raiz e na rizosfera (Nacamulli et al., 1997). Adicionalmente este grupo de bactérias, apresenta um alto potencial biotecnológico, pela sua capacidade de promover o crescimento em plantas, no controle biológico de pragas fitopatogênicas e na biorremediação. No entanto, apresentam a habilidade de colonizar tecidos animais e vegetais, gerando uma interação de parasito-hospedeiro que pode afetar a pessoas imunocomprometidas ou pacientes com fibrose cística (Depoorter et al., 2016).

Em relação ao seu genoma, linhagens do complexo Bcc podem apresentar replicons múltiplos, com 2 a 4 cromossomos, com um tamanho total do genoma que pode variar de 4 a 9Mb. Lissie e colaboradores (1996) observaram, que a facilidade que tem este gênero para obter DNA exógeno no genoma por transferência horizontal esclarece a rápida evolução entre linhagens, com aproximadamente 10% do seu genoma consistindo de ilhas genômicas. Um grande número de genes em plasmídeos, bacteriófagos e sequências de inserção também permitem essa plasticidade genotípica e diversidade do genoma no gênero, promovendo extensa variabilidade genética e fisiológica (Lessie et al., 1996; Mahenthiralingam et al., 2008).

2.1.1 Diversidade filogenética de *Burkholderia*

Em 1997, Vandamme e colaboradores identificaram novas espécies no gênero *Burkholderia*, as quais foram separadas em genomovares e agrupadas como *Burkholderia cepacia* complexo *cepacia* (Bcc). A classificação de genomovars tem sido aplicada para gêneros de bactérias como *Burkholderia* e *Agrobacterium*, entendendo-se como genomovar uma cepa distinta de outro com base nas diferenças genéticas obtidas pela comparação do DNA genômico por hibridação, permitindo a identificação correta de cepas que podem apresentar uma alta similaridade fenotípica porém divergentes a nível genético (Speert, 2001).

No Complexo Bcc se tem designado como espécies aquelas cepas que são claramente diferenciadas de outros genomovars, como é o caso do genomovar II que é oficialmente *Burkholderia multivorans* (Vandamme et al., 1997), genomovar IV é *Burkholderia stabilis* e genomovar V como *Burkholderia vietnamiensis* (Vandamme et al., 2000). Essa taxonomia pode ser confusa para os médicos, porém permite entender melhor o potencial de patogenicidade e as características de virulência desse grupo diversificado de patógenos humanos oportunistas, como tem sido identificado na diferença que apresenta cada cepa na

propensão para causar doença em pacientes com Fibrose Cística (FC), sendo mais comum encontrar o genótipo III, responsável por aproximadamente 80% dos isolados do complexo *B cepacia* de pacientes com FC no Canadá. Esta identificação facilita a diferenciação dos genótipos em laboratórios microbiológicos de diagnóstico, o que evidencia o crescimento progressivo do conhecimento no campo da microbiologia molecular (Speert D, 2001).

Entre as técnicas mais comumente implementadas na identificação de espécies do gênero *Burkholderia* está tipagem de seqüências multilocus (MLST) (Baldwin et al. 2007; Mahenthiralingam et al. 2008; Dalmastrri et al. 2007), uma das ferramentas moleculares mais implementadas nos últimos anos que tem permitido identificar novas espécies do gênero. Esta técnica é um processo não ambíguo utilizado para a caracterização de isolados de espécies de bactérias, utilizando as seqüências nucleotídicas dos genes conservados (Urwin and Maiden. 2003). Diferentes autores confirmam a efetividade da tipagem por sequenciamento de multilocus para a identificação de linhagens do Complexo Cepacia, as quais já tinham sido previamente classificadas inadequadamente utilizando outro tipo de ferramentas (Spilker et al., 2009). Baldwin et al., 2007 indica como a precisão da técnica MLST sobre outras técnicas está explicada pela comparação que se faz do conteúdo da seqüência de DNA, e não da organização do genoma ou fragmentos de restrição, o que faz desta técnica um indicador mais confiável e inequívoco na identificação das linhagens, permitindo além da identificação de espécies também a diferenciação de linhagens (Baldwin et al., 2007). Tendo em conta que a identificação incorreta ou a falta de identificação das bactérias Bcc ainda é um problema enfrentado por muitos laboratórios de microbiologia diagnóstica (Coenye et al., 2001), MLST se apresenta como uma solução que pode garantir um auxílio grande no processo de diagnóstico clínico de infecção do Bcc (Baldwin et al., 2007).

No trabalho desenvolvido por Mahenthiralingam e colaboradores (2008) foi implementada a técnica MLST na identificação de diferentes linhagens do Complexo Bcc. Esta técnica permitiu, além de confirmar a presença de três novos filótipos (grupo AW, BCC1 e BCC2) do complexo Bcc previamente identificados a partir do gene *recA* (Payne et al. 2005), também a ajudar a definir outros conjuntos filogenéticos, permitindo assim a classificação de sete grupos de espécies distintos de MLST nomeados como complexo Bcc K, BCC1, BCC2, BCC3, BCC4, BCC5 e BCC6. Além da técnica MLST, Mahenthiralingam e colaboradores (2008) também recomendam a implementação de outras técnicas taxonômicas polifásicas, que em complemento com MLST fazem mais confiáveis os resultados na

identificação e confirmação de novas espécies, entre essas técnicas está o uso de meios seletivos como o ágar seletivo *B. cepacia* (BCSA; Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, EUA) ou *B. cepacia* medium (Mast Diagnostics, Merseyside, UK) comumente utilizados em isolados clínicos e amostras respiratórias, também é usado meios menos seletivos, como "*P. cepacia*" meio de hidrocarboneto policíclico de cepacia (PCAT) e tetraciclina de azul de tripano (TB-T) usado para isolados ambientais (Ramette et al. 2005). A comparação filogenética da seqüência completa do gene 16S rRNA da bactéria Bcc pode distinguir todas as espécies formalmente nomeadas (Coenye e Vandamme, 2003). Além disso, sondas fluorescentes de hibridização in situ baseadas no gene 16S rRNA mostraram-se promissoras para a identificação microscópica direta de esfregaços de baciloscopia (Brown et al., 2007), sendo descritos diversos genomovars a mais, os quais têm sido nomeados como espécies (Mahenthiralingam et al., 2008).

Em 2005, Gevers e colaboradores introduziram o termo MLSA como uma nova designação para a análise de seqüência de múltiplos genes codificadores de proteínas para aplicação taxonômica à delimitação de espécies dentro de um gênero, fazendo com que a integração do MLSA na taxonomia procariótica seja utilizado como um procedimento de identificação. Mais freqüentemente, uma nova cepa é filogeneticamente colocada como base em uma análise baseada no gene 16S rRNA e, posteriormente, regiões conservadas do genoma são amplificadas, sequenciadas, concatenados e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, refletindo melhor a relação dos táxons bacterianos (Glaeser et al., 2015). O MLSA baseia-se na tipificação de seqüências multiloculares (MLST), Glaeser e colaboradores (2015) ilustraram o potencial dos dados do MLSA que podem ser obtidos de coleções de bancos de dados MLST (como o banco de dados PubMLST; <http://pubmlst.org/bcc>) para a identificação de novas espécies em potência. Uma boa exemplificação disso é a exploração da base de dados MLST para as espécies do complexo Bcc, usando a abordagem MLSA levou à determinação de 16 novas espécies potenciais de *Burkholderia* (Vandamme e Peeters, 2014).

No trabalho desenvolvido por Araújo e colaboradores (2016), quem no início do processo de identificação da linhagem TC3.4.2R3 conseguiu identificar esta cepa dentro do complexo Bcc com ajuda da construção de uma árvore filogenética a partir das seqüências do genoma de TC3.4.2R3 e outras espécies representativas de *Burkholderia*. Para explorar ainda mais o posicionamento taxonômico da linhagem TC3.4.2R3, foi implementada a técnica

MLSA, baseada em sete genes (*recA*, *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC* e *trpB*) previamente validados para análise de membros do Bcc (Baldwin et al. 2005). Nesta análise, a cepa TC3.4.2R3 se posicionou num clado bem suportado dentro do complexo Bcc composto por cepas de *Burkholderia seminalis* (Araújo et al., 2016).

A partir de avaliações filogenéticas, tendo em conta os genomovars e o gene 16S rRNA, no complexo Bcc se tem identificado diferenças consideráveis, o que tem gerado modificações importantes durante os últimos anos. Atualmente são nomeados oficialmente pelo menos 17 espécies no complexo Bcc, *B. cepacia* (Vandamme et al., 1997); *Burkholderia multivorans* (Vandamme et al., 1997); *Burkholderia cenocepacia* (Vandamme et al., 2003); *Burkholderia stabilis* (Vandamme et al., 2000); *Burkholderia vietnamiensis*, (Gillis et al., 1995; Vandamme et al., 1997); *Burkholderia dolosa* (Vermis et al., 2006); *Burkholderia ambifaria* (Coenye et al., 2001); *Burkholderia anthina* (Vandamme et al., 2002), *Burkholderia pyrrocinia* (Vandamme et al., 2002); *Burkholderia lata* (Lipuma 2010), Vermis et al. (2006) propôs *Burkholderia ubonensis* (Price et al., 2017), *Burkholderia seminalis* (Araújo et al. 2016), *Burkholderia metallica* (Vanlaere et al., 2008), *Burkholderia contaminans* (Power et al. 2016), *Burkholderia arboris* (Vanlaere et al., 2008), *Burkholderia diffusa* (Vanlaere et al., 2008), e *Burkholderia latens* (Vanlaere et al., 2008).

Para a classificação taxonômica do gênero *Burkholderia* sp., Eberl e Vandamme (2016) identificaram claramente duas linhagens principais, o grupo patogênico e o grupo ambiental e benéfico para plantas. O clado das linhagens patogênicas de seres humanos, animais e plantas, inclui as espécies *B. pseudomallei*, *B. mallei* e *Burkholderia glumae*, bem como as espécies do complexo Bcc; embora este clado tenha algumas espécies que são geralmente reconhecidas e utilizadas na promoção do crescimento de plantas e/ou controle biológico, tais como *B. vietnamiensis* e *B. ambifaria* (Parke e Gurian, 2001). O segundo clado filogenético compreende diversas espécies de *Burkholderia* ambientais, benéficas em planta. Neste clado foram identificadas em várias espécies a capacidade de fixar nitrogênio (N₂), nodular leguminosas, promover o crescimento das plantas e degradar compostos recalcitrantes (Shehata et al., 2016).

Outros autores também propõem a divisão do gênero *Burkholderia* em dois gêneros, sendo o primeiro gênero identificado como *Paraburkholderia* que representaria as espécies ambientais, e o segundo *Burkholderia sensu stricto*, que compreende as espécies patogênicas ambientais e clínicas (Sawana et al., 2014). Esta classificação é feita a partir da porcentagem

de guanina-citosina e as sequências conservadas identificadas. O clado *Burkholderia sensu stricto* contém uma porcentagem de conteúdo de guanina-citosina de 65-69%, além de seis sequências de genes conservados, e as demais linhagens de *Burkholderia* foram identificadas com uma porcentagem de conteúdo de guanina-citosina de 61-65% e duas sequências conservadas (Sawana et al., 2014).

Embora a identificação filogenética da bactéria de interesse permita fazer uma primeira aproximação do seu potencial patogênico, é importante ressaltar a importância e necessidade de fazer uma caracterização completa da linhagem antes de ser considerada segura, apoiando-se em modelos de infecção previamente estabelecidos, estudo e análise da origem das linhagens, e teste de potencial para o biocontrole em ensaios de campo (Sokol et al., 1999). Sendo evidente que o clado *Paraburkholderia* contém algumas linhagens patogênicas, e que várias linhagens do complexo Bcc apresentam boas propriedades de biocontrole e virulência atenuada. Como é o caso da linhagem *Burkholderia contaminantes* MS14, do complexo Bcc, que possui vários genes de biossíntese de antimicrobianos, mas não contém grandes loci genéticos necessários para patogênese (Deng et al., 2016).

2.1.1.2 Espécies patogênicas de *Burkholderia*

Como já foi previamente descrito, o gênero *Burkholderia* tem sido classificado taxonomicamente a partir do impacto positivo ou negativo que os integrantes de cada clado pode gerar em humanos, animais e plantas. As bactérias do complexo Bcc, foram identificadas como patógenos para pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com FC. Isles et al. (1984) e Tablan et al. (1985) fizeram os primeiros relatos sobre como as infecções com *B. cepacia* estavam emergindo como um problema nas pessoas com FC, descrevendo a natureza virulenta da infecção por essa espécie.

B. cenocepacia e *B. multivorans* são espécies do complexo Bcc frequentemente isoladas de amostras clínicas (Coenye e Vandamme, 2003). Em pacientes com FC, essas espécies podem causar infecções graves, levando ao declínio rápido da função pulmonar e uma pneumonia geralmente fatal (Isles et al., 1984, e Baldwin et al., 2004). Além da natureza virulenta dessas infecções, estudos epidemiológicos moleculares subsequentes demonstraram que as bactérias do complexo Bcc também eram capazes da transmissão através do contato social, sendo um agravante para a comunidade de pacientes com FC (Lipuma et al., 1990; Govan et al., 1993). Vários fatores de virulência têm sido identificados em *B. cenocepacia*,

como sistemas de *quorum sensing*, produção de sideróforos e biossíntese de lipopolissacarídeos (Eberl e Vandamme, 2016). Existem estudos de genômica comparativa que revelam outros fatores de virulência associados à patogenicidade, como os sistemas de secreção tipo III, IV e VI, observados principalmente em integrantes do clado *Burkholderia sensu stricto*, e ausentes geralmente nas linhagens do clado *Paraburkholderia* (Schwager et al., 2013; Uehlinger et al., 2009).

A avaliação dos fatores de virulência das cepas patogênicas do gênero *Burkholderia* sp. são desenvolvidos geralmente em modelos de infecção como *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella* e *Drosophila melanogaster* (Schwager et al., 2013; Uehlinger et al., 2009). O uso de *G. mellonella* como modelo para o estudo de virulência tem aumentado significativamente, pois tem sido demonstrado ser um excelente organismo modelo *in vivo* para a área de toxicologia e testes de patogenicidade, substituindo o uso de pequenos mamíferos (Harding et al., 2013). A mariposa de cera, como é comumente conhecida, apresenta a vantagem de ter um sistema imune muito semelhante ao dos mamíferos, além de sobreviver bem à temperatura do corpo humano, ter o tamanho ideal que permite um manejo direto e uma dosagem precisa. Outra vantagem é a sua manutenção econômica em comparação aos outros modelos biológicos (Aperis et al., 2007). No estudo desenvolvido por Seed e Dennis (2008), foram avaliadas duas espécies do complexo Bcc no modelo biológico *G. mellonella*. Os autores observaram diferenças de patogenicidade entre as espécies, e entre linhagens dentro de uma mesma espécie, previamente testado em outros modelos biológicos. Eles chegaram à conclusão de que *G. mellonella* é um ótimo modelo de infecção alternativo para descrever a virulência de membros do complexo Bcc, sendo mais quantitativo, mais preciso e mais robusto que outros modelos de infecção alternativa disponíveis (Seed et al., 2008).

No panorama agrícola, algumas espécies fitopatogênicas do gênero *Burkholderia* podem interagir com a planta resultando em doença ou morte do hospedeiro. Existem espécies que produzem enzimas que afetam a estrutura da parede e o tecido vegetal, permitindo o acesso aos nutrientes. Também tem sido observado espécies produtoras de toxinas não específicas ao hospedeiro, que permitem o acesso a nutrientes, crescimento e proliferação (Gonzalez, Venturi, Engledow, 2007). Um dos casos mais conhecidos é da bactéria fitopatogênica *Burkholderia gladioli*, responsável pela podridão do pseudobulbo de *Gladiolus*, além de ser um patógeno humano oportunista (Church et al., 2009; Dursu et al.,

2012). Ela tem sido identificada em diferentes hospedeiros, como agente causal da necrose de folhas de tabaco e arroz (Furuya et al., 1997), podridão interna da palha de milho (Lu e Henn, 2007), ferrugem da panícula do arroz (Nandakumar et al., 2009), podridão de brotos e folhas de açafrão, e manchas nas folhas e rebentos (Fiori, Ligios, Schaffino, 2011) e necrose de orquídeas (Mano et al., 2015), entre outros hospedeiros, o que gera um forte impacto negativo na economia agrícola com a redução da produtividade de diversas plantas de interesse econômico.

2.1.2 Potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Burkholderia*

Espécies pertencentes ao complexo Bcc já foram isoladas de ambientes industriais, hospitalares, seres humanos e animais infectados, bem como do solo, águas subterrâneas, da rizosfera e do interior de tecidos vegetais, sugerindo assim uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Esta capacidade está associada à uma grande plasticidade fenotípica, podendo apresentar um valioso potencial biotecnológico para ser utilizadas na área de biorremediação de áreas contaminadas ou produção agrícola como agentes de controle biológico de pragas, doenças e promoção de crescimento vegetal (Schwager et al., 2013). Sua aplicação na área de biorremediação é determinada pela sua ampla versatilidade metabólica, podendo degradar óleo bruto (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), herbicidas e derivados de éter (Coenye e Vandamme. 2003). Também foi proposto o uso de *Burkholderia* spp. o controle biológico de doenças de plantas, insetos e nematóides, evitando assim o uso de pesticidas químicos, garantindo benefícios ecológicos e econômicos (Coenye e Vandamme. 2003). No caso das linhagens do complexo Bcc, elas podem colonizar a rizosfera de diversas culturas, incluindo trigo, milho, arroz, ervilha, girassol e rabanete, aumentando significativamente o rendimento das culturas, mesmo na ausência de agentes patogênicos (Coenye e Vandamme. 2003), visto que estas bactérias competem por nutrientes com espécies deletérias às plantas. Para isso, estas bactérias apresentam a capacidade de produzir antibióticos, enzimas e moléculas bacteriolíticas que aumentam o seu fitness no ambiente (Parret et al., 2003).

Um bom exemplo que evidencia as capacidades do gênero *Burkholderia* é a cepa endofítica *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Isolada das raízes de cebola, esta linhagem é capaz de proteger as plantas de patógenos, aumentar a resistência ao estresse, particularmente contra baixas temperaturas, alta salinidade e secura (Sessitsch et al., 2005). Outro exemplo é

a linhagem *B. cepacia* MC17, a qual é de promover o crescimento das plantas de milho. Esta bactéria apresenta um bom crescimento quando é cultivada em solo junto com o fungo fitopatogênico *Fusarium moliniforme*, podendo apresentar um efeito negativo na infestação de plântulas em estágios iniciais de crescimento, por esse fungo fitopatogênico (Bevinino et al., 2000). Os autores do estudo sugerem que mais de um mecanismo, como a competição por substrato, exclusão de nicho, antibiose e a indução de resistência podem estar envolvidos neste controle de *F. moliniforme*. Tais mecanismos podem estar ocorrendo concomitantemente e serem responsáveis pelos resultados observados (Nacamulli et al., 1997).

Outra potencial aplicação de bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* é a produção de moléculas de interesse industrial, como foi demonstrado no trabalho desenvolvido por Padilha e colaboradores (2012), no qual foi avaliada a partição e caracterização da lipase a partir de *Burkholderia cepacia*, uma enzima de grande relevância tendo em conta que é uma enzima hidrolítica que constitui a principal classe de enzimas empregadas na indústria (Kirk et al., 2002). Como resultado foi observada uma atividade de 1,85 U / mL e atividade específica de 29,30 U / mg, com temperatura ótima das enzimas de 37°C, e 100% de atividade relativa (Padilha et al., 2012). Tendo em vista todos estes benefícios que o gênero *Burkholderia* pode proporcionar ao crescimento e desenvolvimento das plantas, além da produção de moléculas de interesse biotecnológico, estudos são necessários para a busca de potenciais aplicações desta bactéria, selecionando isolados que sejam seguros quanto à capacidade de causar infecções em humanos e animais, e adicionalmente sejam eficientes em melhorar o desenvolvimento da planta hospedeira e/ou produzir compostos de interesse na indústria e saúde.

2.1.2.1 Estudos prévios com bactérias do gênero *Burkholderia* pelo grupo de pesquisa

O gênero *Burkholderia* tem despertado o interesse de vários cientistas ao redor do mundo devido a suas aplicações biotecnológicas, como agentes de biocontrole, promotores de crescimento vegetal, biorremediação e biodegradação, e produtor de importantes moléculas de interesse na medicina, agricultura e indústria. É por isso que no laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (LABMEM) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Professor Dr. Welington Luiz de Araújo, iniciaram as pesquisas no gênero *Burkholderia*, para entender melhor a sua classificação

taxonômica, a relevância desse gênero na interação e promoção de crescimento em plantas, suas habilidades enzimáticas, entre outras características de grande relevância biotecnológica, a partir de isolados obtidos de diferentes regiões do Brasil.

Estes estudos iniciaram com a caracterização da comunidade microbiana associada à diferentes cultivares de cana-de-açúcar. Nos trabalhos desenvolvidos por Marcon (2007) e Rossetto (2008), junto ao projeto "Interações entre populações microbiana e plantas geneticamente modificadas" (Projeto Jovem Pesquisador – FAPESP), a partir do qual foram isoladas cepas de *Burkholderia* spp. endofíticas e rizosféricas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), da região de Piracicaba, no interior do Estado de São Paulo, Brasil. Essas cepas foram posteriormente caracterizadas molecular e fisiologicamente por Luvizotto e colaboradores (2010), a partir das sequências 16S rRNA e o gene *gyrB*, identificando a maior parte, 37 de 39 isolados, como cepas pertencentes ao complexo Bcc, com uma classificação entre as espécies *B. cepacia* e *B. cenocepacia*. As cepas estudadas apresentaram características fenotípicas, como capacidade de fixação de nitrogênio, ácido indolacético, sideróforos, e solubilização de fosfato inorgânico, sugerindo a importância desse grupo de bactérias na promoção de crescimento em plantas. Adicionalmente foram identificados substratos com potencial antagônico frente alguns patógenos em plantas, como o pyrrolnitrin, metabólito com atividade antifúngica (Luvizotto et al., 2010).

Os resultados do trabalho levaram à conclusão que a maioria das bactérias do gênero *Burkholderia* associadas à cana-de-açúcar estão relacionadas ao complexo Bcc, que além de apresentar similaridades nas sequências, também apresentaram fenótipos que podem ser utilizados como promotores de crescimento vegetal e como agentes de biocontrole, especialmente para plantas de cana-de-açúcar (Luvizotto et al., 2010). Tendo identificada a capacidade do controle biológico no banco de cepas do gênero *Burkholderia*, Mano (2011) propôs como objetivo do seu trabalho de mestrado a identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de *Pectobacterium carotovora* (posteriormente identificada como *Burkholdeira gladioli*), agente causal da necrose em orquídeas, sendo o cultivo de orquídeas um dos grupos de plantas ornamentais melhor explorado comercialmente no Brasil (Mano, 2011).

A partir do banco de cepas previamente identificado por Luvizotto e colaboradores (2010), foram desenvolvidos testes de inibição dos sintomas de podridão mole causado por *P. carotovora* em fragmentos foliares, avaliação in vivo, nas folhas de plantas adultas de *Oncidium Alowa Iwanaga*, além de fazer uma biblioteca de transformantes de *Burkholderia* sp que permitissem a identificação dos genes envolvidos no controle exercido por *Burkholderia* in planta de *P. carotovora* (Mano, 2011). Os resultados revelaram a capacidade dos isolados de *Burkholderia* spp de controlar a podridão mole de *Oncidium* sp. causado por *P. carotovora*, sendo o isolado TC3.4.2R3 selecionado para a construção de biblioteca de mutantes Tn5, pela sua sensibilidade ao antibiótico canamicina, resultando em 16 mutantes que perderam a capacidade total em controlar a doença quando comparada à linhagem selvagem, sugerindo assim que os genes inativados pelo transposon identificados nos mutantes podem estar relacionados ao processo do controle da podridão mole. Entre os genes identificados, foram observados genes que codificam enzimas envolvidas nos processos de síntese de aleloquímicos, competição por nutrientes, adaptação a condições ambientais, e interação com hospedeiro e/ou entre microrganismos (Mano, 2011).

No entanto, para realizar a identificação dos genes de *Burkholderia* TC3.4.2R3 envolvidos no biocontrole da necrose em orquídea, Mano (2015), deu continuidade na sua pesquisa. O estudo iniciou com a confirmação da necrose causada por *Burkholderia gladioli* na orquídea, e também foi confirmada a capacidade da linhagem *Burkholderia* TC3.4.2R3 no controle da necrose em *Oncidium Alowa Iwanaga* causada por *B. gladioli* ORQF-04F. Posteriormente foi feita a caracterização da linhagem *Burkholderia* TC3.4.2R3 e avaliação da interação entre *B. gladioli* ORQF-04F e *Burkholderia* TC3.4.2R3 em *Oncidium Alowa Iwanaga* a partir de testes de liberação de etileno, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica da planta hospedeira, demonstrando que o controle é dependente do contato direto de *Burkholderia* TC3.4.2R3 com a cepa fitopatogênica *B. gladioli* ORQF-04F, e que não tem envolvimento de resposta de defesa da planta no controle dos sintomas de necrose. Adicionalmente foi sequenciado o genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3, a partir do sequenciamento de nova geração através da plataforma 454 GS FLX Titanium Roche, apoiado com o pulse Field do DNA genômico de *Burkholderia* TC3.4.2R3, para visualizar os cromossomos e estimar o tamanho do genoma, obtendo como resultado a identificação de um genoma com um tamanho estimado de 7.67 megabases, com três replicones, dois

cromosomas, e o plasmídeo pC3. Em relação ao entendimento do mecanismo central do controle de necrose, foi estudado o contexto genético do mutante M01, que perdeu a habilidade de controlar a necrose causada por *B. gladioli* na orquídea, identificando uma inserção do transposon Tn5 em uma região intergênica de patatina-ferritina, porém seria preciso estudar melhor o mecanismo central de controle da doença (Mano, 2015).

Em 2016 Araújo e colaboradores conseguiram identificar o isolado TC3.4.2R3 como *Burkholderia seminalis*, uma espécie dentro do complexo Bcc que inclui patógenos humanos oportunistas e cepas ambientais, a identificação foi feita utilizando as sequências concatenadas dos genes housekeeping *recA*, *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC* e *trpB*. Adicionalmente identificaram doze mutantes deficientes na supressão da necrose foliar, e as inserções do transposon foram mapeadas para oito loci, sendo que um dos genes está em um cluster *wcb* que está relacionado à síntese do polissacarídeo extracelular, que é importante nas interações bactéria-hospedeiro em outros sistemas, e os outros sete genes são altamente conservados entre o gênero *Burkholderia*. Paralelamente foi feita uma análise da sequência do genoma da linhagem TC3.4.2R3, a partir da qual identificaram os agrupamentos gênicos para a biossíntese de pirrolnitrina e ramnolípido e sistemas para a aquisição de ferro através de sideróforos. Além de identificar agregados de genes com papéis putativos na biossíntese de IAA e degradação de etileno via ACC deaminase, abrindo a possibilidade de que *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 possa interagir com plantas alterando o metabolismo hormonal (Araújo et al., 2016). As informações biológicas e genéticas fornecidas com este trabalho e as técnicas moleculares implementadas, vão ser ferramentas de grande ajuda no avanço do entendimento dos mecanismos pelos quais as bactérias interagem sobre e nas plantas para suprimir doenças.

Tendo em conta que no trabalho prévio foi identificado um gene relacionado à síntese de polissacarídeo extracelular ubicado dentro do cluster *wbc*, no laboratório LABMEM se continuou a pesquisa em relação à avaliação e caracterização do gene *wbcE* de *Burkholderia seminales* TC3.4.2R3 na interação microbiana, trabalho desenvolvido por Gonçalves e colaboradores (2019). No projeto foram avaliadas temperaturas de termorregulação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 a 28°C (estímulo ambiental) e 37°C (estímulo associado ao hospedeiro) nos níveis transcricional e fenotípico. Como resultado foi observado que a 28°C houve aumento na produção de biofilmes e exopolissacarídeos como polissacarídeos capsulares, e

no biocontrole de fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum*, *Cyanophora paradoxa*, *Ceratocystis fimbriata* e *Colletotrichum* spp), sugerindo que os genes associados a estes fenótipos podem ser importantes durante interações com a microbiota do solo ou na associação com a planta hospedeira. A 37°C, foi observado a ativação de várias vias metabólicas, particularmente aquelas que estão relacionadas com a produção de energia, respostas ao estresse e na biossíntese de transportadores, além de ter-se observado motilidade e uma virulência significativa no modelo de infecção implementado (larvas de *Galleria mellonella*). Adicionalmente verificou-se que a produção de polissacarídeo capsular também foi induzida de forma significativa a 37°C, e em *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi observado que os genes *Bsem_02944* e *Bsem_02953*, presentes na parte central do cluster WCB, foram regulados a 37°C. Esses resultados levaram a pensar que a regulação da expressão da cápsula pode ser importante na virulência contra larvas de *G. mellonella* a 37°C, tendo papéis menores nas interações solo e planta. Paralelamente, também foi testada a infecção de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em camundongos BALB / c mas não causou a morte, mesmo com uma dose infecciosa de 10⁷ CFU.mL⁻¹. O que levou à conclusão de que a temperatura regula a expressão gênica em *B. seminalis* durante suas interações com o meio ambiente (Gonçalves et al., 2019).

Ressaltando que em todos os trabalhos previamente desenvolvidos no LABMEM, respectivamente descritos, tem se confirmado a habilidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 como agente de biocontrol contra vários fungos patogênicos, e a bactéria *B. gladioli* ORQF-04 responsável pela necrose em orquídea. Foi relevante estudar melhor os tipos de biomoléculas com atividade antimicrobiana que esta cepa produz, é por isso que Araújo e colaboradores (2017) utilizaram imagiologia por espectrometria de massa por ionização e desorção a laser assistida por matriz (MALDI-MSI) para investigar os metabólitos secundários produzidos por *B. seminalis* TC3.4.2R3 em monocultivo e cocultura com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Como resultado foi confirmada a produção de sideróforo-piroquelina e o ramnolípido Rha-Rha-C15-C14 na cepa *B. seminalis* do tipo selvagem, sendo que a produção desses compostos variaram em cepas mutantes que tinham rupturas em aglomerados gênicos associados a compostos antimicrobianos. Adicionalmente durante a cocultura com *B. seminalis*, foi identificada a presença de metabólitos que podem estar relacionados aos mecanismos com a defesa desses microrganismos na zona de interação

interespecies. Confirmando assim que a aplicação de MALDI-MSI na detecção de moléculas bioativas envolvidas no mecanismo de defesa de *B. seminalis* é efetiva, além de demonstrar o grande potencial de uso de *B. seminalis* TC3.4.2R3 no biocontrole de doenças de plantas causadas por *F. oxysporum* (Araújo et al., 2017).

Além de ter sido implementada MALDI-MSI para a detecção de moléculas bioativas envolvidas no mecanismo de defesa de *B. seminalis*. Araújo e colaboradores (2017), também implementaram espectrometria de massa de ionização (DESI-MSI) para mapear distribuições metabólicas espaciais de monoculturas de *B. seminalis* e patógenos de cacau (*Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora citrophthora*), além de monitorar as interações entre a bactéria endofítica com o fungo e oomicetos. Os resultados obtidos por esse estudo, confirmaram a efetividade do uso de DESI-MSI reconhecendo vários fosfolipídios. Adicionalmente foram detectados ramnolipídeos parcialmente difusos, utilizados como defesa química de *B. seminalis* contra patógenos do cacau, que provavelmente atuam em sinergismo com outros metabólitos difusos não identificados (Araújo et al. 2017). Deixando uma vez mais em evidência a capacidade de utilizar esta cepa para proteger culturas de interesse econômico, além dos benefícios que o gênero *Burkholderia* pode proporcionar ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Tendo em conta essa relevância, no presente trabalho será analisada uma coleção de quinze isolados de *Burkholderia* spp. obtidos de diferentes ambientes, identificando sua diversidade genética e fisiológica, para identificar assim possíveis candidatos que tenham a capacidade de garantir segurança quanto à capacidade de causar infecções em humanos e animais, e adicionalmente sejam eficientes em melhorar o desenvolvimento da planta hospedeira.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Tendo em vista a potencial aplicação de *Burkholderia* spp. e os riscos à saúde humana e animal, o objetivo geral do presente projeto foi avaliar a diversidade genética e fisiológica de uma população de isolados obtidos de diferentes hospedeiros e ambientes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados obtidos por meio da técnica de Multilocus sequence analysis (MLSA).
- Avaliar a capacidade dos isolados de *Burkholderia* spp. em inibir fungos e bactérias patogênicas.
- Avaliar a virulência de *Burkholderia* spp. a larvas de *Galeria mellonella*, modelo para avaliação da capacidade desta bactéria em causar infecção em animais.
- Avaliar a resistência dos isolados de *Burkholderia* spp. frente a diferentes antibióticos.
- Avaliar a capacidade dos isolados em controlar a necrose de orquídea Aloha Iwanga causada por *B. gladioli*.
- Avaliar a habilidade dos isolados em solubilizar fosfato, produzir sideróforos e endoglicanase.
- Avaliar se existe correlação entre a resistência a antimicrobianos e a atividade antimicrobiana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BANCO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Burkholderia* sp.

A coleção de linhagens do gênero *Burkholderia* do laboratório LABMEM (Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana) foi construído a partir de diferentes isolados obtidos de diferentes ambientes e hospedeiros (**Tabela 01**).

Tabela 01- Código de identificação, local de isolamento e observações das linhagens de *Burkholderia* sp. avaliadas.

Código Coleção LAMBEM	Espécie	Local de isolamento	Referências
CV3.2.2F5	<i>Burkholderia</i> sp.	Endófito de raiz de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
TC3.4.1R1	<i>Burkholderia</i> sp.	Endófito de raiz de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
TH3.3.2F5	<i>Burkholderia</i> sp.	Rizosfera de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
CV3.3.3F2	<i>Burkholderia</i> sp.	Rizosfera de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
TC3.4.2R2	<i>Burkholderia</i> sp.	Endófito de raiz de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
TC3.3.3F1	<i>Burkholderia</i> sp.	Rizosfera de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
TC3.4.1F2	<i>Burkholderia</i> sp.	Endófito de raiz de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010
67SI	<i>Burkholderia</i> sp.	NR	Gonçalves & Motta, 2007
93Rz	<i>Burkholderia</i> sp.	NR	Gonçalves & Motta, 2007
TC3.4.2R3	<i>B. seminalis</i>	Endófito de raiz de cana de açúcar	Luvizotto et al., 2010 Araújo et al. 2016

AN 5.5	<i>Burkholderia</i> sp.	NR	Coleção do laboratório de Bioprodutos. ICB. USP
28Rz	<i>Burkholderia</i> sp.	NR	Gonçalves & Motta, 2007
47Rz	<i>Burkholderia</i> sp.	NR	Gonçalves & Motta, 2007
CMAA 1233	<i>Burkholderia</i> sp.	NR	Coleção da EMBRAPA Jaguariúna
LMG 2216 ^T (ATCC10248)	<i>B. gladioli</i>	Patógeno vegetal	Coleção so Institut für Pflanzenbiologie der Universität Zürich

^T Type strain
 NR: Não Resposta
 Fonte: Propia autoria.

4.1.1 Curva de crescimento dos isolados do gênero *Burkholderia* sp.

Culturas das quinze linhagens avaliadas foram obtidas em meio TSB (Caldo Soja Tripticaseína) por 24 h nos tubos falcon de polipropileno de 50 ml agitados a 150 rpm a 28°C. As curvas de crescimento foram iniciadas a partir do pré-inóculo que foi ajustado a uma densidade óptica inicial de 600 nm de 0,04 e incubadas em leitor de placas BioTek POWERWAVE HT do laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas na USP, com um volume de 150 µL em cada poço da placa de Elisa, agitação constante de 425 rpm a 28 °C, sendo monitorado o crescimento das linhagens a cada duas horas. Todos os experimentos foram realizados com 4 réplicas para cada isolado em cada tempo de leitura.

4.1.2 Caracterização genotípica dos isolados de *Burkholderia* spp.

Os isolados de *Burkholderia* spp. foram confirmados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Para isso, o DNA total foi extraído das culturas bacterianas previamente crescidas por 24 h em meio de TSB líquido, implementando o protocolo de fenol/clorofórmio com *bead-beater* de acordo com Araújo et al. (2002). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 0.2mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer P 027 (forward) e R 1387 (reverse), 3.7mM de MgCl₂, 2.5U de Taq Polimerase. A reação foi mantida no termociclador MJ Research PTC-200 programado para uma desnaturação inicial

de 96 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento a 61,5 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C durante 45 segundos, seguido de uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram primeiro verificados pelo tamanho correspondente (1360 pb) por eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando um método de polietilenoglicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) (**Apêndice A**). Posteriormente as amostras foram submetidas ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. As sequências obtidas foram analisadas com ajuda da ferramenta BLASTn no site do NCBI (National Center Biotechnology Information) e comparadas com sequências presentes na base de dados do RDP (Ribosomal Database Project). Utilizando o programa MEGA (versão 5) (Tamura et al. 2011), foi realizado o alinhamento e a construção da árvore fenética com o método de Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas (Bootstrap) com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor (1969).

4.1.3 Análise MLSA

Após confirmação do gênero *Burkholderia*, cada linhagem foi submetida a análise filogenética de multilocus (MLSA–Multilocus Sequence Analysis) com amplificação e sequenciamento dos genes conservados *atpD* (subunidade beta da ATP sintase), *gltB* (Glutamato sintase de cadeia curta), e *gyrB* (DNA girase, subunidade B). Para a amplificação, foram utilizados primers previamente descritos (**Tabela 02**) em termociclador programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento dos iniciadores a 55°C, 53°C e 51°C para o gene *atpD*, *gltB* e *gyrB*, respectivamente (as temperaturas foram definidas previamente após diferentes testes de gradientes de temperatura) por 30 seg, extensão a 72°C por 1min 30 seg; seguido por uma extensão final a 72°C por 7 min. Para isso, as reações da PCR foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 12,5 µl de GoTaq® DNA Polymerase, 2,0 µl (5-20 ng/mL) de DNA, 1,0 µl de iniciador forward (10 pmoles/µl) e 1,0 µl de iniciador reverso (10 pmol/µl), e 33,5 µl de água milli-Q. Posteriormente, Os produtos de PCR (1300 pb *aptD*, 1700 pb *gltB*, 1200 pb *gyrB*) foram avaliados por eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando um método de polietilenoglicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) (**Apêndice 02, 03 e 04**).

O produto final da amplificação foi sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. Os resultados obtidos foram

analisados por meio da ferramenta BLASTn no site do NCBI (National Center Biotechnology Information), contra a base de dados do GenBank, a partir dessa base de dados foram tomadas sequências dos genes conservados utilizados na análise MLSA de diferentes cepas tipo para alinhar juntos com as sequências amplificadas dos quinze isolados analisados no presente trabalho (**Apêndice E**). O agrupamento para construção da árvore filogenética baseada na sequência dos genes foi calculado de acordo com o método de Neighbor-Joining (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor (1969). A significância da ramificação dentro das árvores foi avaliada pela análise bootstrap, utilizando o programa MEGA (versão 5) (Tamura et al., 2011).

Tabela 02- Primers dos genes específicos utilizados na análise MLST (Spilker et al., 2009).

Gene	Direção	Sequência do Primer
<i>atpD</i>	F	GTTTCATCTGGCCGTACAC
	R	AACTGACGCTCGAAGTCC
<i>gltB</i>	F	CTTCTTCTTCGTCGCCGA
	R	TTGCCGACGTAGTCGTTG
<i>gyrB</i>	F	ATCGTGATGACCGAGCTG
	R	CGTTGTAGCTGTCGTTCC

Fonte: (Spilker et al., 2009).

4.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Burkholderia* spp.

4.2.1. Análise da capacidade de inibir bactérias patogênicas

O ensaio de antagonismo contra bactérias foi realizado pelo método de sobrecamada. Para isso, os isolados de *Burkholderia* spp. foram cultivados em meio TSB por 24 horas a 28°C, e foi ajustado a O.D. _{600 nm} inicial de 1,0. Após do crescimento, foram gotejadas alíquotas de 10 µl em placas de Petri contendo meio sólido TSA, e incubadas a 28°C por 48 horas, permitindo que o metabólito produzido pudesse difundir pelo meio de cultura. Após este crescimento, as culturas foram inativadas por exposição à radiação UV (270 nm) por 1 hora numa altura de 50 cm das placas. Depois da inativação, foi adicionada uma sobrecamada de 5 mL de meio de cultura TSA semi-sólido, contendo 1000 µl de cultura da bactéria patogênica (*Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

multi-resistente) pré crescidas em meio TSB por 24 horas a 28°C sob agitação a 150 rpm. Esta cultura foi incubada por 48 horas a 28°C, posteriormente foi avaliada a presença de halo de inibição, o qual indicou a produção de compostos antimicrobianos (Mano, 2011). Os testes foram realizados com 6 réplicas.

4.2.2. Análise da capacidade de inibir fungos fitopatogênicos

Para as análises da atividade antifúngica, foi utilizado o método de pareamento. Para isso, isolados de *Burkholderia* spp. foram cultivado em meio TSB por 24 horas a 28°C. Após crescimento, foram gotejadas alíquotas de 10 µl desta cultura bacteriana na extremidade de placas de Petri contendo meio BDA, e incubado por 48 horas, a 28°C. Após este período, foram colocados na outra extremidade da placa de Petri, sobre o meio BDA, discos de ágar com diâmetro de 6 milímetros contendo o fungo fitopatogênico (*Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum* sp., ou *Ceratocystis fimbriata*) e incubados a 30 °C por até 5 dias. A produção de composto antifúngico foi confirmada pela presença de um halo de inibição da colônia do fungo (Mitidieri, 1988). Como controle, o fungo de interesse foi crescido nas mesmas condições, na ausência da bactéria. Todas as análises foram realizadas com 6 réplicas.

4.2.3. Avaliação de virulência a *Galleria mellonella*

Para avaliar a virulência de *Burkholderia* spp. a *G. mellonella*, foram utilizadas lagartas com peso de aproximadamente 100-200 mg. Para o inóculo, as linhagens de *Burkholderia* sp. foram crescidas em meio TSB por 24 horas a 28°C. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada (13.000 rpm) por 5 min e ressuspendido em Tampão fosfato-salino (PBS) (Barnoy et al., 2017), a concentração de células foi ajustada para uma O.D. $_{600\text{ nm}} = 1,0$, e a partir dessa concentração foram feitas diluições do inóculo até 10^7 , para confirmar a concentração e pureza dos inóculos, 20 µl da diluição 10^6 e 10^7 de cada inóculo foram semeadas sobre meio de cultura TSA. Dez µl de suspensão bacteriana na diluição 10^1 de cada inóculo foram aplicadas na última pró-leg do lado esquerdo das lagartas. Após inoculação, as larvas foram mantidas em placa de Petri (140 x 20 mm) a 28°C. Para cada tratamento foram montados dois controles negativos, um de 10 lagartas sem inoculação e um controle inoculado com PBS. A mortalidade na *G. mellonella* foi avaliada diariamente por até 7 dias. Os ensaios de inoculação de bactérias nas larvas de *G. mellonella* foi realizado em triplicata, contendo em cada réplica 10 lagartas (Pereira et al., 2015).

4.2.4. Resistência a antibióticos

O antibiograma foi implementado usando uma suspensão do inóculo da linhagem de *Burkholderia* sp. em salina com densidade inicial equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland, a suspensão foi feita a partir das colônias da linhagem previamente crescidas em meio TSA. A bactéria de interesse foi inoculada uniformemente sobre a superfície do meio de cultura Mueller-Hinton com auxílio de um swab de algodão esterilizado e mantido por 10 minutos no fluxo laminar para secar. Posteriormente foram aplicados os discos de antibiótico (**Tabela 03**). Como controle foi utilizada a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278533, aplicando o mesmo procedimento implementado nas cepas de *Burkholderia* spp. previamente mencionado. As culturas foram incubadas a 28 °C por 24 horas, após o crescimento foi realizada a leitura, os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados com uma régua na parte de trás da placa de Petri invertida, para a interpretação do tamanho dos halos de inibição se teve em conta a escala do tamanho do halo em milímetros reportada no livro Performance Standards for Antimicrobial do Clinical and Laboratory Standards Institute, classificando os organismos, como sensíveis, intermediários, ou resistentes aos agentes testados. Para o desenvolvimento desta análises foram usados os equipamentos e materiais do Lab. Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas do Instituto de Ciências Biomédicas na USP.

Tabela 03- Classe de antimicrobiano utilizado e concentração dos discos.

Classe	Antimicrobiano	Concentração do disco (µg.ml ⁻¹)
Sulfonamidas	Sulfametazonol-Trimetoprima (SZT)	25
Anfênicóis	Cloranfenicol (CLO)	30
Carbapenêmicos	Imipenema (IPM)	10
	Meropenem (MER)	10
Cefalosporinas	Ceftazidima (CAZ)	30
	Cefepima (CPM)	30
Quinolona	Levofloxacina (LVX)	5
	Piperacilina (PIP)	20
Beta-lactâmico	Piperacilina + Tazobactam (PPT)	110
	Ticarcilina + Ac. Clavolanico (TIC)	85

	Carbenicillin (CAR)	100
Monobactâmicos	Aztreonam (ATM)	30
Glicilciclina	Tigeciclina (TIG)	15
	Minociclina (MIN)	30
Tetraciclina	Doxiciclina (DOX)	30
	Tetraciclina (TET)	30

Fonte: Propria autoria.

4.2.5. Biocontrole da necrose da orquídea cauda por *B. gladioli*

Para avaliar a capacidade de controlar a necrose de orquídeas, as diferentes linhagens de *Burkholderia* spp. foram crescidas em meio TSB por 24 horas a 28°C, posteriormente foi feita uma lavagem com tampão PBS e ajustada a densidade celular para OD_{600nm} = 1,0, cinco µl desta suspensão foram colocadas sobre folhas de orquídeas 'Aloha Iwanaga' (híbrido entre: *Oncidium goldiana* x *Oncidium Star Wars*) sobre a perfuração previamente feita com agulha de seringa estéril (Araújo et al., 2016). Todos os isolados de *Burkholderia* spp. foram co-inoculados com *B. gladioli* LMG 2216. Como controles positivos e negativos foram inoculados apenas *B. gladioli* LMG 2216 e PBS respectivamente. Três réplicas biológicas foram feitas por estirpe. As plantas foram mantidas a 25 °C com umidade relativa de 85% por 5 dias. As plantas foram observadas diariamente quanto à presença de necrose ao redor do ponto de inoculação de *B. gladioli*.

4.2.6. Solubilização de fosfato e produção de sideróforos e endoglicanase

A capacidade de *Burkholderia* spp. em solubilizar fosfato inorgânico foi avaliada de acordo com Verma et al. (2001), utilizando meio de cultura suplementado com Ca₃(PO₄)₂ e incubado a 28 °C por até 7 dias. A solubilização do fosfato foi confirmada pela presença de um halo translúcido ao redor da colônia.

A produção de sideróforos foi testada de acordo com Schwyn e Neilands (1987), utilizando o meio Ágar Cromo Azurol S (CAS) e incubado a 28 °C por 3 dias. Um halo amarelo ou laranja ao redor da colônia bacteriana indicou resultado positivo para a produção de sideróforos.

Para avaliação da produção de endoglucanase, os isolados de *Burkholderia* spp. foram cultivado sobre meio mínimo M9 (Sigma) contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de

Carboximetilcelulose (CMC) (w/v) e incubado a 28 °C por 3 dias. Após do crescimento microbiano, foram adicionados 10 ml de corante Vermelho Congo, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e lavadas com NaCl (5M). A presença de um halo incolor ou amarelado ao redor da colônia indicou a atividade endoglicolítica (Teather e Wood, 1982).

5 RESULTADOS

5.1 BANCO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Burkholderia* sp. E SUA CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Os 15 isolados de *Burkholderia* spp. estudados neste trabalho foram isolados de ambientes como solo, rizosfera, superfície de raízes ou do interior de tecidos vegetais. Aproximadamente 53% (CV3.2.2F5, TC3.4.1R1, TH3.3.2F5, CV3.3.3F2, TC3.4.2R2, TC3.3.3F1, TC3.4.1F2, e TC3.4.2R3) desses isolados foram isolado de cana de açúcar (*Saccharum* spp.) (**Tabela 01**). Além disso, 2 isolados foram previamente identificados, *B. gladioli* (LMG2216) e *B. seminalis* (TC3.4.2R3).

Para a identificação genotípica dos isolados foi realizada uma análise prévia baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA. A árvore filogenética confirmou que as quinze linhagens analisadas neste trabalho pertencem ao gênero *Burkholderia*, mas que divergem formando dois clados, de forma semelhante ao descrito por Eberl e Vandamme (2016) para o gênero *Burkholderia*. As cepas identificadas formaram o clado de “Espécies Patogênicas” com cor amarela e as cepas agrupadas no clado “Espécies Ambientais” com cor verde (**Figura 01**). As quinze cepas foram agrupadas no clado de Espécies Patogênicas, com valores de bootstrap de 74% para linhagem LMG2216 agrupada com a espécie *B. gladioli*. Também foi observada um agrupamento específico das linhagens CMAA 1233, 93Rz, 67 SI, AN 5.5 e TC3.4.2R3 com as espécies *B. ambifara*, *B. pyrrocina*, *B. multivorans*, *B. cepacia*, *B. vietnamensis* e *B. anthina*. Isso indica que essas cepas possivelmente fazem parte do complexo Bcc (**Figura 01**).

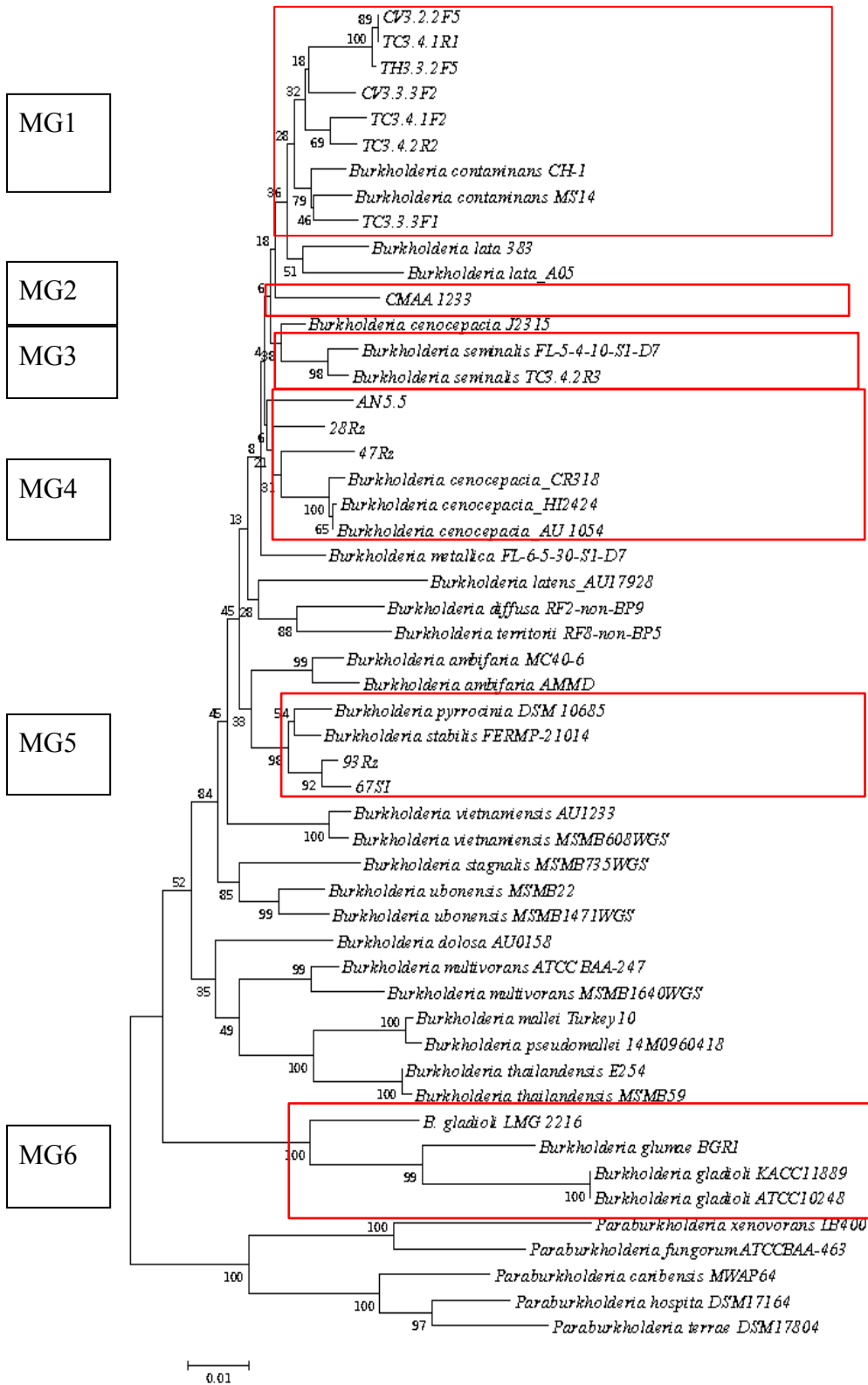
O gene 16S rRNA não permite fazer uma identificação precisa dos isolados. Por essa razão, todas as linhagens foram submetidas à técnica de MLSA para determinação das relações filogenéticas. A partir da amplificação e sequenciamento dos genes housekeeping *atpD*, *gyrB* e *gltB*, testados com êxito para a análise do complexo Bcc, a técnica tem demonstrado sucesso na tipagem precisa de bactérias deste gênero *Burkholderia*, permitindo diferenciar claramente todas as espécies existentes no complexo Bcc (Baldwin et al. 2007). A árvore baseada na análise filogenética de multilocus (**Figura 02**) confirmou a classificação dos clados das espécies Patogênicas e Ambientais, ou também nomeados como o clado *Burkholderia sensu stricto* e o clado *Paraburkholderia* respectivamente (Sawana et al. 2014).

Figura 01. Árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA (1200 pb) das linhagens analisadas (CMAA 1233, 93Rz, 67SI, AN 5.5, TC3.4.2R3, TC3.4.2R2, CV3.3.3F2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, TC3.3.3F1, 47Rz, CV3.2.2F5, TH3.3.2F5, 28Rz e LMG 2216) com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank. Enraizamento da árvore pelo método Neighbor-joining (Jukes e Kantor, 1969). O número nos ramos indica o valor de bootstrap, o qual foi calculado após 1000 réplicas. Foram utilizadas sete espécies diferentes do gênero *Chromobacterium* como grupo externo.



Fonte: Propria autoria.

Figura 02. Árvore fenética baseada na análise filogenética de multilocus (MLSA– Multilocus Sequence Analysis) dos genes *atpD*, *gltB*, e *gyrB* das linhagens analisadas (CMAA 1233, 93Rz, 67SI, AN 5.5, TC3.4.2R3, TC3.4.2R2, CV3.3.3F2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, TC3.3.3F1, 47Rz, CV3.2.2F5, TH3.3.2F5, 28Rz e LMG 2216) comparadas com sequências de linhagens disponíveis no banco de dados. Enraizamento da árvore pelo método Neighbor-joining (Jukes e Kantor, 1969). O número nos ramos indica o valor de bootstrap, o qual foi calculado após 1000 réplicas.



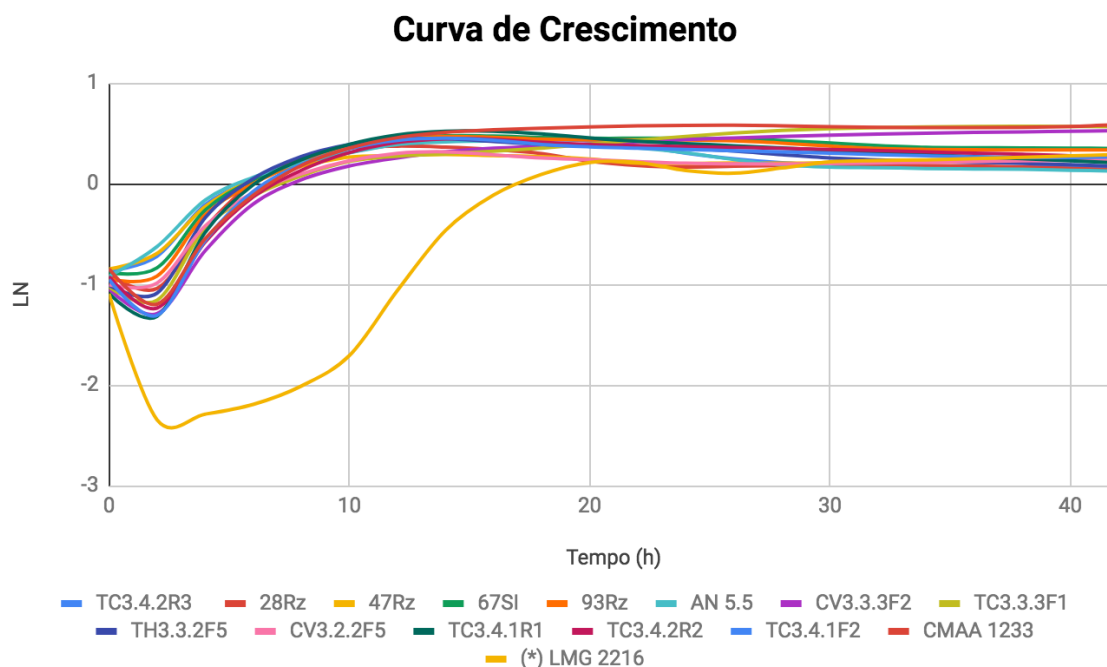
Fonte: Autoria propria.

A análise por MLSA permitiu agrupar as linhagens em 6 grupos (MG1 a MG6) (**Figura 02**). Com exceção da linhagem *B. gladioli* LMG2216 (MG6), as demais linhagens agruparam no complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) (Fig. 02). A cepa *B. seminalis* TC3.4.2R3 (MG3), um isolado obtido do interior de raízes de cana-de-açúcar, como o esperado agrupou com *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7, um isolado de solo. As linhagens CV3.2.2F5, TC3.4.1R1, TH3.3.2F5, CV3.3.3F2, TC3.4.1F2, TC3.4.2R2 e TC3.3.3F1 (Grupo MG1), todas isoladas de cana-de-açúcar, agruparam em um clado juntamente com *B. contaminantes*. A linhagem CMAA1233 (MG2) agrupou-se em um clado distante das espécies anteriores, sugerindo que possa ser uma nova espécie no complexo Bcc. As linhagens AN5.5, 28RZ e 47RZ (MG4) agruparam em um clado relacionado às linhagens de *B. cenocepacia*, mas não à linhagem epidêmica *B. cenocepacia* J2315. As cepas 93RZ e 67SI (MG5) agruparam em um clado com *B. stabilis* e *B. pyrrocinia*.

5.2 CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Burkholderia* spp.

Para padronizar as condições e observar as diferenças na taxa de crescimento às 15 linhagens foram avaliadas por até 42h. Com exceção de *B. gladioli* (LMG2216) que levou 20 horas para atingir a fase estacionária, as demais linhagens analisadas (*B. seminalis* TC3.4.2R3, 28Rz, 47Rz, 67SI, 93RZ, AN5.5, CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.2R2, TC3.4.1F2 e CMAA 1233) apresentaram curvas de crescimento semelhantes, atingindo a fase estacionária após de 12 horas (**Figura 03**). As bactérias atingiram uma fase Lag nas primeiras duas horas, seguido de uma fase logarítmica de até 12 horas. Nesta fase o crescimento exponencial das bactérias atingiu uma DO de 1.5, sendo esse o ponto que apresentou uma maior taxa de crescimento. Após 12h é possível observar que os isolados alcançam a fase estacionária até a hora 42, tempo da última leitura feita no espectrômetro.

Figura 03 - Curva de crescimento das quinze linhagens (*B. gladioli* LMG2216, *B. seminalis* TC3.4.2R3, 28Rz, 47Rz, 67SI, 93RZ, AN5.5, CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.2R2, TC3.4.1F2 e CMAA 1233), sendo representado no eixo X o tempo em horas, e no eixo Y o LN (Logaritmo natural) dos dados obtidos pelo leitor de placa. Leituras realizadas no leitor de placas BioTek, sob as condições de crescimento de 28 °C, 425 rpm ao longo de 42 horas no meio TSB.



Fonte: Propria autoria.

Para identificar o potencial biotecnológico e caracterizar fisiologicamente os isolados analisados neste trabalho, foram desenvolvidos testes de avaliação de virulência a *G. mellonella*, controle da necrose gerada por *B. gladioli* LMG 2216 em folhas de orquídeas 'Aloha Iwanaga', a sua capacidade de inibir fungos e bactérias fitopatogênicas, solubilização de fosfato, e produção de sideróforos e endoglucanase. Os resultados obtidos foram representados na **Tabela 04** tendo em conta o agrupamento das linhagens feito no análise por MLSA.

Tabela 04 - Virulência à *Galleria mellonella*, controle da necrose das orquídeas, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e endoglucanase, e atividade antimicrobiana de *Burkholderia* spp. contra fungos e bactérias. A síntese do composto antimicrobiano foi avaliada in vitro pela presença de halo de inibição.

Cepa	Grupo MLSA	virulência em <i>G. mellonella</i>	Controle da necroses em orquídeas ⁱⁱ	Eco ⁱⁱⁱ	Bsp ⁱⁱⁱ	Cep ^{iv}	Fuv ^{iv}	Asf ^{iv}	Sideróforo	Endoglucanase	Fosfato
CV3.3.3F2		1	+	I ^v	I	I	I	I	H ^{vi}	H	H
TC3.3.3F1		1	+	I	I	I	I	I	H	H	H

TH3.3.2F5		2	+	I	I	I	I	I	H	H	H
CV3.2.2F5	MG1	2	+	I	I	I	NI	I	H	H	H
TC3.4.2R2		1	+	I	I	I	I	I	H	H	H
TC3.4.1R1		1	-	I	I	I	I	I	H	H	H
TC3.4.1F2		1	-	I	I	I	I	I	H	H	H
CMAA 1233	MG2	3	+	NI	I	NI	I	NI	H	H	H
TC3.4.2R3	MG3	2	+	I	I	I	I	NI	H	H	H
AN 5.5		3	+	NI	I	I	NI	I	H	H	H
28Rz	MG4	2	-	NI	I	I	I	I	H	H	H
47Rz		1	+	NI	I	I	I	I	H	H	H
67SI	MG5	2	-	I	NI	I	I	I	H	H	H
93Rz		2	+	I	NI	I	I	I	H	H	H
LMG 2216	MG6	3	NR	NI	I	I	I	I	H	H	H

ⁱ Mortalidade aos 7 dias: 1 => 95%; 2 = intervalo de 60 a 85%; 3 = < 25%

ⁱⁱ +: controle da necrose das orquídeas causada por *Burkholderia gladioli*; -: sem controle da necrose das orquídeas; NR: não realizado

ⁱⁱⁱ *Escherichia coli* (Eco) e *Bacillus* sp (Bsp).

^{iv} *Ceratocystis paradoxa* (Cep), *Fusarium verticillioides* (Fuv) e *Aspergillus fumigatus* (Asf).

^v I: halo de inibição e NI: halo de inibição não observado.

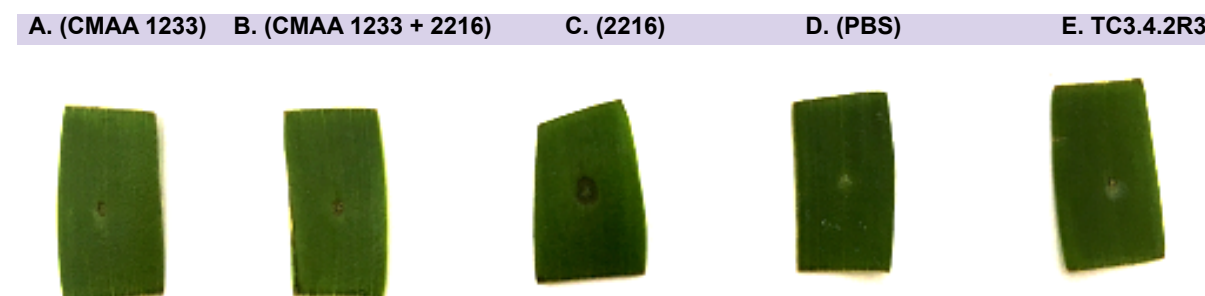
^{vi} H: halo formado a partir da síntese de sideróforos, endoglucanase e degradação do fosfato de cálcio respectivamente.

Fonte: Propria autoria.

Os resultados obtidos demonstraram que 100% dos isolados foi capaz de inibir o fungo *C. fimbriata* e *Colletotrichum* sp., 93% inibiu o fungo *C. paradoxa* (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, TC3.4.2R3, AN 5.5, 28Rz, 47Rz, 67SI, 93Rz, e LMG 2216), 87% inibiu os fungos *F. verticillioides* (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, TC3.4.2R3, 28Rz, 47Rz, 67SI, 93Rz, e LMG 2216) e *A. fumigatus* (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, AN 5.5, 28Rz, 47Rz, 67SI, 93Rz, e LMG 2216). Em relação a atividade antibacteriana, foi observada que 67% dos isolados inibiu a bactéria *E. coli* (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, TC3.4.2R3, 67SI e 93Rz), 87% *Bacillus* sp. (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, CMAA 1233, TC3.4.2R3, AN 5.5, 28Rz, 47Rz e LMG 2216), 100% *S. aureus*. Nenhum isolado foi capaz de inibir a cepa multi-resistente de *P. aeruginosa*. A análise dos resultados permite ver que todas as linhagens avaliadas, com

exceção das linhagens CMAA 1233, conseguem inibir do 80-90% das bactérias e fungos patogênicos analisados (**Tabela 04**).

Figura 04. Resultado do teste de controle da necrose em orquídeas 'Aloha Iwanaga', depois de 5 dias de inoculação a 25 °C com umidade relativa de 85%. Da esquerda para a direita A. isolado CMAA1233, B. isolado CMAA 1233 junto com *B. gladioli* LMG 2216, C. controle positivo *B. gladioli* LMG 2216, D. controle negativo solução de PBS, e E. isolado TC3.4.2R3.



Fonte: Propria autoria.

No teste de controle da necrose em orquídea foi observado que 70% (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, CMAA 1233, TC3.4.2R3, AN 5.5, 47Rz e 93Rz) dos isolados foi capaz de controlar a necrose de orquídea (**Figura 04**), inibindo completamente os sintomas de *B. gladioli*. Em relação ao teste de virulência em *G. mellonella* 40% (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2 e 47Rz) dos isolados causaram 100% de mortalidade de larvas, 40% (TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R3, 28Rz, 67SI e 93Rz) causaram uma mortalidade inferior de 85% e maior a 60%, e 20% (CMAA 1233, AN 5.5 e LMG 2216) causaram uma mortalidade inferior a 25%. Na análise da atividade enzimática 100% dos isolados apresentaram capacidade de sintetizar sideróforos, endoglucanase e degradar do fosfato de cálcio (**Tabela 04**).

5.3 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.

Para verificar se os clados nos quais foram inclusos nossos isolados ambientais identificados no MLSA tinham uma correlação com um perfil de sensibilidade aos antibióticos foram executados ensaios de difusão em disco (**Tabela 03**) com 16 antimicrobianos pertencentes a nove classes diferentes. Todas as linhagens foram sensíveis à Cefalosporinas Ceftazidima e Cefepima, Levofloxacina (Fluoroquinolona), Meropenem (Carbapenem), Tigeciclina (Gliciliciclina), Piperacilina + Tazobactam (β -lactama) e cloranfenicol (anfenicol). A maioria (5 de 6) das linhagens do grupo MG1 foi resistente aos β -lactâmicos (Piperacilina, Carbenicilina e Ticarcilina + Ac. Clavulanico), mas o isolado

CV3.3.3F2 foi sensível/intermediário. Todos os isolados do grupo MG4 foram sensíveis sensível/intermediário aos β -lactâmicos, enquanto a linhagem TC3.4.2R3 do grupo MLSA MG3 foi resistente a todos estes antibióticos. Dos dois isolados do grupo MG5, a linhagem 67SI foi sensível/intermediária para todos os testes com antibióticos, enquanto a linhagem 93RZ apresentou resistência à Trimetoprima- Sulfametoxazol, Piperacilina, Ticarcilina + Ac. Clavolanico, Carbenicilina, Aztreonam, Tetraciclina e Doxiciclina (**Tabela 05**). Adicionalmente, as linhagens CV3.3.3F5 e TH3.3.2F5 do grupo MG1, a linhagem CMAA1233 do grupo MG2, e a linhagem 93RZ do grupo MG4 foram resistente à Tetraciclina. Apenas as linhagens TC3.4.1F2 e 93RZ foram resistentes a Imipenem e a Doxiciclina, respectivamente (**Tabela 05**). A cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, utilizada como controle neste teste, apresentou como resultado os breakpoints registrados para esta linhagem no livro Performance Standards for Antimicrobial do Clinical and Laboratory Standards Institute,

Tabela 05- Sensibilidade *in vitro* de cepas de *Burkholderia* (N = 15) para os 9 antibióticos testados (PIP: Piperacilina, CAR: Carbenicillin, TIC: Ticarcilina + Ac. Clavolanico, ATM: Aztreonam, IPM: Imipenema, SZT: Sulfametozol-Trimetoprima, DOX: Doxíciclina, TET: Tetraciclina e MIN: Minociclina) que alguns isolados apresentaram resistência, testando discos de antibióticos específicos de *Burkholderia* sp, *P. aeruginosa* e antibióticos de importância Clínica. sendo S (sensível), I (Intermedio), e R (resistente).

Cepa	Grupo MLSA	PIP	CAR	TIC	ATM	IPM	SZT	DOX	TET	MIN
CV3.3.3F2	MG1	S	I	I	S	S	S	I	S	I
TC3.3.3F1		R	R	R	S	S	S	S	I	S
TH3.3.2F5		R	R	R	I	I	S	I	R	S
CV3.2.2F5		I	R	R	R	S	S	S	R	S
TC3.4.2R2		R	R	R	S	S	S	S	S	S
TC3.4.1R1		I	R	R	S	S	S	S	I	S
TC3.4.1F2		R	R	R	I	R	S	S	I	S
CMAA 1233	MG2	R	R	R	R	I	S	S	R	S
TC3.4.2R3	MG3	R	R	R	S	S	S	S	S	S
AN 5.5	MG4	S	I	I	S	S	S	I	S	I
28Rz		S	I	I	S	S	S	S	S	S
47Rz		I	I	I	S	S	S	I	S	I
67SI	MG5	S	S	I	S	S	S	I	S	I
93Rz		R	R	R	R	S	R	R	R	S
LMG2216	MG6	S	S	I	S	S	S	I	S	S

Fonte: Propria autoria.

6 DISCUSSÃO

O Brasil é conhecido por ser o maior produtor de cana-de-açúcar, dominando o mercado na obtenção de etanol e açúcar (Goldemberg, 2007), 18% do total de energia consumida no Brasil vem do etanol de cana-de-açúcar, sendo a segunda fonte de energia no país (Jank, 2010). Segundo a FAO (Organização de agricultura e comida) em 2012 o Brasil com suas condições favoráveis do solo e do clima era o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção total de 720 milhões de toneladas por ano, seguida pela Índia, China e Tailândia (Monteiro e Sentelhas, 2014). Dessa forma, entender e conhecer melhor a microbiota associada a esta planta é relevante para melhorar ainda mais a produtividade e sustentabilidade desta cultura.

Previamente catalogadas como rizobactérias potentes na promoção de crescimento (PGPR), as espécies benéficas de plantas (PBE) do gênero *Burkholderia* são comumente encontradas no solo e rizosfera de grandes culturas agrícolas como cana de açúcar, milho, arroz, trigo, tomate e batata (Luvizotto et al., 2010). Dos isolados analisados neste trabalho 53% (CV3.2.2F5, TC3.4.1R1, TH3.3.2F5, CV3.3.3F2, TC3.4.2R2, TC3.3.3F1, TC3.4.1F2, e TC3.4.2R3) são cepas isoladas de rizosfera e tecidos de raízes de cana-de-açúcar (cv. SP80-1842) cultivadas por 3 meses em campo experimental localizado em Piracicaba, Brasil (22410 S 47330 W) (Luvizotto et al., 2010). Mendes e colaboradores (2007) também isolaram várias cepas da cana de açúcar, das quais identificaram a partir das sequências do gene 16S rRNA que 13 dos 15 isolados endofíticos obtidos pertenciam ao gênero *Burkholderia*, afirmando assim que os isolados relacionados ao complexo Bcc são parte integrante da comunidade bacteriana endofítica da cana-de-açúcar, embora a maioria dos estudos sobre a ocorrência de cepas do complexo Bcc em habitats naturais tem se focado na rizosfera de milho (Dalmastrri et al., 2007), além disso Mendes e colaboradores (2007) ressaltaram a capacidade identificada nesses isolados na produção de pirrolnitrina que inibe o crescimento de *Fusarium verticillioides*, patógeno associado a doença Pokkah boeng em cana de açúcar, e a produção do hormônio de crescimento de plantas IAA (Mendes et al., 2007).

Contudo, algumas espécies do complexo Bcc podem estar relacionadas com doenças em plantas, animais e humanos (Perin et al., 2006), como é o caso do isolado LMG 2216 (previamente identificado como *B. gladioli* ATCC10248) considerado essencialmente como um agente patogênico de plantas. A espécie *B. gladioli* foi descrita primeiramente como

patogênica para *Gladiolus* spp (McCulloch 1921), e depois foi achada sua patogenicidade em outras espécies de plantas como o arroz (Ura et al., 2006), cebola (Lee et al., 2005) e orquídeas (Mano et al., 2015). Linhagens da espécie *B. gladioli* já foram recuperadas também de pacientes com Fibrose Cística (FB), porém os dados de estudos não indicam que esta espécie seja patogênica para estes pacientes (Simpson et al., 1994). Dessa forma, no presente trabalho foram desenvolvidos experimentos de identificação genética e fenotípica dos isolados de *Burkholderia* sp., para conhecer suas características e possíveis capacidades de cada um dos isolados.

Os resultados obtidos da análise genotípica a partir da árvore filogenética baseada na comparação das sequências do gene 16S rRNA, e a árvore fenética baseada na análise filogenética de multilocus (MLSA) (**Figura 01 e 02**) demonstraram que todos as cepas pertencem ao gênero *Burkholderia*, sendo que a maior parte dos isolados foram identificados como possíveis membros do complexo Bcc, grupo comumente conhecido como um conjunto de bactérias com potenciais patogênicos para pessoas imunocomprometidas ou com fibrose cística. Entretanto, existem estudos sistemáticos que examinam a distribuição ambiental de espécies nesse complexo Bcc e indicam que existem populações que interagem com plantas de cultivo, sendo este um dos habitats mais importantes para essas bactérias. Além disso, os mesmos estudos apontam a capacidade dessas bactérias na produção de substâncias com potencial antagonista para patógenos de plantas (Heungens e Parke 2000). As linhagens analisadas no presente trabalho foram isoladas de solo ou associadas à plantas. Adicionalmente a linhagem TC3.4.2R3 apresenta potencial biotecnológico, esta bactéria tem a capacidade de controlar fungos e bactérias patogênicas, além de produzir antibióticos (Araújo et al. 2016).

Embora os resultados não permitam definir as cepas CV3.2.2F5, TC3.4.1R1, TH3.3.2F5, CV3.3.3F2, TC3.4.1F2, TC3.4.2R2, TC3.3.3F1, CMAA1233, AN5.5, 28RZ, 47RZ, 93RZ e 67SI como espécies novas, eles mostram um agrupamento diferenciado com as linhagens utilizadas nesta análise de comparação genética. Essa abordagem foi utilizada por Peeters et al. (2013), quem também implementou a análise filogenética tanto do gene 16S rRNA como da análise MLST com sete fragmentos de genes housekeeping (*atpD* (443 pb), *gltB* (400 pb), *gyrB* (454 pb), *recA* (393 pb), *lepA* (397 pb), *phaC* (385 pb) e *trpB* (301 pb)), com onze isolados clínicos e ambientais humanos, seus resultados representam uma nova espécie dentro do complexo Bcc, com *B. multivorans* como vizinho filogenético mais

próximo, propondo assim os onze isolados como a espécie *Burkholderia pseudomultivorans* sp. com a cepa LMG 26883T como type strain. Considerando que no presente trabalho foi possível ter uma aproximação na distribuição filogenética dos isolados analisados, se sugere em estudos posteriores o emprego da análise MLST adicionando novas informações de genes conservados do gênero *Burkholderia* sp. e mais outras linhagens que estejam disponíveis na base de dados para a identificação precisa desses.

Devido às grandes perdas econômicas e danos irreversíveis causados pelos fungos e bactérias fitopatogênicas em cultivos agrícolas, nos últimos anos têm aumentado o interesse no conhecimento e uso de alternativas de biocontrole destes fitopatógenos, minimizando o uso de pesticidas. O uso dos micro-organismos antagonistas a patógenos de plantas pode ser uma das melhores alternativas para esta finalidade (Copping e Menn, 2000). Para conhecer melhor sobre as habilidades que podem ter as linhagens estudadas no atual trabalho e sua possível aplicação em processos de biocontrole de patógenos agrícolas, foram feitas curvas de crescimento e caracterização fisiológica dos isolados. O crescimento observado foi semelhante entre todas as cepas, com exceção da linhagem LMG2216, marcada com (*) no gráfico da **Figura 03** para ressaltar a linhagem que teve um comportamento diferenciado em relação aos outros isolados. Com uma velocidade de crescimento relevantemente menor de μ : $1,05 \text{ h}^{-1}$ em comparação com as outras linhagens que tiveram uma velocidade de crescimento entre $1,25 \text{ h}^{-1}$ da linhagem CV3.2.2F5 e $1,77 \text{ h}^{-1}$ da linhagem TC3.4.1F2. Essa diferença pode indicar que as condições nas quais a linhagem *B. gladioli* LMG2216 foi avaliada não foram totalmente favoráveis para seu rápido crescimento, explicando sua taxa de crescimento menor.

Estudos prévios recomendam a utilização de meios modificados ou específicos para o crescimento ótimo de *B. gladioli*. Tais condições são o meio mínimo IMM a 25°C (Scuderi et al., 2009), ou meios específicos como o agar PC (*P. cepacia* medium) (Coenye et al., 2001), e agar de *B. cepacia* (Coenye et al., 2001), ou meios que simulam os nichos ambientais, como o solo ou rizosfera, tais como o Meio Semi-sólido Livre de Nitrogênio (Baz) ou PCAT, o último meio é específico para *B. cepacia*, com pH 5.7 ou maiores de 9 (Santos, 2001), o qual não atinge os objetivos do presente trabalho. Por outro lado, existem trabalhos que indicam o uso dos meios de cultura nutritivos como o TSA, TSB e LB e a temperatura 28°C para o crescimento de diferentes linhagens do gênero *Burkholderia* (Araújo

et al., 2002; Luvizotto et al., 2010). Com um pH = 7,3 +/- 0,2, este meio proporciona as fontes nutricionais e condições básicas para o crescimento bacteriano. Tendo em vista o crescimento bacteriano nas condições implementadas, foram padronizadas essas condições para o crescimento destas bactérias.

A análise de MLSA permitiu identificar as linhagens utilizadas no presente trabalho e na análise de crescimento, foi observado que com exceção da linhagem de *B. gladioli*, todas apresentam crescimento similar no meio de cultura. Portanto, tendo em vista que se trata de espécies do complexo Bcc, é preciso fazer análises fisiológicas que possam demonstrar o potencial biotecnológico e risco a saúde humana e animal destas bactérias. Araújo e colaboradores (2017) fizeram análises dos metabólitos secretados pelas colônias de *B. seminalis* TC3.4.2R3 achando diferentes moléculas de especial interesse, eles implementaram técnicas como MALDI-MSI e ESI-FT-ICR-MS que lhes permitiu identificar a produção de pyochelin, uma molécula usada por esta cepa para inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *F. oxysporum* em uma ação sinérgica com outros metabólitos difusos, esta molécula é um sideróforo que também pode promover a virulência de *B. seminalis* uma vez que a pyochelin desempenha um papel central no seqüestro de ferro (Moree et al., 2012; Coxt et al., 1981). Também foi identificados ramnolípidos como Rha-Rha-C15-C14 nos metabólitos liberados pela *B. seminalis* TC3.4.2R3, metabólito também identificado em *B. pseudomallei* e *Burkholderia thailandensis* mostrando atividades citotóxica e hemolítica, facilitando assim a motilidade e sobrevivência dessas cepas em diferentes ambientes (Haubler et al., 1998).

Analisando os dados obtidos com o estudo filogenético, é possível ver que as cepas pertencentes ao Grupo MG1 (**Tabela 04**), agrupado no mesmo clado com isolados da espécie *B. contaminans*, são as cepas que apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra os fungos e bactérias patogênicas avaliadas. Tendo em conta os resultados, é possível sugerir que essas cepas têm a capacidade de produzir compostos antibacteriano e antifúngico, que pode estar relacionado com a habilidade que têm as cepas da espécie *B. contaminans* em produzir compostos antifúngicos como as occidiofungins identificada em *Burkholderia contaminans* MS14 (Lu et al., 2009). Estes compostos são metabólitos secundários de caráter oligopeptídeo, glicosilados cíclicos que são sintetizados por uma Peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS). Tais metabólitos apresentam uma potente atividade antifúngica contra

diferentes fungos patogênicos de animais e plantas, como *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *R. solani* e espécies de *Phytium* (Lu et al., 2009).

As espécies de *Burkholderia* relacionadas ao complexo Bcc são caracterizadas também por produzirem cepafungins, ou glidobactinas. Estas moléculas possuem ação antifúngica e antitumoral de amplo espectro (Schellenberg et al., 2007), a qual pode estar associada com a alta porcentagem de inibição fúngica observada por parte das linhagens avaliadas. A pirrolnitrina, é outro potente metabólito antifúngico e antibacteriano que pode ser sintetizado por *Burkholderia* spp., esta molécula desempenha um papel importante na atividade de controle biológico de linhagens Bcc contra fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* spp. (Burkhead et al., 1994; Hwang et al., 2002). Além disso, pode inibir o crescimento da levedura *C. albicans* e várias bactérias Gram-positivas (El-Banna e Winkelmann, 1998), corroborando assim os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana, onde a maioria das linhagens identificadas dentro do Bcc conseguiram inibir a bactéria Gram-positiva *Bacillus* sp. e o fungo *Fusarium verticillioides*. Exceção foram as linhagens CV3.2.2F5 e AN 5.5 que não inibiram *Fusarium verticillioides* e as linhagens 67SI e 93Rz que não inibiram *Bacillus* sp.

B. gladioli é conhecida por produzir vários metabólitos tóxicos e antimicrobianos, como a toxina respiratória ácido bongkreki. Toxina identificada previamente como o produto de biossíntese de um agrupamento de policetídeos em *B. gladioli* pv. *cocovenenans* (Moebius et al., 2012). Existem estudos que demonstram como estes compostos antimicrobianos têm atividade antibacteriana e antifúngica contra espécies de *Staphylococcus*, *Candida*, e *R. microsporus*. Isto permite explicar a alta atividade inibitória que apresentou a linhagem LMG 2216 contra a todas as bactérias e fungos patogênicos testados, a exceção de *E. coli*. Dessa forma, demonstrando apresentar uma arsenal químico para inibição de outros micro-organismos, fato este que poderia estar associada à virulência à plantas, porque embora seja considerado uma linhagem com grande potencial biotecnológico, *B. gladioli* é considerada um agente patógeno de plantas (Mano et al., 2015; Depoorter, 2016).

Estudo anterior demonstrou que a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 é capaz de suprimir a necrose causada por *B. gladioli* em diferentes espécies de orquídeas além de inibir

in vitro fungos e bactérias de interesse agrícola (Araújo et al., 2016). Dessa forma, no presente trabalho a capacidade de outras linhagens em controlar a necrose de orquídeas foi avaliada. Os resultados permitiram observar que 66% dos isolados avaliados foram capazes de suprimir a necrose de orquídea, causada por *B. gladioli* LMG 2216 (Tabela 04), com exceção de TC3.4.1R1, TC3.4.1F2 do Grupo MG1, 28Rz do Grupo MG3, e 67SI do Grupo MG4. Trabalhos prévios têm demonstrado a capacidade de *Burkholderia* spp. em controlar a necrose em fragmentos foliares de diferentes espécies de orquídeas contra os sintomas causados por *B. gladioli* (Minami, 2006; Mano, 2015; Araújo et al., 2016). No presente trabalho foi observado que ocorreu de forma eficiente o controle desta necrose de orquídea, especialmente os membros do Grupo MG1, onde cinco dos setes isolados controlaram os sintomas causados por esta bactéria. Neste grupo MG1 está a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, a qual é utilizada como padrão para esta característica.

Tendo em conta a importância das orquídeas como planta ornamental explorada comercialmente no Brasil e a fase de expansão nos setores agrícolas, é importante controlar patógenos e pragas, os quais têm sido causadas por uma diversidade de agentes como insetos, ácaros, moluscos, nematóides, fungos, bactérias, e pelo menos 32 diferentes vírus (Campos, 2002; Duff e Daly, 2002; Malavolta e Almeida, 2012). Por isso torna-se uma necessidade a implementação de novas alternativas sustentáveis com o meio ambiente e eficientes no controle dessas doenças fitopatogênicas, apresentando assim o controle biológico como uma alternativa que em conjunto com outros métodos pode resolver este tipo de problemas de forma mais econômica e menos agressiva com o ecossistema em comparação aos produtos químicos que são comumente utilizados na agricultura (Azevedo et al., 2000).

Tendo em conta o anteriormente dito, recomenda-se continuar com o estudo de mecanismos genéticos e moleculares relacionados com a interação entre cepas do gênero *Burkholderia* e espécies fitopatogênicas. Um bom exemplo é o trabalho desenvolvido por Mano (2011), quem caracterizou diferentes mutantes que mostraram a perda da capacidade do controle biológico da cepa *Burkholderia* sp. TC3.4.2R3 na podridão mole em plantas de *Oncidium* Alowa Iwanaga quando comparado com a linhagem selvagem, para assim entender melhor os aspectos moleculares envolvidos na interação da bactéria patogênica *Pectobacterium carotovora* com o gênero *Burkholderia*. Nos resultados obtidos neste trabalho foram achados sete genes que podem estar envolvidos no controle biológico, sendo

estes a glicosiltransferase, proteína hipotética com sequências traço do 23 rRNA, região intermediária de uma proteína semelhante à patatina, glutamato sintase, proteína transportadora da família facilitadora principal, poli-beta-hidroxicanoato depolimerase e ácido graxos desaturase (Mano, 2011), os quais são genes que estão geralmente relacionados a processos de síntese de aleloquímicos, competição de nutrientes, adaptação a condições ambientais, e na interação com hospedeiros entre microrganismos (Compant et al., 2005). Outros estudos que podem ser feitos para entender melhor o controle biológico exercido por linhagens do gênero *Burkholderia* contra organismos fitopatogênicos, pode ser análise dos metabólitos liberados ou mapeamento da expressão gênica durante a interação (Mano et al., 2015).

Embora exista um grande interesse no uso de linhagens do gênero *Burkholderia* na área agrícola e industrial, este também pode ser severamente limitado devido ao risco potencial que algumas espécies representam para a saúde humana (Eberl e Vandamme, 2016). Assim, este trabalho se propôs analisar o potencial patogênico que tem as quinze linhagens em *G. mellonella*, usado como modelo animal. Os resultados mostraram que as linhagens do Grupo MLSA MG1 causaram mortalidade superior a 60% de *G. mellonella*, e cinco de sete cepas causaram 100% de mortalidade de larvas (CV3.3.3F2, TC3.3.3F1, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1 e TC3.4.1F2) (**Tabela 04**). Em geral, as cepas dos grupos MLSA MG2 (CMAA 1233), MG3 (TC3.4.2R3), MG4 (AN 5.5 e 28Rz), MG5 (67SI e 93Rz) e MG6 (LMG 2216) foram menos virulentas contra *G. mellonella* e também produziram menos compostos antimicrobianos contra *E. coli* (**Tabela 04**).

O comportamento observado nos resultados previamente descritos pode ser explicado com as observações feitas por Angus et al. (2014) no seu estudo de genômica comparativa, onde avaliou o potencial patogênico das linhagens ambientais com base na presença ou ausência de fatores de virulência. O estudo bioinformático mostrou claramente que muitos fatores de virulência conhecidos, tais como a detecção de quórum, produção de sideróforos, biossíntese de lipopolissacarídeos e sistemas de secreção tipo III, IV e VI são encontrados principalmente em representantes do grupo de espécies do clado *Burkholderia sensu stricto*. Enquanto estes fatores geralmente estão ausentes em linhagens do clado *Paraburkholderia*. Também há registros de linhagens do grupo de espécies ambientais que não apresentam virulência no modelo de infecção *Caenorhabditis elegans* (Angus et al., 2014).

No experimento feito com *G. mellonella* as linhagens AN5.5, CMAA 1233 e LMG 2216 apresentou mortalidade menor de 25% (**Tabela 04**), essas linhagens foram classificadas como possíveis espécies patogênicas nas análises filogenéticas. No entanto, existem estudos que demonstram como os fatores de virulência de espécies de *Burkholderia* podem ser específicos do hospedeiro, podendo mudar entre *C. elegans*, *Galleria mellonella* e *Drosophila melanogaster*, que são os modelos de infecção comumente usados. Esse comportamento está relacionado com a necessidade de linhagens do gênero *Burkholderia* para competir pela sobrevivência em diversos habitats como solo, plantas, insetos e hospedeiros de mamíferos (Schwager et al., 2013). Tendo em conta a informação prévia, é possível inferir que as linhagens analisadas no presente trabalho podem ser candidatos de alto interesse industrial pela sua boa atividade antimicrobiana e baixa taxa de mortalidade que apresentou em *Galleria mellonella*. Entretanto, também cabe ressaltar que além de avaliar a virulência em modelos de infecção não mamíferos e identificar a posição taxonômica da linhagem. Necessita-se de uma cuidadosa caracterização molecular e fenotípica da cepa, a fim de poder liberar o uso industrial ou biotecnológico da linhagem de *Burkholderia* (Eberl e Vandamme, 2016).

Na análise da atividade enzimática referente a síntese de endoglicanase foi observado que 100% dos isolados produziram esta enzima (**Tabela 04**), confirmado pela aparição de zonas claras ao redor das colônias, assim como foi previamente identificado em outras cepas do gênero *Burkholderia* como *B. pyrrocinia* JK-SH007 (Jia et al., 2011), *B. cenocepacia* H111 (Pessi et al., 2013) e *B. gladioli* (Hazem et al., 2012). Em algumas bactérias a produção de endoglicanase está associada com outras enzimas degradadoras da parede celular (glucanases, proteases e quitinases) e metabólitos secundários antifúngicos, atuando como um mecanismo de inibição do crescimento de fungos, pelo que é considerada uma das melhores alternativas de agentes de biocontrole contra fungos patogênicos (Jia et al., 2011).

Não entanto, a importância ecológica de *Burkholderia* sp. na liberação de endoglucanases no ambiente está relacionado a sua capacidade de colonizar as superfícies das raízes, algumas células rizodérmicas, locais de emergência das raízes laterais e as pontas das raízes, como foi observado no análise dos padrões de colonização de *Burkholderia* sp. PSJN (Compant et al., 2005), cepa que também foi associada com as reações de defesa do hospedeiro observadas na exoderme e em várias camadas de células corticais, o que levou à

conclusão que essa habilidade encontrada em *Burkholderia* sp. PsJN induz uma reação local de defesa do hospedeiro e sistemicamente se espalha para as partes aéreas através do fluxo de transpiração (Compant et al., 2005), o que permite explicar melhor os resultados obtidos da atividade enzimática de endoglicanase nos isolados analisados no atual trabalho, tendo em conta que 53% das cepas analisadas também foram isolados de ambientes como a rizosfera e raiz de cana de açúcar (**Tabela 01**).

A solubilização de fosfato é outra habilidade identificada no gênero *Burkholderia*, pelo que algumas cepas desse gênero tem sido previamente classificadas no grupo de microorganismos solubilizantes de fosfato (MSF) (Song et al., 2008). Mullan e colaboradores (2002) descreveram *Burkholderia cepacia*, como um grupo de bactérias que estão envolvidas na solubilização de fosfato tricálcico a partir do qual produce ácidos orgânicos e acúmulo de polifosfato sob condições de baixo pH, o qual explica a formação do halo de solubilização do fosfato ao redor de todas as linhagens analisadas no presente estudo (**Tabela 04**), as quais foram previamente agrupadas dentro das espécies do Bcc com exceção da cepa *B. gladioli* LMG2216 na caracterização genotípica (**Figura 02**). Tendo em conta que a maior parte do fósforo presente nos solos está de forma insolúvel, é importante ressaltar a relevância dos MSF para o desenvolvimento de tecnologias de fertilizantes fosfatados na agricultura (Song et al., 2008).

O gênero *Burkholderia* também tem sido associado com a promoção de crescimento das plantas através da síntese de sideróforos, os quais permitem extrair ferro do solo e adicionalmente limitam o crescimento de microorganismos patogênicos (Siddiqui 2005). A produção de sideróforos nas quinze cepas avaliadas revelaram a formação de um halo amarelo em torno de todas as colônias bacterianas no meio CAS (**Tabela 04**), esse meio de cultivo detecta a mudança de cor do complexo CAS-ferro de azul para laranja ou amarelo após a quelatação do ferro ligado por sideróforos (Shin et al., 2001). No trabalho feito por Venturi e colaboradores (2004) ressaltaram o potencial do Bcc como agentes de biocontrole, pois com a produção de sideróforos as bactérias podem colonizar eficientemente a rizosfera de raízes de várias culturas importantes e antagonizar o crescimento de patógenos de plantas microbianas. Além da extraordinária versatilidade e adaptabilidade nutricional que apresentam as bactérias do Bcc pelo seus genomas bastante grandes, tornando-os potencialmente úteis para fins de biorremediação (Coenye e Vandamme, 2003).

Clinicamente o complexo Bcc é conhecido por ser responsável pela infecção pulmonar crônica (FC) e por causar infecções nosocomiais em indivíduos imunocomprometidos. No entanto na infecção pulmonar FC observam-se alterações fenotípicas nos próprios organismos causantes desta. Os mesmos tendem a seguir um ciclo bacteriano, sendo encontrado *S. aureus* no início do ciclo de vida do paciente, seguido de *P. aeruginosa* na infância e adolescência, tendo aumentado o número de patógenos identificados nas últimas duas décadas (Harrison 2007). No livro Performance Standards for Antimicrobial do Clinical and Laboratory Standards Institute, indica o uso de um grupo específico de antibióticos para os pacientes com FC. Por esta razão, neste trabalho foram avaliados os antibióticos usados em pacientes infectados com linhagens de *Burkholderia* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, além de avaliar antibióticos de amplo espectro que são de interesse clínico.

Tendo em conta esta análise, não foi encontrada uma correlação entre os agrupamentos dos clados e a resistência antimicrobiana. No entanto, foi observado um destaque da linhagem 93Rz sobre as outras quatorze linhagens que apresentaram sensibilidade em mais de 50% dos antibióticos avaliados. Este isolado que agrupado com a espécie *B. stabilis* FERMP-210 no grupo MG5, apresentou 46% de resistência frente a todos os antibióticos (**Tabela 05**). *B. stabilis* tem sido relatado como membro do complexo Bcc, o qual apresenta resistência intrínseca de alto nível a vários antibióticos, incluindo Ticarcilina como foi observado neste trabalho. Além disso, Cefalosporinas, Aminoglicosídeos e Fosfomicina (Bonacorsi et al., 1999). Também a linhagem 47Rz, a qual foi agrupada no grupo MG4 na mesma ramificação com diferentes espécies de *B. cenocepacia* com um bom suporte (valor de Bootstrap 91). *B. cenocepacia* é uma espécie previamente identificada dentro do complexo Bcc, com a capacidade de invadir e sobreviver dentro das células epiteliais e formar biofilmes. Estes os protegem tanto das defesas do hospedeiro quanto dos antibióticos. No complexo Bcc também foi identificada a capacidade de segregar fatores como catalase, proteases e sideróforos que ajudam a evadir as defesas do hospedeiro e a sobreviver em ambientes hostis (Vinion-Dubiel, 2004). Isso pode explicar o resultado da resistência intermédia da linhagem 47Rz frente aos antibióticos MIN, PIP, TIC, CAR, e DOX.

Outras linhagens como TC3.3.3F1, TH3.3.2F5, CV3.2.2F5, TC3.4.2R2, TC3.4.1R1, TC3.4.1F2, CMAA 1233 e TC3.4.2R3 apresentaram resistência para os antibióticos de classe

Beta-lactâmicos PIP, CAR e TIC (**Tabela 05**), indicando que possivelmente apresentam algum tipo de mecanismo de resistência ainda não muito bem descrito ou não conhecido. Talvez porque não estão classificadas como potenciais patógenos para os mamíferos. Por esta razão se torna necessário e desafiador iniciar o estudo e identificação de possíveis genes. Além das condições que aportam mecanismos de resistência às espécies que atualmente não são relacionadas com patogenicidade. A fim de ter confiança no uso destas linhagens com aplicação biotecnológica.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foram identificadas quinze isolados do gênero *Burkholderia* obtidos de diferentes hospedeiros e ambientes, com diversidade genética e fisiológica, permitindo concluir que:

- Os isolados de *Burkholderia* spp. analisados neste trabalho apresentam um amplo espectro inibitório de fungos e bactérias patogênicas, incluindo a capacidade de controle de necrose da orquídea Aloha Iwanag, e a virulência contra *G. mellonella*.
- A análise de resistência a antibióticos apresentou sensibilidade na maioria das cepas analisadas, com exceção do isolados 93Rz.
- Foi confirmada a atividade enzimática avaliada nos quinze isolados em relação a sua capacidade de solubilizar fosfato, produzir sideróforos e endoglicanasenas.
- Os quinze isolados estudados no presente trabalho não apresentaram correlação entre a resistência a antimicrobianos clinicamente utilizados e sua capacidade de atividade antimicrobiana, porém se foi identificada correlação entre a agrupação filogenética (MLSA) e a produção de antimicrobianos.
- Os isolados TC3.4.2R3 , 28Rz e 67SI são os isolados que apresentam maior potencial biotecnológico, projetando um amplo espectro inibitório de fungos e bactérias patogênicas, além de apresentar controle de necrose da orquídea Aloha Iwanag, baixa virulência contra *G. mellonella* e sensibilidade na maioria dos antibióticos testados.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Testar modelos evolutivos tendo em conta os resultados obtidos da resistência a antibióticos e a agrupamento filogenético (MLSA), para avaliar a possível presença de ilhas genômicas no material genético das cepas de *Burkholderia* spp. que apresentaram resistência aos diferentes antibióticos avaliados.
- Estudar os tipos de biomoléculas com atividade antimicrobiana das cepas de *Burkholderia* spp. que inibiram os diferentes fungos e bactérias patogênicas avaliadas no presente trabalho, utilizando técnicas como MALDI-MSI.

REFERÊNCIAS*

Agnoli K, Schwager S, Uehlinger S, Vergunst A, Viteri F, Nguyen T, Sokol A, Carlier A, e Eberl L. Exposing the third chromosome of *Burkholderia cepacia* complex strains as a virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* 2012; 83:362-378.

Angus AA, Agapakis CM, Fong S, Yerrapragada S, Estrada-de los Santos P, Yang P, Song N, Kano S, Caballero-Mellado J, de Faria SM, Dakora FD, Weinstock G, Hirsch AM. Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. *PLoS One.* 2014; 9(1):e83779.

Aperis G, Burgwynfuchs B, Anderson C, Warner J, Calderwood S, Mylonakis E. "*Galleria mellonella* as a model host to study infection by the Francisella tularensis live vaccine strain". *Microbes and Infection.* 2007; 9 (6): 729–34.

Araújo F D da S, Araújo W L, & Eberlin M N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 as Biocontrol Agent Against *Fusarium oxysporum* Evaluated by Mass Spectrometry Imaging. *Journal of The American Society for Mass Spect.* 2017; 28(5), 901–907.

Araújo FD, Vieira RL, Molano EP, Máximo HJ, Dalio RJ, Vendramini PH, Eberlin MN. Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging reveals chemical defense of *Burkholderia seminalis* against cacao pathogens. *RSC Advances.* 2017; 7(48), 29953–29958.

Araújo W, Creason A, Mano E, Camargo-Neves A, Minami S, Chang J, e Loper J. Genome Sequencing and Transposon Mutagenesis of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 Identify Genes Contributing to Suppression of Orchid Necrosis Caused by *B. gladioli*. *Mol Plant Microbe.* 2016; *Interact.* 0:1–12.

Araújo W, Marcon J, Maccheroni W, Elsas J, Vuurde J e Azevedo J, Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(10): 4906–4914.

Azevedo JL, Maccheroni JR, e Araújo WL. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. *Controle biológico.* Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo. 2000; V3, 57-87.

Baldwin A, Mahenthalingam E, Drevinek P, Vandamme P, Govan J, Waine D, LiPuma J, Chiarini L, Dalmastrri C, Henry D, Speert D, Honeybourne D, Maiden M, and Dowson C.

Environmental *Burkholderia cepacia* Complex Isolates from Human Infections. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(3): 458–461.

Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden M, Govan JR, Speert D P, Lipuma J J, Vandamme P, and Dowson C G. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4665-4673.

Baldwin A, Sokol PA, Parkhill J, Mahenthiralingam E. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun.* 2004; 72(3):1537-47.

Barnoy S, Gancz H, Zhu Y, Honnold CL, Zurawski DV, Venkatesan MM. The *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for evaluation. *Gut Microbes.* 2017; (4):335-350.

Burkholder W. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology.* 1950; v. 40, p. 115-118.

Bonacorsi S, Fitoussi F, Lhopital S, e Bingen E. Comparative in vitro activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin, and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampin, or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:213–217.

Brämer C, Silva L, Gomez J, Vandamme P. e Steinbüchel A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51, 1709–1713.

Burkhead KD, Schisler DA, Slininger PJ. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 2031–2039.

Caballero J, Martinez L, Paredes G, Estrada P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂- fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54:1165–1172.

Cain C, Henry T, Waldo R, Casida L, e Falkinham J. Identification and Characteristics of a Novel *Burkholderia* Strain with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(9): 4139–4141.

Campos M. Orquídeas: Pragas e doenças. 2. ed. Rio de Janeiro. 2002; Expressão, 128 p.

Church A, Sivasothy P, Parmer J, Foweraker J. Mediastinal abscess after lung transplantation secondary to *Burkholderia gladioli* infection. *Journal Heart Lung Transplantation*. 2009; v. 28, n.5, p. 511-514.

Coenye T, Laevens S, Gillis M, Vandamme P. Genotypic and chemotaxonomic evidence for the reclassification of *Pseudomonas woodsii* as *Burkholderia andropogonis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51: 183–185.

Coenye T e Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol*. 2003; 5:719-729.

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka E A. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Plant Microbiol*. 2005;4.1685-1693.

Copping G e Menn J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag Sci*. 2000; 56:651–676.

Coxt C D, Rinehart K L, Moore M L, Cook J C. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1981; 78, 4256–4260.

Dalmastri C., Baldwin, A Tabacchioni, S Bevivino, A Mahenthalingam, E Chiarini, and Dowson C. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol*. 2007; 9, 1632–1639.

Depoorter E, Bull M J, Peeters C, Coenye T, Vandamme P, Mahenthalingam E. *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016; 100(12):5215-5229.

Deng P, Wang X, Baird SM, Showmaker KC, Smith L, Peterson DG, Lu S. Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. *Microbiologyopen*. 2016; 5(3):353-69.

Duerkop B, Varga J, Chandler J, Peterson S, Herman J, Churchill M, Parsek M, Nierman W, Greenberg E. Quorum-Sensing Control of Antibiotic Synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *J. Bacteriol*. 2009; vol. 191no. 12 3909-3918.

Duff J e Daly A. Orchid diseases in the northern territory. *Agnote*. 2002; v. 13, p 1-5.

Dursu A, Zenciroglu A, Karagol B, Hakan N, Okumus N, Gol N, e Tanir G. *Burkholderia gladioli* sepsis in newborns. *European Journal of Pediatrics*. 2012; v. 171, n. 10, p. 1503-1509.

Eberl L e Vandamme P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000 Research*, 5(F1000 Faculty Rev). 2016; 1007.10.12688.

El-Banna N, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *J Appl Microbiol*. 1998; 85:69–78.

Fiori M, Ligios V, Schiaffino A. Identification and characterization of Burkholderia isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011; v. 50, p. 450-461.

Furuya N, Yama K, Ueda Y, Nobuaki M, Reaction of tobacco and Rice leaf tissue infiltrated with Burkholderia glumae or B. gladioli. *Journal of Faculty of Agriculture*; 1997.

Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots (PDF Download Available). [accessed Mar 15 2018]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/225629106_Genetic_diversity_and_plant-growth_related_features_of_Burkholderia_spp_from_sugarcane_roots#pf8.

Gevers D, Cohan FM., Lawrence, JG., Spratt, BG., Coenye, T., Feil EJ., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson FL, Swings J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3, 733–739.

Gillis M, Van TV, Bardin R, M Goor, P Hebbar, A Willems, P Segers, K Kersters, T Heulin, MP Fernandez. Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to an emended description of the genus and proposition of Burkholderia vietnamiensis sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45: 274.

Glaeser SP, e Kämpfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015; 38(4), 237–245.

Glass M B, Gee J E, Steigerwalt A G, Cavuoti D, Barton T, Hardy R D, Godoy D, Spratt B G, Clark T A, Wilkins P P. Pneumonia and septicemia caused by Burkholderia thailandensis in the United States. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:4601–4604.

Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*. 2007; 315:808–810.

Gonçalves D e Motta O, Desenvolvimento de anticorpos contra o fungo Candida albicans e sua susceptibilidade a metabólitos secundários de Burkholderia sp. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 2007.

Gonçalves P e Araújo W. Caracterização do cluster wcb de B. seminalis TC3.4.2R3 e do seu papel na síntese de antimicrobianos. *Ciências Biológicas. Appl Microbiol*; 2014.

Gonçalves P, Hume C D, Ferreira A J, Tsui S, Brocchi M, Wren B W, e Araujo W L. Environmental interactions are regulated by temperature in Burkholderia seminalis TC3.4.2R3. *Scientific Reports*. 2019; 9(1).

González E, Briceño S, Calderón Y. Actividad antifúngica de Burkholderia cepacia aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. *Soc Venezolana de Microbiol.* 2009; 29:103-109.

Gonzalez F, Venturi V, Engledow A. The phytopathogenic Burkholderia. *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*. p. 2007; 153-176.

Gordon J e McLeod W. The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. *J Path and Bacteriol.* 1928; 31:185-190.

Goris J de Vos P, Caballero J, Park JH, Falsen E, Quensen JF, Tiedje JM, Vandamme P. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54:1677–1681.

Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, Greening AP and Webb AK. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet*. 1993; 342, 15–19.

Govan JR, Brown AR, and Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol* 2. 2007; 153–164.

Harding C, Schroeder G, Collins, J, Frankel G. Use of *Galleria mellonella* as a Model Organism to Study *Legionella pneumophila* Infection. *Journal of Visualized Experiments* (81): e50964.

Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading, England)*. 2007; 153 (Pt 4):917–23.

Haubler S, Nimtz M, Domke T, Wray V, Steinmetz I. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*. 1998; 66, 1588–1593.

Hazem S, Elshafie, Ippolito Camele, Rocco Racioppi, Laura Scrano, Nicola S Iacobellis, and Sabino A Bufo. In Vitro Antifungal Activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against Some Phytopathogenic Fungi. 2012; 13(12), 16291-16302.

Heungens K, Parke J L. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AM- MDR1 on two oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66:5192–5200.

Horsley A, Jones A e Lord R. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. Copyright The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd; 2016.

Hwang J, Chilton W, Benson D. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Biol Control*. 2002; 25:56–63.

Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, and Levison H. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr*. 1984; 104, 206–210.

Jank MS. Uma matriz de combustíveis para o Brasil. In: Sousa, E.L.L., Macedo, I.C., editors. *Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no future da matriz energética*. São Paulo. 2010; 315 p.

Jia Hong Ren, Jian Ren Ye, Hui Liu, Xu Ling Xu, Xiao Qin Wu. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011; 27:2203–2215.

Jukes H and Cantor C. Evolution of protein molecules. In MUNRO, H. N. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press. 1969; 21:132.

Kim S e Dale B. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Department of Chemical Engineering & Materials Science. Biomass and Bioenergy. 2004; 26: 361 – 375A.

King O, Ward K e Raney D. Media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J Lab and Clin Med. 1954; 44: 301-307.

Kirk O, Borchert TV and Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol. 2002; 13(4):345-351.

Lee CJ, Lee JT, Kwor JH, Kim BC, and Park W. Occurrence of bacterial soft rot of onion plants caused by *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* in Korea. Austral. Plant Pathol. 2005; 34:287-292.

Lessie TG, William Hendrickson, Brendan D Manning, Richard Devereux. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. FEMS Microbiology Letters. 1996; 144: 117-128;

Li B, Ibrahim M, Ge M, Cui Z, Sun G, Xu F, e Kube M. Transcriptome analysis of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* cultivated in vivo and co-culture with *Burkholderia seminalis*. Sci Rep. 2014; 4: 5698.

Lipuma, JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 23. 2010; 299–323.

Lipuma JJ, Dasen SE, Nielson DW, Stern RC, and Stull TL. Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. Lancet. 1990; 336, 1094–1096.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) [homepage na internet]. Nomenclatura dos procaríotas e as alterações nomenclaturais citadas nas Listas Aprovadas de Nomes Bacterianos ou validamente publicadas no International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB). [acesso em 17 fevereiro 2019]. Disponível em: <http://www.bacterio.net/burkholderia.html>.

Lu E, Henn A. First report of ear soft rot of corn (*Zea mays*) caused by *Burkholderia gladioli* in the United States. Plant Diseases. 2007; v. 91, n. 11, p. 1514.

Lu S, Novak J, Austin W, Gu G, Ellis D, Kirk M, Stanford W, Tonelli M, e Smith L. Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of *Burkholderia contaminans*. Bioch. 2009; 48:8312-8321.

Luvizotto M, Marcon J, Andreote D, Dini-Andreote F, Neves A, Araújo W, Pizzirani-Kleiner A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. World J Microbiol Biotechnol. 2010; 26:1829–1836.

Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson C. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Opportunistic pathogens with important natural biology. in Journal of Applied Microbiology; 2008.

Malavolta J e Almeida I. Doenças bacterianas. Boletim Técnico Instituto Biológico. 2. ed. São Paulo: Instituto Biológico. 2012; 86 p.

Mano E. Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de *Pectobacterium carotovora*. Ciências Biomédicas. USP. 99; 2011.

Mano E, Minami S, Loper J, Araújo W. First Description of Necrosis in Leaves and Pseudobulbs of *Oncidium* Orchids Caused by *Burkholderia gladioli* in São Paulo State, Brazil. The American Phytopathological Society. 2015; Volume 99, Number 11. Page 1642.

Marcon J. Efeito de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre comunidades bacterianas. (Doutor em Biotecnologia) - Instituto de Ciência Biológicas, Universidade de São Paulo; 2007.

McCulloch L. A bacterial disease of gladiolus. Science. 1921; 54:115-116.

Mendes R, Pizzirani-Kleiner, Araujo W, e Raaijmakers J. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. Appl Environ Microbiol. 2007; 7259–7267.

Minami SN. Diversidade e controle biológico de *Pectobacterium carotovora* em orquídeas utilizando bactérias endofíticas. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo; 2006.

Mitidieri L. Control Biológico de Hongos del Suelo con *Trichoderma*. IDIA. 1988; 44:45-49.

Moebius N, Ross C, Scherlach K, Rohm B, Roth M, Hertweck C. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*. Chem Biol. 2012; 19:1164–1174.

Monteiro LA e Sentelhas PC. Potential and Actual Sugarcane Yields in Southern Brazil as a Function of Climate Conditions and Crop Management. Sugar Tech. 2014; 16(3):264–276.

Moree WJ, Phelan V, Wu CH, Bandeira N, Cornett DS, Duggan BM, Dorrestein PC. Inter-kingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. Proc. Nat. Acad. Sci. 2012; 109, 13811–13816.

Mullan A, Quinn JP, McGrath J W. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. Microb. Ecol, 2002; 44, 69-77.

Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastrri C, Tabacchioni S e Chiarini L. Perturbation of Maize Rhizosphere Microflora Following Seed Bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI7. FEMS Microbiology Ecology. 1997; 23: 183-193.

Nandakumar R, Shahjahan M, Yuan L, Dickstein R, Groth E, Clark A, Cartwright D, RUSH C. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. Plant Diseases. 2009; v. 93, p. 896-905.

Padilha G da S, Santana J C C, Alegre R M, & Tambourgi E B. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012; 55(1), 7–19.

Panhwar A, Naher A, Radziah O, Shamshuddin J, e Razi M. Eliminating aluminum toxicity in an acid sulfate soil for rice cultivation using plant growth promoting bacteria. 2015; Mol. 20: 3628-3646.

Parke L, e Gurian-Sherman D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annu Rev Phytopathol. 2001.;39:225-258.

Parret A, Schoofs G, Proost R, De Mot R. Plant lectin-like bacteriocin from rhizosphere-colonizing Pseudomonas isolate. J Bacteriol. 2003; 185:897–908.

Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH and Mahenthiralingam E. Development of a recA gene-based identification approach for the entire Burkholderia genus. Appl Environ Microbiol. 2005; 71, 3917–3927.

Peeters C, Zlosnik A, Spilker T, Hird J, Lipuma J e Vandamme P. Burkholderia pseudomultivorans sp. nov., a novel Burkholderia cepacia complex species from human respiratory samples and the rhizosphere. Syst and Appl Microbiol. 2013; 36: 483-489.

Pereira M, Rossi C, Queiroz M, Martins G, Isaac C, Bosse J, Yanwen Li, Wren B, Terra V, Cuccui J, Langford P e Bazzolli D. Galleria mellonella is an effective model to study Actinobacillus pleuropneumoniae infection. Microbiol. ; 2015; 161: 387–400.

Perin L, Martínez L, Paredes G, Baldani J I, Estrada P, Reis V M, Caballero J. Burkholderia silvatlantica sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56:1931–1937.

Pessi G, Braunwalder R, Grunau A, Omasits U, Ahrens C, Eberl L. Response of Burkholderia cenocepacia H111 to Micro-Oxia. Journal.pone. 2013; 0072939.

Power R F, Linnane B, Martin R, Power N, Harnett P, Casserly B, O’Connell N H, Dunne C P. The first reported case of Burkholderia contaminans in patients with cystic fibrosis in Ireland: from the Sargasso Sea to Irish Children. BMC Pulmonary Medicine. 2016; 16(1).

Price E , Sarovich DS, Webb JR, Hall CM, Jaramillo SA, Sahl JW, et al. Phylogeographic, genomic, and meropenem susceptibility analysis of Burkholderia ubonensis. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2017; 11(9), e0005928.

Ramette A, Lipuma, J J. and Tiedje J M. Species abundance and diversity of Burkholderia cepacia complex in the environment. Appl Environ Microbiol. 2005; 71, 1193–1201.

Reis V, Estrada P, Tenorio S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, et al. Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogenfixing, plant-associated bacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 2004; 54: 2155–2162.

Rhodes K e Schweizer H. Antibiotic Resistance in Burkholderia Species. Drug Resist Updat. 2016; 28: 82–90.

Rossetto PB. Interações entre cana-de-açúcar e bactérias associadas. 148 f. Tese [Doutorado em Agronomia] - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba; 2008.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) [homepage na internet]. Nomenclatura dos procariotas e as alterações nomenclaturais citadas nas Listas Aprovadas de Nomes Bacterianos ou validamente publicadas no International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB). [acesso em 17 fevereiro 2019]. Disponível em: <http://www.bacterio.net/burkholderia.html>.

Lonhienne C, Lonhienne T, Yeoh Y, Donose B, Webb R, Parsons J, Liao W. Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting Burkholderia species. Scientific Reports volume 6, 2016; number: 37389.

Santos P, Bustillos-Cristales R, e Caballero-Mellado J. Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. Appl. Environ. Microbiol. vol. 67. 2001; P. 6 2790-2798.

Sawana A, Adeolu M, e Gupta R. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. Front Genet. ; 2014; 5:429.

Schellenberg B, Bigler L, Dudler R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. Environ Microbiol. 2007; 9:1640–1650.

Schmidt S, Blom F, Pernthaler J, Berg G, Baldwin A, Mahenthalingam E, e Eberl L. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the Burkholderia cepacia complex. Environ Microbiol. ; 2009; 11:1422-1437.

Schwager S, Agnoli K, Köthe M, Feldmann F, Givskov M, Carlier A, e Eber L. Identification of Burkholderia cenocepacia Strain H111 Virulence Factors Using Nonmammalian Infection Hosts. Infect Immun. 2013; 81(1): 143–153.

Schwyn B and Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem. 1987; 160:47-56.

Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka E A, Salles J F, Van Elsas J D, Faure D, Reiter B, Glick B R, Wang-Pruski G, Nowak J. Burkholderia phytofirmans sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55(Pt 3):1187-92.

Scuderi G, Bonaccorsi A, Panebianco S, Vitale A, Polizzi G and Cirvilleri G. Some strains of Burkholderia gladioli are potential candidates for postharvest biocontrol of fungal rots in citrus and apple fruits. J of Plant Path. 2009; 91 (1), 207-213.

Shehata HR, Lyons EM, Jordan KS. Bacterial endophytes from wild and ancient maize are able to suppress the fungal pathogen Sclerotinia homoeocarpa. J Appl Microbiol. 2016; 120(3): 756–69.

Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW, and Rhee JH. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. J of Microbiol Methods. 2001; 44(1), 89–95.

Siddiqui ZA. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui ZA (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, The Netherlands. 2005; P 111–142.

Simpson I, Finlay J, Winstanley D, Dewhurst N, Nelson J, Butler S e Govan J. Multi-resistance isolates possessing characteristics of both *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* and *Burkholderia gladioli* from patients with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1994; 34, 353-361.

Seed K e Dennis J. Development of *Galleria mellonella* as an Alternative Infection Model for the *Burkholderia cepacia* Complex. *Infect. Immun.* vol. 76. 2008; P. 3 1267-1275.

Sokol PA, Darling P, Woods DE, Mahenthalingam E, and Kooi C. Role of ornibactin biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia*: characterization of *pvdA*, the gene encoding L-ornithine N(5)-oxygenase. *Infect Immun.* 1999; 67(9):4443-55;.

Song Ok-Ryul, Seung-Jin Lee, Yong-Seok Lee, Sang-Cheol Lee, Keun-Ki Kim, and Yong-Lark Choi. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz. J. Microbiol.* vol.39. ; 2008; P.1.

Speert D. Understanding *Burkholderia cepacia*: Epidemiology, Genomovars, and Virulence. MD, University of British Columbia, Vancouver. *Infect Med.* 2001;18(1).

Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson C, Mahenthalingam E, e LiPuma J. Expanded Multilocus Sequence Typing for *Burkholderia* Species. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2607-2610.

Suárez R, Caballero J, Coutinho G, Mendonca L, James K, e Venturi V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb Ecol.* 2012; 63: 249-266.

Sawana A, Adeolu M, e Gupta RS. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front Genet.* 2014;5: 429.

Tablan OC, Chorba TL, Schidlow DV, White JW, Hardy KA, Gilligan PH, et al. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *J Pediatr.* 1985;107, 382–387.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M e Kumar S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731-2739.

Teather R M, Wood P J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microb.* 1982; 43:777-780.

Uehlinger S, Schwager S, Bernier SP, Riedel K, Nguyen DT, Sokol PA, Eberl L. Identification of specific and universal virulence factors in *Burkholderia cenocepacia* strains by using multiple infection hosts. *Infect Immun.* 2009; 77(9):4102-10.

Ura H, Furuya N, Iiyama K, Hidaka M, Tsuchiya K, and Matsuyama N. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *J. Gen. Plant Pathol.* 2006; 72: 98-103.

Urwin R e Maiden M C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 2003;11(10):479-87.

Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, et al. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47: 1188-1200. 182.

Vandamme P, B Holmes, T Coenye, J Goris, E Mahenthiralingam, J LiPuma, J Govan. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Res Microbiol.* 2003; 154: 91– 96. 185.

Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 2011; 34: 87-95.

Vandamme P, D Henry, T Coenye, S Nzula, M Vancanneyt, J LiPuma, D Speert, J Govan, E Mahenthiralingam. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 33: 143–149. 184.

Vandamme P, E Mahenthiralingam, B Holmes, T Coenye, B Hoste, P DeVos, D Henry, D Speert. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1042–1047. 183.

Vandamme P, Peeters C. Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014; 106, 57–65.

Vanlaere E, Lipuma J, Baldwin A, Henry D, De Brandt E, Mahenthiralingam E, Speert D, Dowson C, e Vandamme P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. e *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58:1580-1590.

Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology.* 2001; 91: 127–141.

Vermis K, Vandekerckhove C, Nelis J, Vandamme R. Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA as a tool for genomovar characterization within the *Burkholderia cepacia* Complex. *Fed Eur Microbiol Soc. Microbiol.* 2006; 214: 1-5.

Vial L, Chapalain A, Groleau C, e Déziel E. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: A tribute to adaptation. *Environ Microbiol.* ; 2011; 13:1-12.

Vinion-Dubiel AD, Spilker T, Dean CR, Monteil H, LiPuma JJ, Goldberg JB. Correlation of *wbiI* genotype, serotype, and isolate source within species of the *Burkholderia cepacia* complex. *J of Clin Microbiol.* 2004; 42 (9):4121–6.

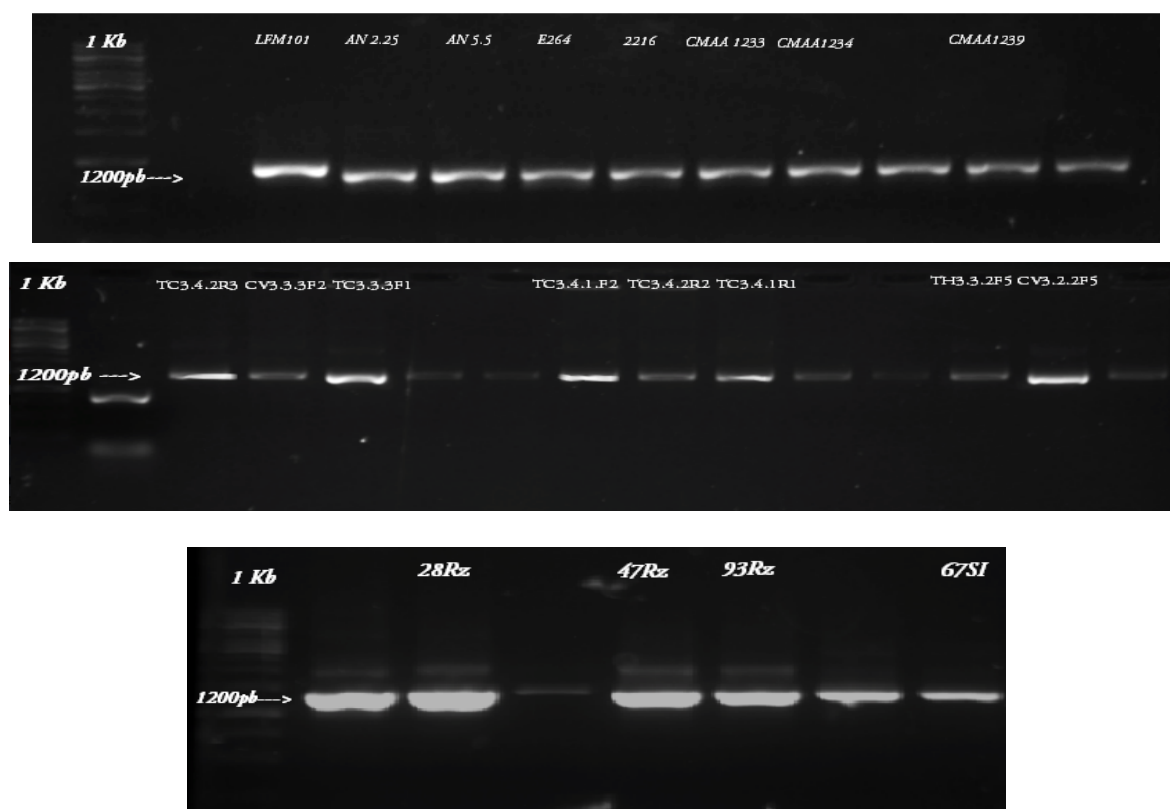
Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiology and Immunology. 1992; 36, 1251–1275.

Young S, Hameed A, Peng Y, Shan H, e Wu P. Endophytic establishment of the soil isolate Burkholderia sp. CC-AI74 enhances growth and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). Appl Soil Ecol. 2013; 66:40-47.

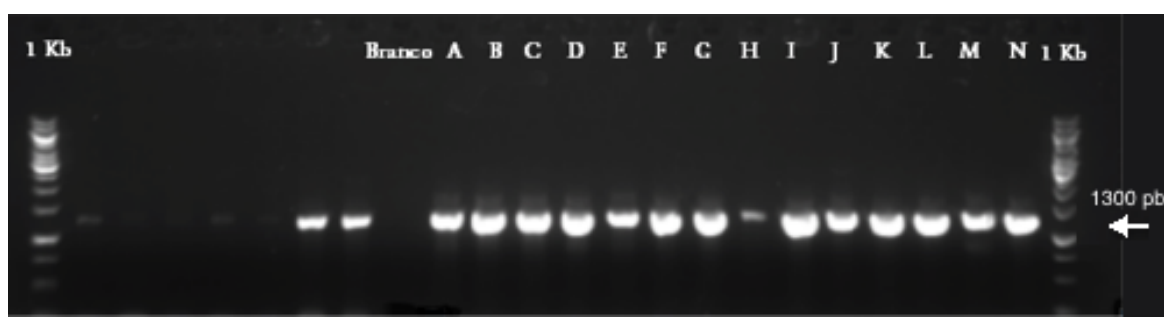
Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, e Kurane R. Burkholderia kururiensis sp. nov., a trichloroethylene (TCE) degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50: 743–749.

APÊNDICE

Apêndice A. Foto de eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR do gene 16S rRNA (1200 pb) previamente purificados.



Apêndice B. Foto de eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR do gene atpD (1300 pb) previamente purificados sendo A (TC3.4.2R), B(28Rz), C(47Rz), D(67SI), E(93Rz), F(AN 2.25), G(AN 5.5), H(CV3.3.3F2) I(TC3.3.3F1), J(TH3.3.2F5), K(CV3.2.2F5), L(TC3.4.2R2), M(TC3.4.1R1), N(TC3.4.1F2).



Apêndice C. Foto de eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR do gene *gltB* (1700 pb) previamente purificados A (TC3.4.2R), B(28Rz), C(47Rz), D(67SI), E(93Rz), F(AN 2.25), G(AN 5.5), H(CV3.3.3F2) I(TC3.3.3F1), J(TH3.3.2F5), K(CV3.2.2F5), L(TC3.4.2R2), M(TC3.4.1R1), N(TC3.4.1F2), O(CMAA 1233), P(CMAA1234), Q(CMAA1239), R(2216), S(E264), T(LFM101).

Apêndice D. Foto de eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR do gene *gyrB* (1200 pb) previamente



purificados A (TC3.4.2R), B(28Rz), C(47Rz), D(67SI), E(93Rz), F(AN 2.25), G(AN 5.5), H(CV3.3.3F2) I(TC3.3.3F1), J(TH3.3.2F5), K(CV3.2.2F5), L(TC3.4.2R2), M(TC3.4.1R1), N(TC3.4.1F2), O(CMAA 1233), P(CMAA1234), Q(CMAA1239), R(2216), S(E264), T(LFM101).

Apêndice E. Lista das seqüências dos genes conservados utilizados no análise MLSA de diferentes cepas tipo, essa seqüências foram utilizadas para o alinhamento junto com as seqüências amplificadas dos quinze isolados analisados no presente trabalho.

Espécie	Linhagem	Código GenBank		
		<i>gltB</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>
<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Burkholderia contaminans</i> CH-1	AP018358.1 382237..386940 locus_tag="BCCH1_32500"	AP018358.1 132106..133500 locus_tag="BCCH1_30120"	AP018358.1 3045..5519 locus_tag="BCCH1_29000"
	<i>Burkholderia contaminans</i> MS14	CP009744.1 927502..932205 locus_tag="NL30_19820"	CP009744.1 767130..768524 locus_tag="NL30_18985"	CP009744.1 2985935..2988409 locus_tag="NL30_29075"
<i>Burkholderia lata</i>	<i>Burkholderia lata</i> 383	CP000151.1 362941..367644 locus_tag="Bcep18194_A3499"	CP000151.1 121161..122555 locus_tag="Bcep18194_A3288"	CP000151.1 3121..5595 locus_tag="Bcep18194_A3184"
	<i>Burkholderia lata</i> A05	CP024943.1 (754727..756346) locus_tag="CVS37_03825"	CP024943.1 140199..141593 locus_tag="CVS37_00700"	CP024943.1 1173634..1176237 locus_tag="CVS37_05875"

	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	AM747720.1 317651..322474 locus_tag="BCAL0289"	AM747720.1 38673..40067 locus_tag="BCAL0036"	AM747720.1 463355..465829 locus_tag="BCAL0421"
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i> CR318	CP017238.1 837424..839043) locus_tag="BHQ31_03840"	CP017238.1 240302..241696 locus_tag="BHQ31_01070"	CP017238.1 106739..109213 locus_tag="BHQ31_00505"
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	CP000458.1 448372..453075 locus_tag="Bcen2424_0402"	CP000458.1 108126..109520 locus_tag="Bcen2424_0106"	CP000458.1 3224..5698 locus_tag="Bcen2424_0003"
	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	CP000378.1 2973412..2978391 / locus_tag="Bcen_2705"	CP000378.1 3257498..3258892 locus_tag="Bcen_2949"	CP000378.1 2805403..2807877 / locus_tag="Bcen_2555"
<i>Burkholderia seminalis</i>	<i>Burkholderia seminalis</i> FL-5-4-10-S1-D7	CP013398.1 687893..689512 locus_tag="WJ12_03110"	CP013398.1 126732..128126 locus_tag="WJ12_00560"	CP013398.1 3004..5478 locus_tag="WJ12_00015"
<i>Burkholderia metallica</i>	<i>Burkholderia metallica</i> FL-6-5-30-SI-D7	CP013401.1 679180..680799 locus_tag="WJ16_03100"	CP013401.1 119955..121349 locus_tag="WJ16_00525"	CP013401.1 3041..5515 locus_tag="WJ16_00015"
<i>Burkholderia diffusa</i>	<i>Burkholderia diffusa</i> RF2-non-BP9	CP013362.1 652790..654409 locus_tag="WI26_02990"	CP013362.1 123503..124897 locus_tag="WI26_00555"	CP013362.1 3002..5476 locus_tag="WI26_00015"
<i>Burkholderia territorii</i>	<i>Burkholderia territorii</i> RF8-non-BP5	CP013366.1 664220..665839 locus_tag="WS51_13810"	CP013366.1 132877..134271 locus_tag="WS51_11355"	CP013366.1 3002..5476 locus_tag="WS51_10825"
<i>Burkholderia ambifaria</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	CP001025.1 692933..694552 locus_tag="BamMC406_0616"	CP001025.1 117590..118984 locus_tag="BamMC406_0106"	CP001025.1 3361..5835 locus_tag="BamMC406_0003"
	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	CP009798.1 1316257..1317723 locus_tag="CH72_1237"	CP009798.1 1576331..1577710 locus_tag="CH72_1473"	CP009798.1 2595576..2597558 locus_tag="CH72_2402"
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> DSM 10685	CP011503.1 1665847..1667313 locus_tag="ABD05_07675"	CP011503.1 1423993..1425387 locus_tag="ABD05_06555"	CP011503.1 1276547..1279021 locus_tag="ABD05_05930"
<i>Burkholderia stabilis</i>	<i>Burkholderia stabilis</i> FERMP-21014	AP018111.1 2556269..2560972 locus_tag="BSFP_023350"	AP018111.1 2312241..2313635 locus_tag="BSFP_021060"	AP018111.1 2202810..2205284 locus_tag="BSFP_020050"

<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> MSMB608 WGS	CP013453.1 351190..352656 locus_tag="WL96_01625"	CP013453.1 109058..110452 locus_tag="WL96_00505"	CP013453.1 3002..5476 locus_tag="WL96_00015"
<i>Burkholderia stagnalis</i>	<i>Burkholderia stagnalis</i> MSMB735 WGS	CP013459.1 458560..460026 locus_tag="WT74_02000"	CP013459.1 173527..174921 locus_tag="WT74_00670"	CP013459.1 3000..5474 locus_tag="WT74_00015"
<i>Burkholderia ubonensis</i>	<i>Burkholderia ubonensis</i> MSMB147 1WGS	CP009488.1 1453010..1454476 locus_tag="BW23_1346"	CP009488.1 1726392..1727771 locus_tag="BW23_1604"	CP009488.1 2688137..2690119 locus_tag="BW23_2504"
<i>Burkholderia dolosa</i>	<i>Burkholderia dolosa</i> AU0158	CP013463.1 420134..421600 locus_tag="WM29_01960"	CP013463.1 121220..122614 locus_tag="WM29_00625"	CP013463.1 2988..5462 locus_tag="WM29_00090"
<i>Burkholderia multivorans</i>	<i>Burkholderia multivorans</i> MSMB164 0WGS	CP009795.1 2945087..2946553 locus_tag="AK34_2741"	CP009795.1 3207618..3208997 locus_tag="AK34_2981"	CP009795.1 3301521..3303995 locus_tag="AK34_3072"
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia mallei</i> turkey10	CP013467.1 335494..336960 locus_tag="WM33_12170"	CP013467.1 104739..106133 locus_tag="WM33_11105"	CP013467.1 2997..5471 locus_tag="WM33_10625"
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 14M09604 18	CP010348.1 508411..509877 locus_tag="NW99_02210"	CP010348.1 315326..316720 locus_tag="NW99_01360"	CP010348.1 3012..5480 locus_tag="NW99_00015"
<i>Burkholderia thailandensis</i>	<i>Burkholderia thailandensis</i> is E254	CP019042.1 3313559..3315025 locus_tag="BHT10_17145"	CP019042.1 3019314..3020708 locus_tag="BHT10_15585"	CP019042.1 2896892..2899360 locus_tag="BHT10_14925"
<i>Burkholderia thailandensis</i>	<i>Burkholderia thailandensis</i> MSMB59	CP004381.1 786020..787486 locus_tag="BTN_717"	CP004381.1 1079893..1081272 locus_tag="BTN_988"	CP004381.1 1238763..1241231 locus_tag="BTN_1126"
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i> LMG 2216	CP004385.1 793168..794634 locus_tag="BTHA_732"	CP004385.1 414546..415925 locus_tag="BTHA_379"	CP004385.1 2769696..2772089 locus_tag="BTHA_2504"
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i> KACC 11889	<i>Burkholderia gladioli</i> HQ398470.1 1..902 locus HQ398470	<i>Burkholderia gladioli</i> HQ398422.1 1..1004 locus HQ398422	<i>Burkholderia gladioli</i> HQ849196.1 1..590 locus HQ849196
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia gladioli</i> KACC 11889	CP022005.1 383706..385172 locus_tag="CEJ98_01805"	CP022005.1 96485..97879 locus_tag="CEJ98_00465"	CP022005.1 3210..5687 locus_tag="CEJ98_00020"

	<i>Burkholderia gladioli</i> ATCC 10248	CP009323.1 1893236..1894702 locus_tag="BM43_1751 "	CP009323.1 1606018..1607397 locus_tag="BM43_148 6"	CP009323.1 1512724..1515201 locus_tag="BM43_140 2"
<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	CP001503.2 329646..334346 locus_tag="bglu_1g031 30"	CP001503.2 77503..78897 locus_tag="bglu_1g007 70"	CP001503.2 3234..5711 locus_tag="bglu_1g000 30"
<i>Paraburkholderia xenovorans</i>	<i>Paraburkholderia xenovorans</i> LB400	CP000270.1 4469260..4473963 locus_tag="Bxe_A0365 "	CP000270.1 4805371..4806765 locus_tag="Bxe_A0040 "	CP000270.1 3266..5737 locus_tag="Bxe_A4460 "
<i>Paraburkholderia fungorum</i>	<i>Paraburkholderia fungorum</i> ATCC BAA-463	CP010026.1 2058120..2059589 locus_tag="OI25_1817"	CP010026.1 1769337..1770731 locus_tag="OI25_1547"	CP010026.1 4126132..412760 locus_tag="OI25_3665"
<i>Paraburkholderia caribensis</i>	<i>Paraburkholderia caribensis</i> MWAP64	CP013102.1 835936..837402 locus_tag="AN416_037 55"	CP013102.1 543022..544416 locus_tag="AN416_02 410"	CP013102.1 456881..459352 locus_tag="AN416_020 15"
<i>Paraburkholderia hospita</i>	<i>Paraburkholderia hospita</i> DSM 17164	CP026105.1 3652502..3653968 locus_tag="C2L64_165 95"	CP026105.1 3939329..3940723 locus_tag="C2L64_179 15"	CP026105.1 921138..923765 locus_tag="C2L64_041 05"
<i>Paraburkholderia terrae</i>	<i>Paraburkholderia terrae</i> DSM 17804	CP026111.1 3251601..3253067 locus_tag="C2L65_144 30"	CP026111.1 3539160..3540554 locus_tag="C2L65_157 40"	CP026111.1 870469..873096 locus_tag="C2L65_039 15"

Fonte: Propia autoria.