

Análise filogenômica e prospecção de moléculas de uma nova espécie de *Burkholderia* isolada do Rio Juruá

Queiroz, Claudia Afras de¹; Sousa, Thiago Fernandes²; Silva, Annie de Souza e¹; Silva, *Gilvan Ferreira da³

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido; ²Universidade Federal do Amazonas; ³Embrapa Amazônia Ocidental, Universidade Federal do Amazonas.

E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Com o aumento do uso indiscriminado de agrotóxicos e a crescente incidência de doenças em plantas, a busca por novas moléculas com atividade antifúngica e antibacteriana tem sido uma prioridade na pesquisa agrícola. Além das aplicações agrícolas voltadas ao controle de doenças, os microrganismos também podem ser aplicados na promoção do crescimento vegetal. Neste trabalho, 2 isolados bacterianos (CPAA-010 e CPAA-011) foram identificados por filogenômica e ANI como sendo pertencentes a uma nova espécie do gênero *Burkholderia*. A análise de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) revelou o potencial para a produção dos sideróforos (pyochelin, ornibactin e cromobactin), bem como para produção do antifúngico occidiofungin. A anotação de genes dessas novas espécies mostrou genes relacionados à produção de fitormônio e ao metabolismo do fósforo e a análise de proteínas ortólogas entre as espécies mais relacionadas apresentou 25 proteínas únicas no isolado CPAA-010 e 19 proteínas únicas em CPAA-011 que podem estar relacionados a adaptações ambientais. Esses resultados em conjunto indicam o potencial dessa nova espécie para promoção de crescimento vegetal e biocontrole de fitopatógenos, bem como a importância de prospectar novos recursos genéticos amazônicos.

Palavras-Chave: occidiofungina; ornibactin; pyochelin

Introdução

O gênero de bactérias *Burkholderia* é classificado como uma β -proteobactéria e é amplamente distribuído em diversos ambientes terrestres, aquáticos e simbióticos (Francis et al. 2013). Apesar de algumas linhagens de *Burkholderia* serem conhecidas por causar doenças em seres humanos, plantas e animais, avanços recentes em tecnologias de mineração genômica têm revelado diversos metabólitos bioativos nesse grupo de bactérias que podem auxiliar no combate a fitopatógenos (Liu et al. 2014).

Espécies de *Burkholderia* também são excelentes promotoras de crescimento vegetal sendo usada em tomate, cana-de-açúcar, trigo e outras plantas de interesse econômico (Zhao et al. 2014; Paungfoo-Lonhienne et al 2016). Essa característica se deve a produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de ácido indolacético (IAA), ACC desaminase e produção de enzimas extracelulares (Liu et al. 2014; Deng et al. 2017).

Embora o gênero *Burkholderia* tenha sido amplamente investigado, muitos de seus clusters gênicos biossintéticos (BGCs) ainda permanecem pouco conhecidos. Estudos recentes têm realizado esforços para conectar os metabólitos secundários com suas respectivas vias de biossíntese, isso facilita a busca por produtos naturais de interesse via sequenciamento de genomas completos. Metabólitos como pyrrolnitrin, occidiofugin, cepacin e gladiolin são antimicrobianos potentes no qual suas vias já foram identificadas.

Neste trabalho foi realizado o sequenciamento do genoma completo e mineração genômica de dois isolados de *Burkholderia* isoladas da lâmina d'água do rio Juruá-Am para identificação filogenômica e prospecção de metabólitos bioativos.

O objetivo deste trabalho foi realizar o sequenciamento do genoma completo e mineração genômica de dois isolados de *Burkholderia* para identificação filogenômica e prospecção de metabólitos bioativos.

Material e Métodos

Microrganismos

As linhagens *Burkholderia* sp. CPAA-010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011 usadas neste estudo fazem parte da coleção de cultura do GENAGRO - Laboratório de Genômica e Microbiologia Aplicada da Amazônia Legal da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na rodovia AM 010, km 29, estrada Manaus-Itacoatiara- Amazonas.

Análise filogenômica

A análise filogenética foi realizada por escala genômica, comparadas com todos os genomas das espécies tipo disponíveis no banco de dados Type (Strain) Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>), uma plataforma de alto rendimento para taxonomia baseada em genoma por meio do algoritmo MASH,

todas as espécies tipos se baseia na Lista de nomes procarióticos com posição na nomenclatura (LPSN) disponível em <https://lpsn.dsmz.de> (Meier-Kolthoff et al. 2022). A similaridade entre espécies foi determinada usando vários índices de medidas, para a delimitação de similaridade com base na identidade média de nucleotídeos (ANI) e identidade média de aminoácidos (AAI), onde os cálculos dos valores médios de identidade nucleotídica (ANI) foram determinados através software OrthoANI (Yoon et al. 2017). E valores de hibridização DNA-DNA digital (dDDH), calculada com o Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC 2.1) (Sandoval-Powers et al. 2021).

Anotação do genoma

A anotação de genomas foi realizada por meio da plataforma RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<https://rast.nmpdr.org/>). Para a análise comparativa de proteínas ortólogas os genomas dos isolados *Burkholderia* sp. CPAA- 010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011 bem como os genomas das espécies mais correlacionadas *Burkholderia contaminans* e *Burkholderia lata* disponíveis banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). As proteínas preditas foram plotadas na plataforma Orthovenn2 (Xu et al. 2019).

Análise de clusters gênicos biossintéticos e sintenia

Os mesmos genomas usados para análise de proteínas ortólogas foram usados para predição de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) usando a plataforma AntiSMASH (Blin et al. 2019). Os BGCs que apresentaram similaridade com BGCs já caracterizados e disponíveis no banco MIBiG (Minimum Information About a Biosynthetic Gene cluster) (Terlouw et al. 2022) foram comparados por sintenia usando o pipeline clinker & clustermap.js (Gilchrist et al. 2021).

Resultados e Discussão

Identificação dos isolados de *Burkholderia* sp. CPAA-010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011

Utilizando o genoma completo das linhagens *Burkholderia* sp. CPAA-010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011, foi realizada a análise filogenética com suporte de

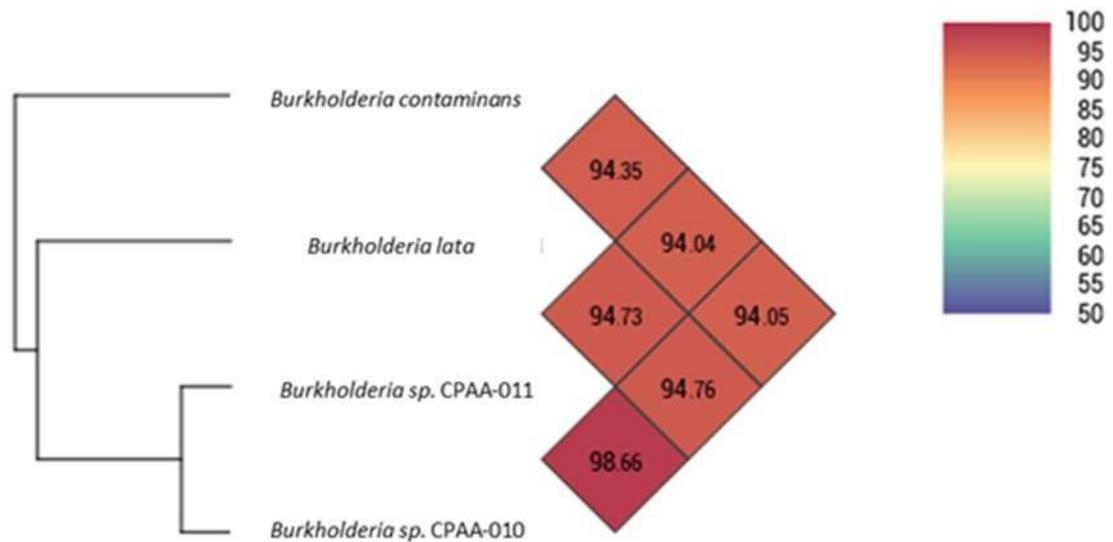


Figura 2 - Heatmap da identidade média de nucleotídeos por ortologia (OrthoANI) entre os Isolados *Burkholderia sp. CPAA-010*, *Burkholderia sp. CPAA-011*, e as linhagens das espécies tipo relacionadas *Burkholderia lata* e *Burkholderia contaminans*.

Anotação do genoma

A partir da análise dos genomas completos das bactérias *Burkholderia sp. CPAA-010* e *Burkholderia sp. CPAA-011*, foi observado que apenas 23% e 24%, respectivamente, das 8.271 e 8.272 proteínas preditas foram classificadas em subsistemas. Dos grupos de proteínas classificadas, os dois maiores em ambas as bactérias foram relacionados a aminoácidos e derivados, correspondendo a 660 proteínas para *Burkholderia sp. CPAA-010* e 655 proteínas para *Burkholderia sp. CPAA-011*, seguido de proteínas relacionadas à síntese de carboidratos, com 454 e 444 proteínas, respectivamente (Figura 3 A, B).

As proteínas classificadas em subsistemas estão distribuídas em 25 grupos, incluindo o metabolismo de fósforo, enxofre e nitrogênio, além de proteínas relacionadas à síntese do ácido indolacético (IAA) e metabolismo de ferro. Dentre as 44 proteínas relacionadas ao metabolismo de fosfato, 21 estão envolvidas no metabolismo de fosfonatos, que são amplamente utilizados na agricultura.

Esses resultados evidenciam a diversidade metabólica de microrganismo e sua capacidade de se adaptar a diferentes ambientes ecológicos. Além disso, a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo de fosfonatos sugere que essas bactérias podem ter potencial na promoção do crescimento das plantas em solos com baixa disponibilidade de fósforo (Pradhan et al. 2017). A identificação dessas proteínas e suas funções é fundamental para o

desenvolvimento de novas estratégias agrícolas que possam aprimorar a produtividade e sustentabilidade agrícola.

Já a análise de proteínas ortólogas das *Burkholderia* sp.CPAA-010 e *Burkholderia* sp.CPAA-011 com outras duas espécies mais relacionadas revelou um maior número de proteínas compartilhadas com *Burkholderia lata* e um total de 25 proteínas exclusivas da *Burkholderia* sp.CPAA-010 e 19 em *Burkholderia* sp.CPAA-011 (Figura 4). Esses resultados indicam proteínas específicas que podem estar relacionadas com a adaptação ambiental.

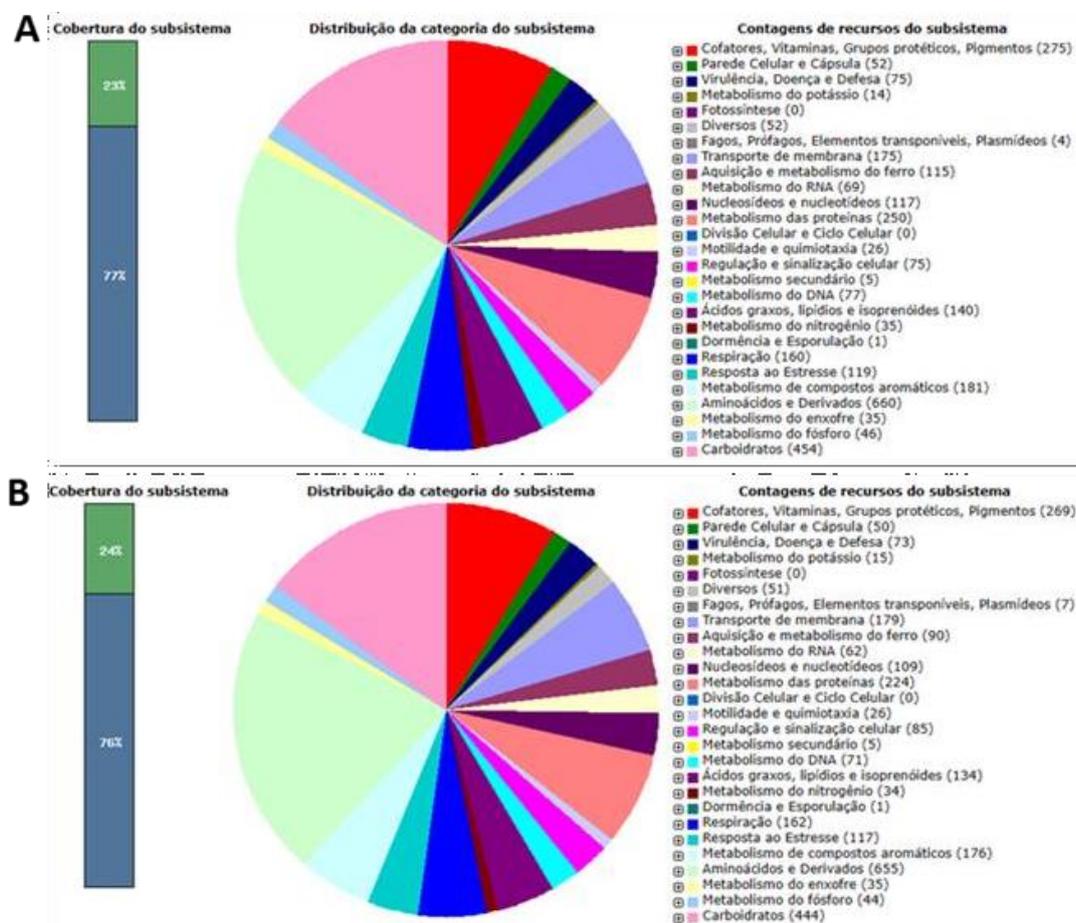


Figura 3 - Anotação e classificação em subsistemas de proteínas preditas nas linhagens de *Burkholderia* sp. **A-** *Burkholderia* sp. CPAA-010, **B-** *Burkholderia* sp. CPAA-011

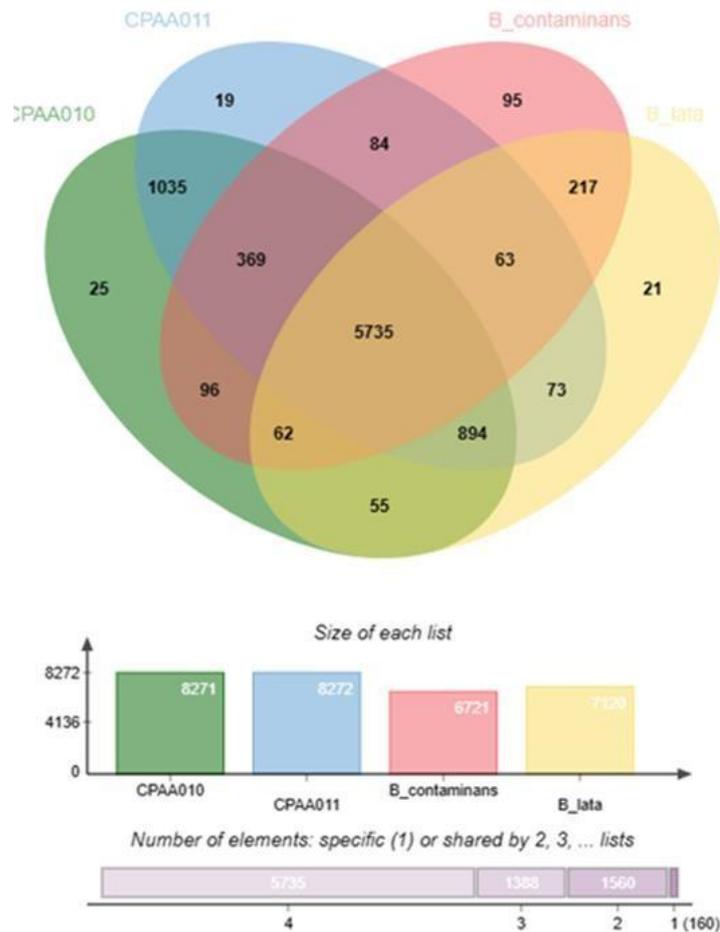


Figura. 4 - Diagrama de Venn de proteínas ortólogas das linhagens *Burkholderia* sp. CPAA-010, *Burkholderia* sp. CPAA-011, *B. contaminans* e *B. lata*

Análise de clusters gênicos biossintéticos e sintonia

No genoma da *Burkholderia* sp. CPAA-010 foram identificados um total de 17 BGCs para produção de metabolitos secundários, distribuídos em (5) terpenos, (2) PKS tipo I, (1) híbrido PKS tipo I, NRP-like, NRPS, terpeno, (5) NRPS, (1) fosfonate, (1) hserlactone, (1) RiPP-like e (1) arylpolyene. Já no genoma da *Burkholderia* sp. CPAA-011 identificamos 18 cluster gênicos biossintéticos (BGCs), sendo (3) PKS tipo I, (5) terpenos, (5) NRPS, (1) RiPP-like, (1) híbrido PKS tipo I, NRP-like, NRPS, terpeno, (1) fosfonate, (1) hserlactone, (1) arylpolyene (Figura 5).

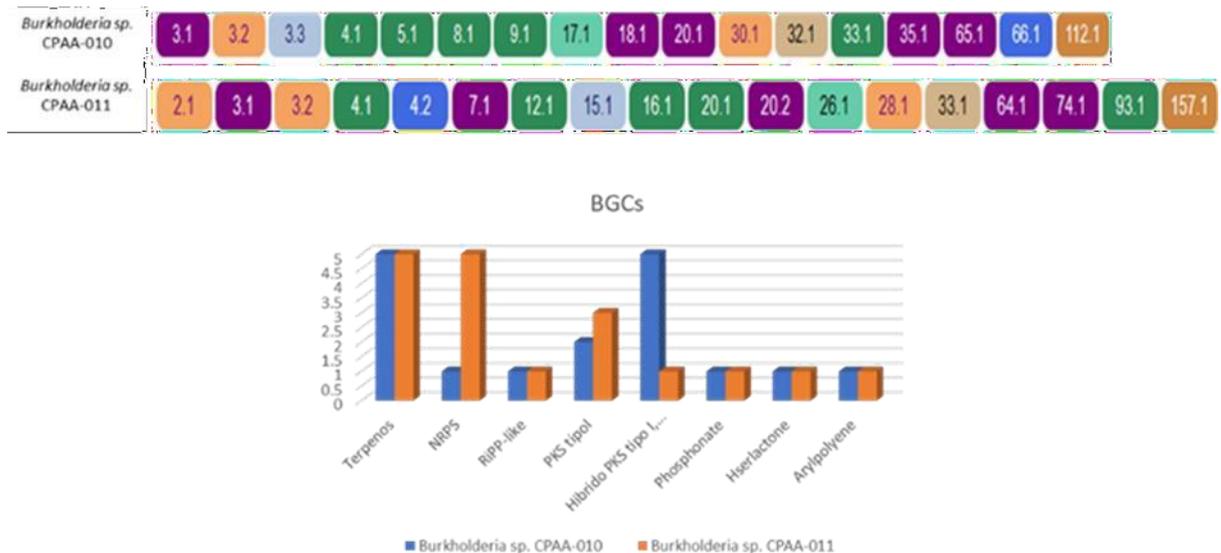


Figura. 5 - Análise de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) nos genomas de *Burkholderia* sp. CPAA- 010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011.

Foi observado que nas duas linhagens de *Burkholderia* sp. CPAA-010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011, há alguns BGCs em comum. Um desses BGCs é responsável pela produção de occidiofungina, que é um peptídeo híbrido de policetídeos e não ribossomicamente sintetizado (Figura 6A). A occidiofungina, uma molécula composta por oito aminoácidos e possui uma importante ação antifúngica (Emrick 2019; Jia et al. 2022).

Estudos recentes de Hansanant e colaboradores (2022) com a occidiofungina produzida pela *Burkholderia contaminans* MS14, em testes *in vitro* e *in vivo* mostraram o potencial antifúngico dessa molécula contra diversas espécies de fungos. Além disso, eles descreveram um novo mecanismo de ação da occidiofungina, demonstrando a capacidade dessa molécula de contornar os atuais mecanismos de resistência a antifúngicos apresentados pelas espécies de fungos.

Além do BGC responsável pela produção de occidiofungina, as duas linhagens, *Burkholderia* sp. CPAA-010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011, apresentam outros clusters de genes (BGCs) em comum. Entre esses clusters estão três relacionados à produção de sideróforos pyochelin, ornibactin e cromobactin, que são compostos orgânicos de baixo peso molecular capazes de sequestrar íons de ferro do meio ambiente e torná-los disponíveis para as bactérias (Figura 6 B, C e D).

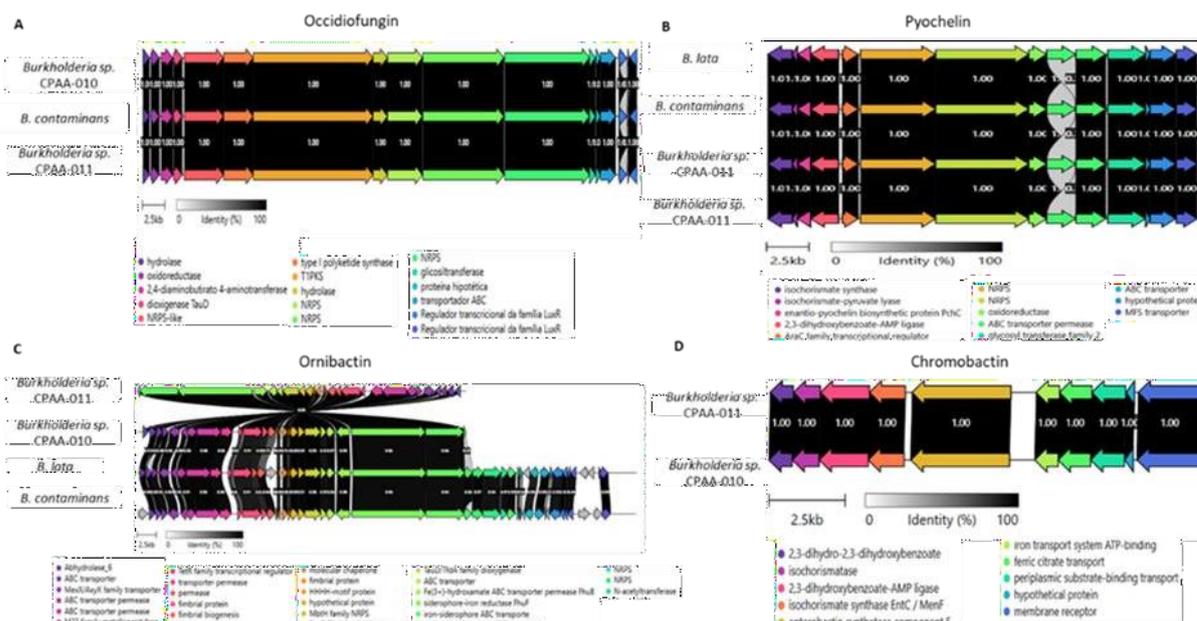


Figura. 6 - Comparação entre o cluster em comum *Burkholderia* sp. CPAA-010 e *Burkholderia* sp. CPAA-011 ; **A** - Sintenia entre BGC responsável pela produção de occidiofungin, cluster 15.1 *Burkholderia* sp. CPAA-011, cluster 3.3 *Burkholderia* sp. CPAA-010 e o cluster 2.2 da *B. contaminans*; **B** - Sintenia do BGC responsável pela produção de pyochelin, cluster 8.1 *Burkholderia* sp. CPAA-010, cluster 16.1 da *Burkholderia* sp. CPAA-011, cluster 3.1 *B. lata* e o cluster 4.5 em *B. contaminans* ; **C** - Sintenia entre os BGC responsável pela produção de ornibactin nas bactérias *Burkholderia* sp. CPAA- 010 cluster 4.1, *Burkholderia* sp. CPAA-011 cluster 12.1, *B. lata* cluster 1.2 e *B. contaminans* cluster 3.2. **D** - Sintenia entre os BGC responsável pela produção de chromobactin, cluster 33.1 *Burkholderia* sp. CPAA-010 e 20.1 *Burkholderia* sp. CPAA-011.

O pyochelin é um dos sideróforos que tem a capacidade de se ligar a outros metais além do ferro, como zinco, cobre, cobalto, molibdênio e níquel. Dessa forma, além de sequestrar ferro, pyochelin desempenha um papel importante na captação de outros íons metálicos biologicamente relevantes. Apesar de sua seletividade pelo ferro ser mais fraca em comparação com outros sideróforos, ele ainda é capaz de se ligar e transportar vários íons metálicos. (Ronnebaum e Lamb 2018; Ghssein et al. 2022). A ornibactina é um sideróforo produzido por diversas espécies de bactérias, possui propriedades antimicrobianas (Lee et al. 2016). Estudos de Deng e colaboradores (2017) sugerem uma função alternativa da ornibactina, demonstrando que além de sua bem conhecida capacidade de sequestrar íons de ferro, a molécula também exibe uma ação bactericida, desempenhando um papel importante na defesa das bactérias produtoras contra outras bactérias no ambiente. Já o cromobactin, é um sideróforo produzido por diversas espécies de bactérias do gênero *Chromobacterium*, incluindo *Chromobacterium violaceum* (Batista et al. 2019).

Esses resultados indicam o potencial dos isolados obtidos no presente estudo para produção de metabólitos secundários que podem ser aplicados na agricultura para promoção de crescimento e biocontrole.

Conclusões

As linhagens de *Burkholderia* sp. (CPAA-010 e CPAA-011) apresentam diversos clusters de genes biossintéticos (BGCs) responsáveis pela produção de compostos bioativos cujas as moléculas podem ser aplicadas em diferentes áreas, como na medicina e na agricultura. Entre os BGCs identificados, destaca-se o responsável pela produção de occidiofungina, que possui uma importante ação antifúngica, além de BGCs para síntese de sideróforos, como pyochelin, ornibactin e cromobactin, que podem ser utilizados como agentes antimicrobianos e promotores de crescimento de plantas.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento: FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Este trabalho contou com o suporte financeiro da FAPEAM Editais: (PROSPAM 08/2021, CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS 010/2021, PRODUTIVIDADE-CT&I-013/2022, Biodiversa N° 007/2021), CAPES editais (Procad AmazonMicro, Amazônia Legal e pela concessão de bolsa de estudo ao primeiro autor).

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pelo suporte financeiro e concessão de Bolsas de estudo obtido via edital Amazônia Legal e edital Procad AmazonMicro, código financeiro 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam) pelo suporte financeiro obtido a partir do programa Biodiversa (Edital N° 007/2021). Os autores também agradece ao suporte financeiro do CNPq.

Referências

Batista, B.B.; Santos, R.E.R.D.S.; Ricci-Azevedo, R.,; da Silva Neto, J.F. 2019. Production and uptake of distinct endogenous catecholate-type siderophores are required for iron acquisition and virulence in *Chromobacterium violaceum*. *Infection and Immunity* 87(12): e00577-19.

Bernabeu, P.R.; Pistorio, M.; Torres-Tejerizo, G.; Estrada-De los Santos, P.; Galar, M.L.; Boiardi, J.L.; Luna, M.F. 2015. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae* 191: 113-120.

Blin, K.; Kim, H.U.; Medema, M.H.; Weber, T. 2019. Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Briefings in Bioinformatics* 20(4): 1103-1113.

Deng, P.; Foxfire, A.; Xu, J.; Baird, S.M.; Jia, J.; Delgado, K.H.; Lu, S.E. 2017. The siderophore product ornibactin is required for the bactericidal activity of *Burkholderia contaminans* MS14. *Applied and Environmental Microbiology* 83(8): e00051-17.

Emrick, D. 2019. Characterization of the fungicidal activity and biochemical impact of occidiofungin, a novel antifungal compound derived from *Burkholderia contaminans*. Dissertação de Mestrado. Faculty of Mississippi State University, Estados Unidos da América, 122 p. (<https://scholarsjunction.msstate.edu/td/1031/>).

Francis, F.; Kim, J.; Ramaraj, T.; Farmer, A.; Rush, M.C.; Ham, J.H. 2013. Comparative genomic analysis of two *Burkholderia glumae* strains from different geographic origins reveals a high degree of plasticity in genome structure associated with genomic islands. *Molecular genetics and genomics* 288: 195-203.

Ghssein, G.; Ezzeddine, Z. 2022. A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology* 11(12): 1711.

Gilchrist, C.L.; Chooi, Y.H. 2021. Clinker & clustermap. js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics* 37(16): 2473-2475.

Hansanant, N.; Smith, L. 2022. Occidiofungin: Actin Binding as a Novel Mechanism of Action in an Antifungal Agent. *Antibiotics* 11(9): 1143.

Jia, J.; Ford, E.; Hobbs, S.M.; Baird, S.M.; Lu, S.E. 2022. Occidiofungin is the key metabolite for antifungal activity of the endophytic bacterium *Burkholderia* sp. MS455 against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*® 112(3): 481-491.

Lee, I.; Kim, Y.O.; Park, S.C.; Chun, J. 2016. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(2): 1100-1103.

Lefort, V.; Desper, R.; Gascuel, O.; Fast, M.E. 2015. A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular Biology and Evolution* 32: 2798-2800.

Liu, X.; Cheng, Y.Q. 2014. Genome-guided discovery of diverse natural products from *Burkholderia* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41(2): 275- 284.

Meier-Kolthoff, J.P.; Auch, A.F.; Klenk, H.P.; Göker, M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics* (14): 1-14.

Meier-Kolthoff, J.P.; Carbasse, J.S.; Peinado-Olarte, R.L.; Göker, M. 2022. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research* 50(D1): D801-D807.

Paungfoo-Lonhienne, C, Lonhienne, TG., Yeoh, YK, Donose, BC, Webb, RI, Parsons, J, & Ragan, MA 2016. Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting *Burkholderia* species. *Scientific Reports*, 6(1), 37389.

Pradhan, A.; Pahari, A.; Mohapatra, S.; Mishra, B.B. 2017. Phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: genetic mechanism and application. In: Adhya, T.; Mishra, B.; Annapurna, K.; Verma, D.; Kumar, U. (eds). *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects*. v.4. Springer, Singapura. p.81-97.

Ronnebaum, T.A.; Lamb, A.L. 2018. Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. *Current Opinion in Structural Biology* 53: 1-11.

Sandoval-Powers, M.; Králová, S.; Nguyen, G.S.; Fawwal, D.V.; Degnes, K.; Lewin, A.S.; et al. 2021. *Streptomyces poriferorum* sp. nov., a novel marine sponge-derived Actinobacteria species expressing anti-MRSA activity. *Systematic and Applied Microbiology* 44(5): 126244.

Terlouw, B.R.; Blin, K.; Navarro-Muñoz, J.C.; Avalon, N.E.; Chevrette, M.G.; Egbert, S.; Medema, M.H. 2022. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research* 6(51): D603-610.

Xu, L.; Dong, Z.; Fang, L.; Luo, Y.; Wei, Z.; Guo, H.; et al. 2019. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Research* 47(W1): W52-W58.

Yoon, S.H.; Ha, S.M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16s rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology* 67(5): 1613-1617.

Zhao, K.; Penttinen, P.; Zhang, X.; Ao, X.; Liu, M.; Yu, X.; Chen, Q. 2014. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological Research* 169(1): 76- 82.