



ECB

PROGRAMA
DE PÓS GRADUAÇÃO
EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

MERCÚRIO ALTERA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE COMUNIDADES DE
RIZOBACTÉRIAS E SELECIONA LINHAGENS EFICIENTES NA
BIORREMEDIAÇÃO

CAYLLA ROANNE PEREIRA MARIANO

CUIABÁ – MT
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
DA BIODIVERSIDADE

MERCÚRIO ALTERA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE COMUNIDADES DE
RIZOBACTÉRIAS E SELECIONA LINHAGENS EFICIENTES NA
BIORREMEDIAÇÃO

CAYLLA ROANNE PEREIRA MARIANO

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
do Instituto de Biociências, para obtenção do título de
Mestre em Ecologia e Conservação da
Biodiversidade.

**CUIABÁ – MT
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P436m Pereira Mariano, Caylla Roanne.
Mercúrio altera estrutura e função de comunidades de rizobactérias e seleciona linhagens eficientes na biorremediação / Caylla Roanne Pereira Mariano. -- 2018
i, 1 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Marcos Antonio Soares.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Cuiabá, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Bioacumulação. 2. Metal Tóxico. 3. Rizoremediação. 4. Ecologia Microbiana. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

ORIENTADOR:
Dr. MARCOS ANTONIO SOARES

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Hilton Marcelo de Lima Souza
Universidade do Estado de Mato Grosso
Examinador Interno



Prof. Dr. Eduardo Beraldo de Moraes
Universidade Federal de Mato Grosso
Examinador Interno



Prof. Dr. Euziclei Gonzaga de Almeida
Universidade Federal de Mato Grosso
Examinador Interno

Profa. Dra. Viviane Cristina Padilha Lopes
Universidade Federal de Mato Grosso
Examinador Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu Deus porque dele, e por ele, e para ele, são todas as coisas;

Aos meus pais Lucimar e Carlos e minha irmã Camylla, a quem devo todas as minhas conquistas e para eles faço todas as coisas, sou muito grata por ter a melhor família me apoiando sempre. Vocês são os amores da minha vida;

A minha avó Antonia que em vida foi a minha maior apoiadora e inspiração;

À Universidade Federal de Mato Grosso;

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade;

Ao meu orientador Marcos Antônio Soares que me inspirou na trajetória acadêmica e incansavelmente sempre contribuiu na minha formação, desde a graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pós-graduação;

Às minhas amigas Bruna, Luana, Kátia e Nelma por terem sido meu apoio durante esses dois anos;

Aos queridos colegas de turma do mestrado, especialmente a Luiza, Gisele e Renata pela parceria nesses dois anos, especialmente durante o curso de campo;

Aos colegas do grupo do mercúrio, Ivani e William pela parceria e por compartilharem conhecimento;

E aos demais colegas de laboratório, toda minha gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Abundância Relativa de filos das comunidades	24
Fig. 2.	Perfis de diversidade	26
Fig. 3.	Diagrama de Venn	27
Fig. 4.	Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS)	29
Fig. 5.	Matriz de correlação entre as espécies baseadas no coeficiente de Spearman	31
Fig. 6.	Concentração mínima inibidora de mercúrio	33
Fig. S1.	Composição da comunidade de rizobactérias.	67
Fig. S2.	Dendrograma de Dissimilaridade (Bray Curtis).	68
Fig. S3.	Dendrograma de Dissimilaridade (Jaccard).	69
Fig. S4.	Mapa de calor dos isolados e características de resistência	70

LISTA DE TABELAS

Tab. 1.	Contagens de rizobactérias de <i>A. fluminensis</i> e <i>P. acuminatum</i> de locais com (+Hg) e sem (-Hg) isolados em meio com (+LB) e sem (-LB) mercúrio	23
Tab. 2.	Porcentagem de características funcionais de comunidades isoladas de locais contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg)	32
Tab. 3.	Porcentagem de resistência a antibióticos das comunidades isoladas de locais contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg)	34
Tab. 4.	Traços funcionais das linhagens utilizadas	36
Tab. 5.	Efeito da inoculação de rizobactérias em parâmetros de crescimento de <i>Zea mays</i>	38
Tab. 6.	Concentração de Hg ²⁺ no solo e bioacumulação nos tecidos de <i>Zea mays</i> inoculadas com linhagens de bactérias rizosféricas e toxicidade da biorremediação sob raízes <i>Lactuca sativa</i> e <i>Allium cepa</i>	41
Tab. S1.	Comunidade de bactérias rizosféricas isoladas de locais contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg) e traços funcionais	71
Tab. S2.	Multirresistência a antibióticos e metais	74

LISTA DE ABREVIACOES

AIA	Ácido indolacético
Cd	Cádmio
DNA	Deoxyribonucleic acid
Fe	Ferro
GPE	Growth Promoter Efficiency
Hg	Mercúrio
Hg ⁰	Mercúrio Elementar
Hg ²⁺	Íon Mercúrico
HgCl ₂	Cloreto de Mercúrio
LB	Lúria Bertani
MeHg	Metilmercúrio
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NaCl	Cloreto de Sódio
NMDS	Non-metric multidimensional scaling
Ni	Níquel
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pb	Chumbo
Zn	Zinco

A dissertação foi escrita em forma de artigo que será submetido a revista Plant and Soil. As normas estão anexadas no fim do artigo.

Hipótese:

O mercúrio influencia a estrutura e funcionalidade de bactérias cultiváveis da rizosfera de *Aeschynomene fluminensis* e *Polygonum acuminatum*, atuando como um agente de seleção de espécies resistentes ao metal com potencial para promover o crescimento de plantas na presença do mercúrio.

Objetivos:

- (I) Caracterizar, por métodos dependente de cultivo, a comunidade bacteriana da rizosfera de *Aeschynomene fluminensis* e *Polygonum acuminatum* em locais com e sem contaminação por Hg.
- (II) Caracterizar a comunidade resistente a mercúrio utilizando meio de cultivo com Hg.
- (III) Caracterizar traços para promoção do crescimento de plantas.
- (IV) Verificar a capacidade dos isolados na promoção do crescimento do milho (*Zea mays*) em substrato contaminado por mercúrio.
- (V) Verificar a capacidade de biorremediação dos isolados.

1 **Mercúrio altera estrutura e função de comunidades de rizobactérias e**
2 **seleciona linhagens eficientes na biorremediação**

3 Caylla Mariano¹, Ivani Mello¹, Breno Martins¹ William Pietro¹,
4 Gilvan Ferreira², Ailton Terezo³, Marcos Soares¹

5 ¹Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana, Instituto de Biociências,
6 Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

7 ²Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil.

8 ³Central Analítica de Combustíveis, Departamento de Química, Universidade Federal de
9 Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

10 drmasoares@gmail.com

11 **Resumo**

12 **Objetivos**

13 Este estudo determinou o efeito do mercúrio na estrutura e funcionalidade de comunidades
14 de rizobactérias e fitoextração assistida por rizobactérias.

15 **Métodos**

16 Métodos dependente de cultivo foram utilizados para isolar rizobactérias de *Aeschynomene*
17 *fluminensis* e *Polygonum acuminatum*. As linhagens foram identificadas pelo
18 sequenciamento do gene rDNA 16S, e traços funcionais envolvidos com promoção de
19 crescimento vegetal e resistência a metais e antibióticos foram determinados. A capacidade
20 de biorremediação das rizobactérias foi determinada em casa de vegetação.

21 **Resultados**

22 A riqueza e diversidade de espécies bacterianas da rizosfera de *A. fluminensis* e *P.*
23 *acuminatum* são maiores em solos contendo mercúrio. As bactérias isoladas em ambientes
24 contaminados apresentaram maiores valores de MIC, presença do gene *merA* e
25 multirresistência a metais pesados e antibióticos. A inoculação de linhagens de *Enterobacter*
26 *sp_C35* e *Microbacterium trichothecenolyticum_C34* aumentou significativamente ($p < 0.05$;
27 teste de Dunnetts) o crescimento de *Z. mays* em solo contaminado por Hg^{2+} resultando na
28 redução de até $87.86 \pm 1.42\%$ do mercúrio no solo e aumento da fitoextração do metal em
29 $43.06 \pm 7.08\%$ pelas raízes.

30 **Conclusão**

- 31 Mercúrio no solo altera a estrutura e funcionalidade de rizobactérias. *Enterobacter sp_C35*
32 e *Microbacterium trichothecenolyticum_C34*, isoladas de hospedeiros em ambientes
33 contaminados, são eficientes promoção da fitoextração do mercúrio.
- 34 Palavras-chave: ecologia microbiana, rizoremediação, metal tóxico, bioacumulação.

35 **Introdução**

36 O mercúrio-Hg é um metal tóxico de ocorrência natural no meio ambiente sob
37 diferentes espécies químicas, entre elas o mercúrio elementar (Hg^0), inorgânico (HgCl_2),
38 orgânico (MeHg^+ e EtHg^+), que se diferenciam pela solubilidade, reatividade e toxicidade
39 (Gai et al. 2016; Szymańska et al. 2016). Este metal tem potencial de causar graves danos
40 ao meio ambiente e saúde humana devido a sua mobilidade na atmosfera e toxicidade em
41 baixas concentrações (Dahshan et al. 2013).

42 Na década de 1990, o Brasil foi responsável pela emissão de até 120 toneladas de
43 mercúrio no meio ambiente, principalmente através de práticas de mineração de metais
44 preciosos (Veiga, 1997). Essa contaminação atingiu diversas regiões do país, especialmente
45 os biomas Amazônia e Pantanal (Pestana et al. 2016; Oestreicher et al. 2017). A biota
46 presente nesses ambientes contaminados possui acúmulo de mercúrio em espécies como o
47 jacaré (Correia et al. 2014), moluscos (Rizzini Ansari et al. 2016), peixes comerciais
48 (Rodríguez Martín-Doimeadios et al. 2014), incluindo grandes mamíferos como a onça
49 pintada (*Panthera onca*) (May Júnior et al. 2017).

50 Além da fauna e flora, o mercúrio afeta comunidades microbianas do solo,
51 influenciando ciclos biogeoquímicos e impactando diretamente a estrutura e diversidade de
52 comunidades bacterianas do solo (Mahbub et al. 2017). Não existe um padrão no qual
53 comunidades bacterianas são afetadas pela contaminação por mercúrio. Alguns trabalhos
54 indicam um aumento na diversidade de bactérias na rizosfera do arroz em locais com maiores
55 níveis de Hg (Liu et al. 2014). Efeito similar foi observado nas comunidade de fungos
56 endofíticos radiculares em plantas de área úmida (Pietro-Souza et al. 2017). No entanto,
57 outros trabalhos tem observado uma correlação entre a redução na diversidade bacteriana
58 em solos com maiores níveis de Hg (Mahbub et al. 2017).

59 Alterações na diversidade de comunidades bacterianas são preocupantes, a perda de
60 diversidade pode resultar na diminuição de funções importantes na ciclagem de nutrientes e

61 o aumento de diversidade pode selecionar um maior número de linhagens resistentes a metais
62 e antibióticos, tornando-se um problema de saúde pública (Degens et al. 2001; Zhao et al.
63 2012; Knapp et al. 2017).

64 O efeito do mercúrio sobre a estrutura de comunidade de bactérias da rizosfera é
65 pouco conhecido. A rizosfera é uma região definida como o solo sob a influência do
66 crescimento e atividade das raízes das plantas (Hartmann et al. 2008). Este ambiente é
67 considerado um dos mais diversos habitats microbianos em relação à riqueza e diversidade
68 de espécies de microrganismos (Pieterse et al. 2016).

69 A capacidade da biota ou parte dela em converter substâncias tóxicas em compostos
70 menos nocivos é a base da biorremediação (Liu et al. 2017). É uma tecnologia
71 ecologicamente aceitável, e mais eficaz do que técnicas físico-químicas de remediação
72 (Kushwaha et al. 2018). Neste contexto, as bactérias são candidatas promissoras por
73 apresentarem sistemas eficientes especializados de resistência aos metais (Osborn et al.
74 1997). Entre os mecanismos de resistência estão a bioacumulação, síntese e secreção de
75 sideróforos e esterases e a capacidade de redução do mercúrio por enzimas codificadas no
76 operon *mer* (Rajkumar et al. 2010; Das et al. 2016).

77 A caracterização de comunidades microbianas estabelecidas em ambientes
78 contaminados é um primeiro e importante passo na seleção de espécies promissoras para o
79 desenvolvimento de processos ou produtos biotecnológicos para a biorremediação (Thijs et
80 al. 2017). Portanto, este estudo teve como objetivos (I) isolar e identificar bactérias
81 rizosféricas de *A. fluminensis* e *P. acuminatum* em locais com e sem contaminação por Hg
82 (II) caracterizar traços de promoção do crescimento vegetal e resistência ao mercúrio e (III)
83 verificar a capacidade dos isolados na biorremediação para testar a hipótese de que o
84 mercúrio é um agente estruturador na diversidade funcional e estrutural de comunidades
85 bacterianas da rizosfera, sendo capaz de selecionar espécies resistentes ao metal com
86 potencial para promover o crescimento de plantas.

87 **Material e Métodos**

88 *Amostragem e isolamento de bactérias rizosféricas*

89 O material biológico foi coletado em locais situados no município de Poconé-Brasil.
90 A escolha das espécies (*A. fluminensis* e *P. acuminatum*) e dos locais de coleta foram
91 baseadas nos dados descritos por (Pietro-Souza et al. 2017).

92 Em cada local, cinco exemplares por espécie de plantas saudáveis foram coletados
93 com o sistema radicular intacto, totalizando 20 amostras das quatro comunidades analisadas:
94 -AHg (*A. fluminensis*/Local não contaminado), +AHg (*A. fluminensis*/Local com
95 contaminação), -PHg (*P. acuminatum*/ Local não contaminado) e +PHg (*P.*
96 *acuminatum*/Local com contaminação). As amostras foram armazenadas em sacos plásticos
97 estéreis e transportadas para o laboratório sob refrigeração e processadas no mesmo dia.

98 O solo aderido à raiz da planta – rizosférico – foi removido cuidadosamente com
99 auxílio de uma espátula estéril. Cinco gramas do solo foi ressuspendido em 45 mL de solução
100 salina (NaCl 0,8%), agitado (120 rpm) por 30 minutos e submetidos três vezes ao banho de
101 ultrassom. Em seguida, as amostras foram diluídas serialmente em solução salina (10^{-1} a 10^{-6})
102 e plaqueadas em placas contendo: (I) meio Luria Bertani sem mercúrio (-LB) e (II) meio
103 Lúria Bertani suplementado com $30 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Hg^{2+} como HgCl_2 (+LB). Paralelamente,
104 utilizamos a técnica de enriquecimento para selecionar espécies com maior resistência ao
105 mercúrio. Cinco gramas de solo rizosférico foram diluídos em 45 mL de caldo LB
106 suplementado com $30 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Hg^{2+} e mantidos sob agitação (120 rpm) durante 72 horas.
107 Após esse tempo, 5 mL da suspensão inicial foi novamente inoculada em 45 mL de meio
108 +LB. Depois de 72 horas, a cultura foi diluída serialmente e foi realizado o plaqueamento
109 (triplicata) em meio +LB sólido. As placas foram incubadas a 28°C e analisadas diariamente.
110 As colônias foram caracterizadas macroscopicamente e agrupadas por características

111 morfológicas. As linhagens foram purificadas e armazenada em glicerol 20% a -20° C. Os
112 valores foram expressos em UFC/g⁻¹ de solo seco.

113 *Caracterização genética e identificação molecular das linhagens isoladas*

114 O DNA foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit,
115 seguindo as recomendações do fabricante. A validação da morfotipagem foi determinada
116 com auxílio do marcador molecular ERIC-PCR. Os primers utilizados foram ERIC-1R (5'-
117 ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC-2 (5'-
118 AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') conforme descrito (Versalovic et al. 1991) . A
119 amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de
120 etídio e visualizado com luz UV. Através da visualização de perfil por banda, linhagens com
121 mesmo perfil foram consideradas como uma espécie.

122 Após a caracterização morfológica e genética por ERIC-PCR, uma linhagem de cada
123 grupo foi identificada com base na sequência do gene 16S rRNA. A amplificação do gene
124 16S foi realizada utilizando os primers 27S-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R
125 (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') (Miller et al. 2013). As reações de cadeias de polimerase
126 consistiram em um passo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30
127 ciclos de 40 segundos a 94°C, 35 segundos de anelamento a 55°C, 80 segundos de extensão
128 a 72°C e a extensão final a 72° durante 10 minutos. Os amplicons foram purificados
129 enzimaticamente (ExoSap-it, GE Healthcare) e sequenciados pelo método de Sanger
130 (BigDye Terminator Cycle Sequencing). As sequências foram editadas (BioEdit versão
131 7.2.5) e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank, através da
132 ferramenta nBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequencias que apresentaram 97%
133 de semelhanças foram identificadas a nível de espécie (Tindall et al. 2010). As sequencias
134 foram depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), sob os números de acesso:
135 (KX377865 a KX377932).

136 *Amplificação do gene merA*

137 O gene *merA* foi detectado por PCR utilizando os primers 3F (CGT SAA CGT SGG
138 STG CGT GCC STC CA) e 3R (CGA GCY TKA RSS CYT CGG MCA KSG TC) (Yu et
139 al. 2014). As condições de amplificação foram: 95 ° C durante 5 min, 35 ciclos de 94 ° C
140 durante 1 min, 68 ° C durante 60 s e 72 ° C durante 1:40 min, extensão final de 72 ° C durante
141 10 min e 12 ° C durante 30 min. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de
142 agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado com luz UV.

143 ***Determinação das concentrações mínimas inibitórias***

144 A resistência das linhagens bacterianas foi determinada pela Minimum Inhibitory
145 Concentration - MIC. A MIC foi definida como a menor concentração de metal que inibiu
146 completamente o crescimento de cada bactéria. As linhagens foram ativadas em meio LB e
147 inoculadas em placa de 96 poços contendo caldo LB com diferentes concentrações de
148 mercúrio: 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.63; e 7.82 µg/mL de Hg²⁺. O crescimento
149 microbiano foi avaliado pelo aumento da absorbância em espectrofotômetro a cada 24 horas
150 durante 5 dias. O valor de MIC foi determinado como a menor concentração de mercúrio
151 capaz de inibir o crescimento bacteriano.

152 ***Determinação de características de promoção do crescimento de plantas e*** 153 ***multirresistência a metais***

154 As linhagens bacterianas foram caracterizadas quanto a presença de traços que
155 auxiliam no crescimento vegetal. A capacidade de secreção das enzimas hidrolíticas amilase,
156 celulase, esterase e protease de acordo com (Ivonilde Carrim et al. 2006), Secreção de
157 sideróforos (Schwyn and Neilands 1987), produção de amônia (Cappucino and Sherman
158 2002), síntese de ácido indolacético - AIA (Shao et al. 2015) e solubilização de fosfato
159 (Katznelson and Bose 1959). Avaliou-se a presença de halo, alteração de cor e/ou
160 crescimento de colônias de acordo com as metodologias indicadas. A tolerância das
161 linhagens aos metais (Cd²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺) foi testada utilizando meio Luria Bertani

162 suplementado com os metais, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (3mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (10
163 mM). A resistência foi determinada através da presença ou ausência de crescimento
164 bacteriano em relação ao controle positivo (meio LB sem suplementação com metal pesado)
165 (Wang et al. 2013).

166 O perfil de resistência a antimicrobianos foi testada pela técnica de difusão em disco
167 (Bauer et al. 1966). Os antibióticos utilizados foram IPM-Imipenem (10 μg), POL-
168 Polimixina B (300 μg), CFO-Cefoxitina (30 μg), PPT- Piperacilina + Tozoboctan (110 μg),
169 PEN-Penicilina (10 μg), Tazobocton (110 μg), CFL- Cefaloxitina (30 μg), OXA-Oxacilina
170 (1 μg), CPM-Cefepime (30 μg), CAZ-Ceftazidina (30 μg), SUT-Sulfazotrin (25 μg). As
171 linhagens foram ativadas em meio LB líquido para em seguida serem semeadas em placas
172 de Petri contendo Agar Nutriente. Os discos de antibióticos foram depositados na superfície
173 do meio inoculado. Os diâmetros dos halos de inibição foram avaliados após 18 e 24 horas
174 com paquímetro. o experimento foi realizado em triplicata. Com base no diâmetro do halo,
175 as linhagens foram classificadas como (+) resistentes e (-) sensíveis (Bauer et al. 1966).

176 *Avaliação do potencial de biorremediação das linhagens e toxicidade*

177 As espécies *A. fluminensis* e *P. acuminatum* não obtiveram índices de germinação
178 satisfatórios em laboratório, e portanto, utilizamos o milho (*Zea mays* L.) (AG 6016) como
179 planta modelo (Benimeli et al. 2008; Lemtiri et al. 2016). Devido ao grande número de
180 linhagens bacterianas, um experimento piloto foi realizado utilizando caixa magenta com as
181 71 linhagens isoladas neste estudo. Sementes de milho foram desinfestadas superficialmente
182 seguindo o protocolo de (Karam 2002). As sementes foram microbiolizadas por imersão em
183 suspensão bacteriana ($\text{DO}_{600\text{nm}}=0.8$) previamente ativadas em caldo -LB e em seguida,
184 transferidas para caixas magentas estéreis contendo Ágar Água contendo 40 mg/kg^{-1} de Hg^{2+} .
185 Os controles foram plantas não inoculadas e mantidas em caixas contendo meio sem e com
186 suplementação de mercúrio. As caixas foram incubadas em BOD durante sete dias em

187 temperatura ajustada a 28°C e fotoperíodo 12h horas de luz. As caixas foram analisadas
188 diariamente para seleção de dezenove linhagens capazes de aumentarem a germinação e
189 tamanho das plântulas. Verificamos que linhagens com valor de MIC<250 µg/mL de Hg²⁺
190 promoveram o crescimento do milho em substrato contaminado, linhagens com essas
191 características foram selecionadas para um experimento em casa de vegetação (Dados não
192 mostrados). Ao final, cinco linhagens apresentaram diferenças significativas em relação ao
193 controle e, portanto, foram selecionadas para o experimento final de biorremediação.
194 Sementes de milho foram desinfestadas como nos experimentos anteriores. Após
195 desinfestação, as sementes foram germinadas em vermiculita: areia 1:1 (m:m) durante cinco
196 dias. Plântulas foram microbiolizadas por imersão em suspensão bacteriana (DO_{600nm}=0.8)
197 previamente ativadas em caldo -LB e em seguida, transferidas para vasos com volume de
198 substrato de 1005g. Os vasos foram irrigados diariamente com água de torneira livre de cloro
199 mantendo a capacidade de campo em 70%. As plantas foram adubadas semanalmente com
200 solução de Hogland (25%) (Hoagland and Arnon, 1950). Quinze dias após o transplântio, o
201 substrato foi recebeu uma solução de HgCl₂ contendo 80 mg/kg⁻¹ de Hg²⁺ administrado de
202 forma parcelada (2x). Como controle utilizamos: (I) plantas-não-inoculadas em solo sem Hg
203 e (II) plantas-não-inoculadas em solo com Hg; (III) plantas inoculadas com *Bacillus*
204 *cereus_C29* (não resistente ao mercúrio, valor de MIC=0) e (IV) solo com Hg sem planta.
205 A porcentagem de eficiência de promoção do crescimento vegetal foi estimada para avaliar
206 o efeito da inoculação no crescimento do hospedeiro (Almoneafy et al. 2014).

207 Após 30 dias, as plantas foram coletadas imergindo as raízes em solução de EDTA
208 (0.01M) e enxaguadas com água destilada para retirada do mercúrio aderido à superfície
209 radicular. Os parâmetros avaliados foram: comprimento da raiz e da parte aérea, diâmetro
210 do caule e peso seco das partes aéreas e radiculares. O peso seco foi obtido mantendo as
211 plantas em estufa durante 24 horas a 50°C até peso constante. Os tecidos vegetais foram
212 moídos e digeridos com HNO₃ e H₂O₂, e o para a digestão do solo utilizou-se HCl e HNO₃.

213 O mercúrio foi quantificado utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-
214 OES) (Thermo Scientific™ iCAP™ 7000 Plus Series). Para estimar o potencial de
215 fitorremediação utilizamos Fator de Bioconcentração-BCF e Fator de Translocação-TF
216 (Audet and Charest 2007):

$$217 \quad \text{BCF} = \frac{\text{Concentração de Hg na raiz}}{\text{Concentração de Hg no solo}}$$

218

219

$$220 \quad \text{TF} = \frac{\text{Concentração de Hg na parte aérea}}{\text{Concentração de Hg na raiz}}$$

221

222 O solo restante do experimento foi utilizado para avaliar a sua toxicidade em alface
223 (*Lactuca sativa* L) e cebola (*Allium cepa*) (Srivastava et al. 2005; Bagur-González et al.
224 2010). Dois litros de água destilada foram utilizados para dissolver 200 gramas do solo
225 oriundo do experimento de biorremediação, a solução foi agitada durante 5 minutos e
226 mantida em estufa por 3 dias. O sobrenadante foi utilizado para os experimentos de
227 toxicidade.

228 Bulbos de cebola saudáveis e com pesos semelhantes foram selecionados para o
229 ensaio. Raízes velhas foram eliminadas com uso de bisturi. As cebolas foram expostas em
230 tubo Falcon contendo 50 mL da solução obtida. Como controles utilizamos, água destilada
231 e solução de Hg^{2+} 80 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Os tubos foram armazenados em BOD com temperatura
232 ajustada a 28°C e fotoperíodo 12h horas de luz. Após sete dias, os bulbos foram retirados e
233 foi realizada medição do comprimento das raízes com auxílio de paquímetro. O experimento
234 foi realizado em triplicata

235 No teste utilizando alface, utilizamos placas de petri com papel filtro estéril, 10
236 sementes estéreis foram distribuídas em cada placa e em seguida adicionamos 5 mL de cada

237 solução preparada a partir do solo, as placas foram mantidas em BOD com temperatura
238 ajustada a 28°C e fotoperíodo 12h horas de luz. Após sete dias realizamos a medição do
239 comprimento da raiz em milímetros (mm).

240 *Análise estatística*

241 Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* R 3.4.2 ([http://www.r-](http://www.r-project.org)
242 [project.org](http://www.r-project.org)). Utilizamos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para comparar a quantidade
243 de bactérias nas rizosferas dos hospedeiros expressa em UFC por grama de solo seco
244 (UFC/g). As comunidades foram analisadas quanto ao perfil de diversidade pela *Série de*
245 *Hill* utilizando o pacote *vegan*. A dissimilaridade entre as comunidades foi estimada pela
246 análise de Cluster utilizando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis com dados de
247 abundância das quatro comunidades de bactérias (+AHg, -AHg, +PHg e -PHg). A
248 composição de espécies nas comunidades foi visualizada no diagrama de Venn construído
249 com o auxílio de Software online (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). O método
250 de enriquecimento não foi utilizado para as análises ecológicas por selecionar uma
251 comunidade diferente da real. A semelhança entre a estrutura das comunidades de acordo os
252 traços funcionais foram analisados pelo índice de dissimilaridade Jaccard. A caracterização
253 funcional foi avaliada qualitativamente e os resultados expressos em positivo (+) para as
254 linhagens que produziram os traços funcionais testados, e negativos (-) para aqueles traços
255 não detectados. Análise de escalonamento multidimensional não métrico foi utilizada foi
256 realizada com o índice de Bray-Curtis, utilizando a função *metaMDS* e *Adonis* do *vegan*. As
257 espécies indicadoras foram verificadas utilizando o pacote *labdsv*. A análise de co-
258 ocorrência foi realizada utilizando a correlação de Spearman dos pacotes *hmisc* e *corrplot*.
259 Análise de coordenadas principais (PCA) foi realizada utilizando o pacote *vegan*. O mapa
260 de calor foi construído com o auxílio dos pacotes *graphics* e *grDevices*. Para o experimento
261 de promoção de crescimento vegetal e biorremediação os tratamentos foram comparados

262 com o controle com mercúrio (C+Hg) e sem mercúrio (C-Hg) por análise de variância,
 263 seguido por teste de Dunnetts utilizando o pacote *multcomp*.

264 **Resultados**

265 *Influência do mercúrio na estrutura e composição de comunidades de rizobactérias de* 266 *A. fluminensis e P. acuminatum*

267 Bactérias cultiváveis foram obtidas da rizosfera dos quatro ambientes -AHg, +AHg,
 268 -PHg e +PHg nos meios +LB e -LB.

269 A concentração de células foi significativamente ($p < 0.05$; teste de Kruskal-Wallis)
 270 maior em locais contaminados em ambas espécies vegetais (Tabela 1). A concentração
 271 bacteriana variou entre os ambientes +Hg e -Hg em comunidades bacterianas da rizosfera de
 272 *P. acuminatum* em ambos métodos de cultivo e comunidades de meio com mercúrio
 273 apresentam maior concentração bacteriana do que aquelas oriundas de locais não
 274 contaminados (Tabela 1).

275 A maior concentração bacteriana foi encontrada na rizosfera de *P. acuminatum*
 276 coletada em local não contaminado (-PHg) isoladas suplementado por mercúrio (+LB)
 277 (Tabela 1). Comunidade obtidas através do meio de cultivo suplementado com mercúrio
 278 (+LB) obtiveram maior valor de concentração bacteriana comparadas as comunidades
 279 selecionadas em meio não suplementado (-LB) (não suplementado) (Tabela 1).

280 **Tabela 1** Contagens de rizobactérias de *A. fluminensis* e *P. acuminatum* de locais com (+Hg)
 281 e sem (-Hg) isolados em meio com (+LB) e sem (-LB) mercúrio

	<i>Aeschynomene fluminensis</i>		<i>Polygonum acuminatum</i>	
	-LB	+LB	-LB	+LB
-Hg	$9.55 \times 10^4 \pm 7.03 \times 10^{4bB}$	$3.50 \times 10^5 \pm 7.07 \times 10^{4aB}$	$6.86 \times 10^4 \pm 4.97 \times 10^{4b}$	$7.50 \times 10^5 \pm 2.17 \times 10^{4a}$
+Hg	$1.02 \times 10^5 \pm 8.10 \times 10^{4bA}$	$4.03 \times 10^6 \pm 3.34 \times 10^{6aA}$	$8.05 \times 10^4 \pm 6.22 \times 10^{4b}$	$1.48 \times 10^6 \pm 7.63 \times 10^{5a}$

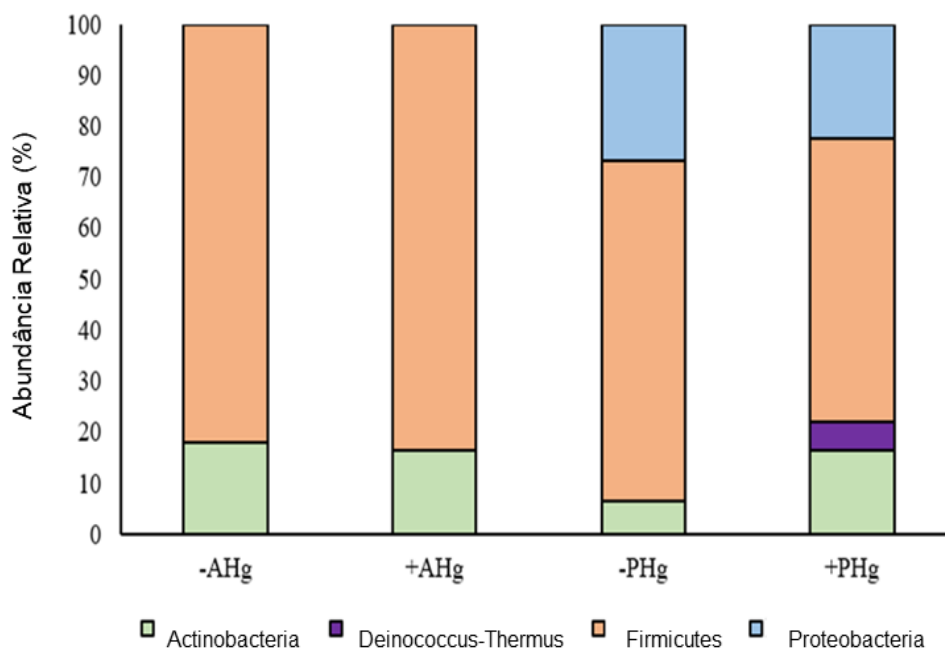
282

283 Os dados são a média±desvio padrão de UFC/g. As letras maiúsculas comparam a diferença
284 entre locais (-Hg e +Hg), comparação na coluna. As letras minúsculas comparam a diferença
285 entre os meios (-LB e +LB), comparação na linha ($p < 0,05$; teste de Kruskal-Wallis).

286 Após a caracterização genética e identificação molecular, as 109 linhagens
287 bacterianas isoladas das diferentes comunidades foram distribuídas em 40 espécies
288 representantes dos filos: Actinobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes e Proteobacteria
289 (Fig. 1) e pertencentes a 21 gêneros (Tabela S1). A rizosfera das duas espécies vegetais se
290 diferencia pelos filos bacterianos detectados (Fig. 1).

291 Firmicutes foi o filo dominante em todas as comunidades avaliadas. Firmicutes foi o
292 único filo isolado em meio seletivo (+LB), e em meio não seletivo (-LB) este filo representou
293 até $83.33 \pm 13.21\%$ das comunidades (Fig. 1).

294 *A. fluminensis* possui a rizosfera colonizada pelos filos Firmicutes e Actinobacteria.
295 Além destes filos, a rizosfera de *P. acuminatum* é colonizada por Proteobacteria, e mais
296 especificamente por Deinococcus-Thermus em ambientes contaminados por mercúrio. Este
297 perfil foi similar para a riqueza de espécies (Fig. S1). A rizosfera de *A. fluminensis* foi
298 colonizada por 11 e 12 espécies bacterianas isoladas dos ambientes -Hg e +Hg,
299 respectivamente (Fig. S1). Estes valores foram ligeiramente superiores ao analisarmos a
300 rizosfera de *P. acuminatum*, chegando a 15 e 18 espécies nos respectivos ambientes
301 indicados anteriormente (Fig. S1).



302

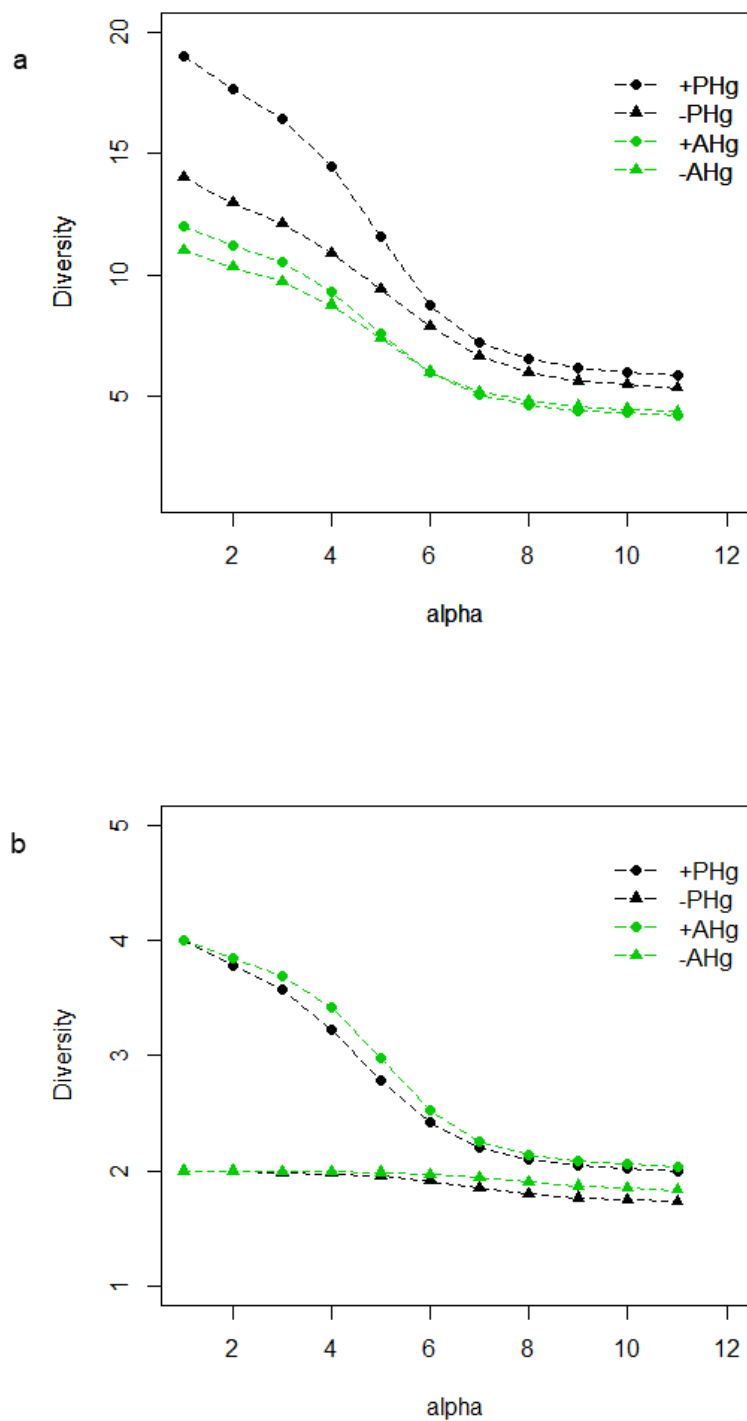
303 **Fig. 1** Abundância Relativa de filos das comunidades. Isolados obtidos de *Aeschynomene*
 304 *fluminensis* e *Polygonum acuminatum* em áreas contaminadas (+AHg e +PHg) e não
 305 contaminadas (-AHg e -PHg) e meio sem mercúrio (-LB)

306 As espécies abundantes variaram entre as amostras. *Microbacterium*
 307 *trichotecenolyticum* foi abundante na rizosfera de áreas contaminadas (+AHg= 20.44±4.70%
 308 e +PHg=21.26±3.55%) (Fig. S1a) e é uma espécie indicadora de áreas contaminadas
 309 (p=0.003). *Bacillus cereus* foi a espécie abundante em áreas não contaminadas (-AHg =
 310 27.84±2.83 % e -PHg = 10.83±2.33 %) (Fig. S1a).

311 A suplementação do meio de cultura com mercúrio alterou a quantidade de espécies
 312 e o perfil da comunidade das amostras analisadas (Fig. S1b). *Bacillus cereus* foi a espécie
 313 dominante em meio +LB e presente em todas as comunidades (Fig. S1b).

314 A série de Hill indicou que a suplementação do meio de cultivo com Hg reduz os
 315 valores de riqueza ($\alpha=0$), índices de Shannon ($\alpha=1$) e Simpson ($\alpha=2$) das comunidades de
 316 bactérias rizosféricas obtidas das amostras -AHg, +AHg, -PHg e +PHg (Fig. 2).
 317 Interessantemente, a não suplementação do meio de cultivo com mercúrio aproxima as
 318 curvas por hospedeiro da série de Hill (Fig. 2a), enquanto a adição de Hg ao meio de cultivo

319 aproxima as curvas por ambiente com e sem contaminação (Fig. 2b). A adição de Hg ao
 320 meio de cultura atuou como pressão seletiva para o crescimento de espécies resistentes ao
 321 metal pesado e que esta comunidade é mais diversa em ambientes contaminados. Este perfil
 322 foi confirmado pela análise de agrupamento construída a partir do índice Jaccard (Fig. S2).



323

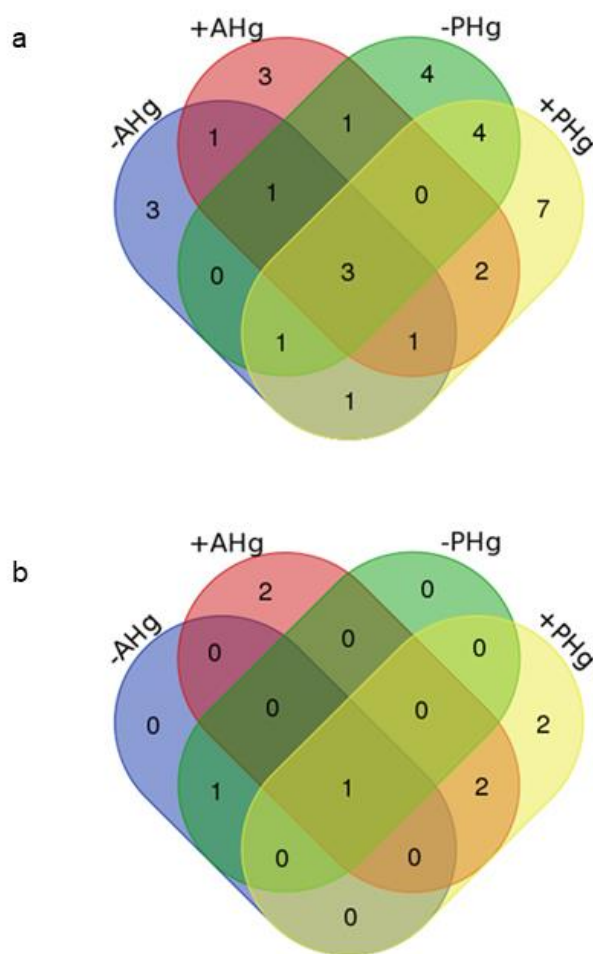
324 **Fig. 2** Perfis de diversidade para amostras das comunidades de rizobactérias. *Aeschynomene*
 325 *fluminensis* (linha verde) e *Polygonum acuminatum* (linha preta) em ambientes com (+ AHg

326 e + PHg) e sem mercúrio (-AHg e -PHg). (a) As bactérias foram selecionadas em meio LB
327 sem mercúrio e (b) suplementação de mercúrio (+LB)

328 O diagrama de Venn (Fig. 3a) demonstra que três espécies: *Bacillus megaterium*,
329 *Bacillus mycoides* e *Microbacterium trichotecenolyticum* a rizosfera de ambas espécies
330 vegetais independente do mercúrio no ambiente.

331 A rizosfera de *Polygonum acuminatum* abriga um maior número de espécies
332 hospedeiro-específicas: *Bacillus arybhattai*, *Bacillus safensis*, *Chromobacterium violaceum*
333 e *Enterobacter* sp. (Fig. 3a). A espécie *Bacillus methylotrophicus* foi exclusiva de
334 *Aeschynomene fluminensis* (Fig. 3a).

335 A ausência do mercúrio no solo propiciou espécies bacterianas exclusivas em
336 *Aeschynomene fluminensis* (*Fictibacillus* sp1., *Paenibacillus* sp. e *Rhodococcus equi*), a
337 contaminação edáfica favorece a presença de *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus* sp1 e
338 *Solibacillus silvestres* na rizosfera deste hospedeiro (Fig. 3a).



339

340 **Fig. 3** Diagrama de Venn das espécies bacterianas isoladas da rizosfera de *A. fluminensis* (+
 341 AHg e -AHg) e *P. acuminatum* (+ PHg e -PHg) (a) meio -LB e (b) +LB

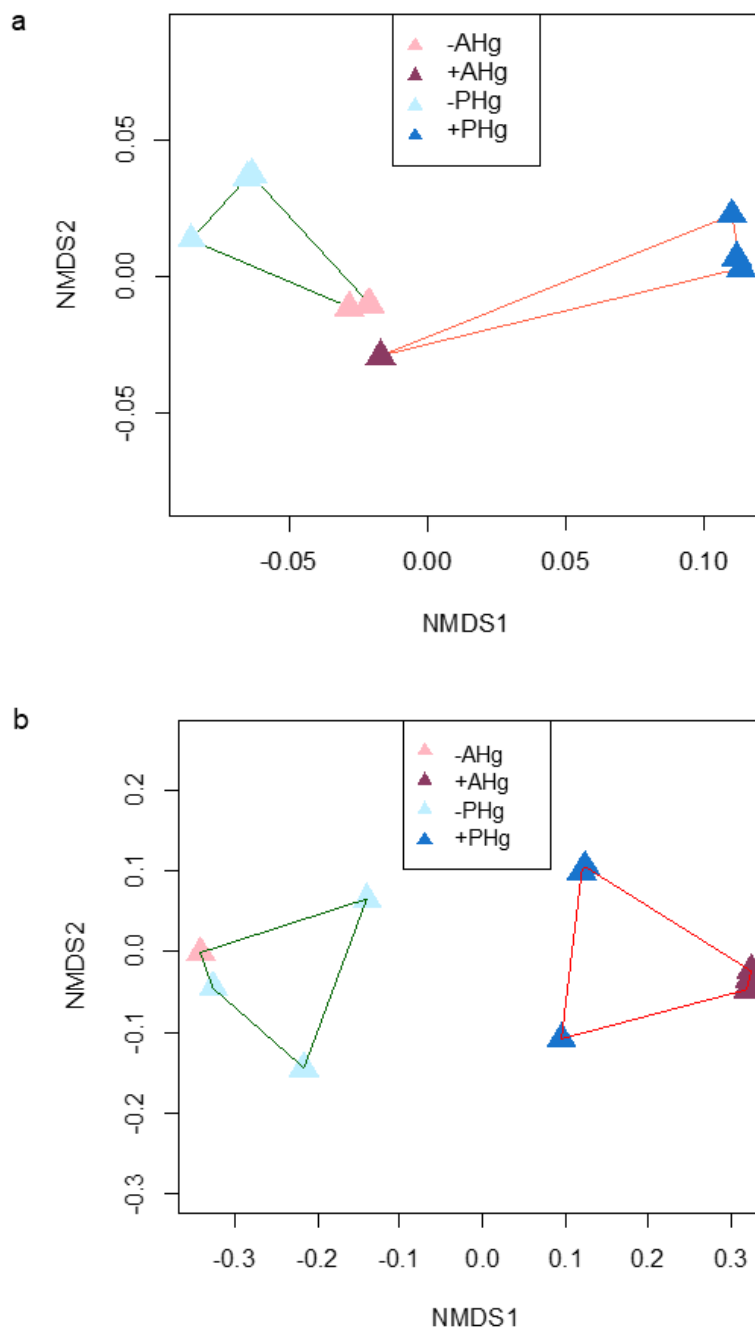
342 Efeito semelhante foi observado na rizosfera de *Polygonum acuminatum* (Fig. 3a).
 343 Solo sem mercúrio seletivamente selecionou sete espécies: *Bacillus aerophilus*,
 344 *Deinococcus* sp., *Fictibacillus* sp., *Fictibacillus nanhaiensis*, *Streptomyces* sp.,
 345 *Stenotrophomonas maltophilia* e *Serratia* sp.; enquanto a presença de mercúrio indica uma
 346 seleção das espécies *Aeromonas jandaei*, *Burkholderia cenocepacia*, *Escherichia coli* e
 347 *Exiguobacterium* sp1. *Arthrobacter defluvii* e *Bacillus amyloliquenfaciens* destacam-se por
 348 colonizaram rizosferas de ambos hospedeiros exclusivamente em ambientes contaminados
 349 pelo mercúrio (Fig. 3a).

350 Utilizando um meio de cultivo seletivo (+LB) a composição das comunidades foi
 351 afetada na presença de mercúrio, apenas a espécie *Bacillus cereus* foi encontrada nas quatro

352 comunidades (Fig. 3b). *Bacillus megaterium* foi exclusiva de áreas sem contaminação (-AHg
353 e -PHg) e *Sporosarcina thermotolerans* foi exclusiva de áreas contaminadas (+AHg e +PHg)
354 (Fig. 3b).

355 As espécies mais abundantes são influenciadas pela presença do mercúrio (-LB)
356 (PERMANOVA, $R^2 = 0.75$ e $P = 0.003$) (Fig. 4a) e em meio com contaminação (+LB)
357 (PERMANOVA, $R^2 = 0.54$ e $P = 0.0045$) a partir da análise de escalas multidimensionais
358 não métricas (NMDS) (Fig. 4b).

359 O meio de cultura de enriquecimento permitiu isolarmos três espécies bacterianas -
360 *Bacillus megaterium* (+AHg), *Bacillus cereus* (+PHg) e *Rhodococcus aetherivorans* (+PHg)
361 – somente de amostras coletadas na área contaminada por mercúrio (Tabela S1). A espécie
362 *Rhodococcus aetheviorans* _C98 foi isolada somente neste método, a linhagem apresentou valor
363 de MIC=125 $\mu\text{g/mL}$ e teve resultado positivo para os traços (esterase, sideróforos e amônia)
364 (Tabela S1). Não detectamos crescimento no meio de enriquecimento ao utilizarmos
365 amostras de solo coletadas em ambientes sem contaminação por mercúrio (Tabela S1).



366

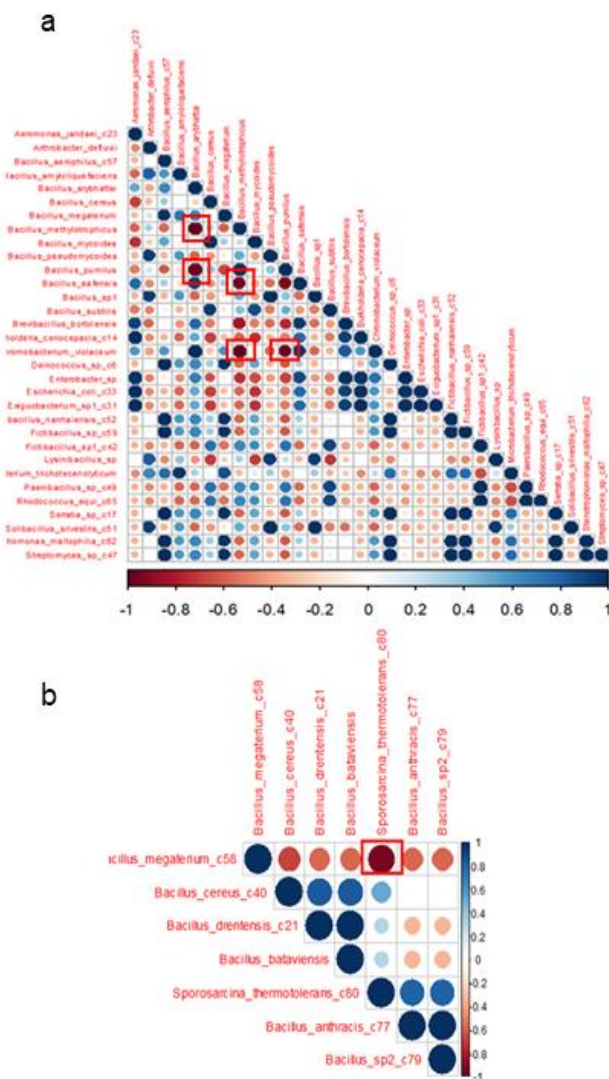
367 **Fig. 4** Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) calculada a partir da distância
 368 Bray-Curtis para isolados em meio -LB (a) e +LB (b). Os polígonos verde e vermelho
 369 mostram o agrupamento entre isolados das áreas contaminadas e não contaminadas.

370 *Análise de Co-ocorrência de populações microbianas*

371 Descrevemos os padrões de co-ocorrência microbiana das comunidades isoladas em
 372 meio (-LB) e (+LB). A parcela da comunidade resistente isolada em meio com adição de
 373 mercúrio apresentou apenas uma relação negativa significativa entre as espécies *Bacillus*

374 *megaterium* e *Sporosarcina thermotolerans* ($R = -0.54$, $P = 0.028$), ou seja, um aumento
375 relativo em um grupo resultou na diminuição do outro (Fig. 5b).

376 As comunidades isoladas em meio sem mercúrio, apresentaram cinco correlações
377 negativas. As correlações negativas ocorreram entre *Bacillus methylophilus* e *Bacillus*
378 *arybhattai* ($R = -0.34$, $P < 0.05$), *Bacillus pumilus* e *Bacillus arybhattai* ($R = -0.49$, $P < 0.05$),
379 *Bacillus methylophilus* e *Bacillus safensis* ($R = -0.52$, $P < 0.05$), *Bacillus methylophilus*
380 e *Chromobacterium violaceum* ($R = -0.53$, $P < 0.05$), *Chromobacterium violaceum* e *Bacillus*
381 *pumilus*. Estes dados indicam competição de *Bacillus methylophilus* por nicho com
382 outras espécies do mesmo gênero, assim um aumento de outros grupos resulta em sua
383 diminuição ou exclusão. Da mesma forma, o número de correlações positivas foi maior na
384 comunidade isolada no meio sem suplementação de mercúrio (-LB) resultando em 37
385 correlações positivas (Fig. 5a) e somente duas correlações positivas no meio suplementado
386 (+LB) (Fig. 5b).



387

388 **Fig. 5** Matriz de correlação entre as espécies baseadas no coeficiente de Spearman. O
 389 tamanho e a intensidade da cor de cada círculo representam a força de correlação (círculos
 390 maiores e escuros= forte correlação); cores azuis ilustram relações positivas e cores
 391 vermelhas ilustram coeficientes de correlação negativos. Os quadrados em vermelho
 392 indicam as correlações que aparecem no texto

393 *Influência do mercúrio nos traços funcionais de comunidades de rizobactérias de A.*
 394 *fluminensis e P. acuminatum*

395 As 71 linhagens representativas das comunidades em estudo foram avaliadas em
 396 relação a traços funcionais importantes para a promoção do crescimento vegetal e
 397 biorremediação de metais. Todas as linhagens apresentaram atividade positiva a pelo menos

398 um dos traços funcionais testados (Tabela S1). Os traços mais frequentes foram secreção de
399 protease e síntese de amônia e AIA (Tabela 2).

400 Linhagens da rizosfera de *A. fluminensis* obteve maior porcentagem de traços
401 funcionais em locais contaminados, enquanto em *P. acuminatum* observamos resultado
402 oposto, a maior porcentagem de traços ocorreu em plantas coletadas em locais não
403 contaminado por mercúrio (Tabela 2). O número de isolados produtores de protease foi
404 maior em comunidade de áreas contaminadas (+AHg: 73% e +PHg: 61%) (Tabela 2).

405 As comunidades têm respostas diferentes ao estresse provocado pelo metal. A
406 comunidade rizosférica de *A. fluminensis* na presença do mercúrio tem maior porcentagem
407 de linhagens positivas para: amilase, celulase e solubilização de fosfato. Em contrapartida,
408 a rizosfera de *P. acuminatum* apresenta redução na porcentagem da maioria dos traços
409 testados (Tabela 2). A comunidade de rizobactérias de *P. acuminatum* apresentou, em geral,
410 uma porcentagem de bactérias secretoras de enzimas hidrolíticas que *A. fluminensis* coletada
411 em locais não contaminados, e menor em locais sem a presença do metal (Tabela 2).
412 *Microbacterium trichotecenolyticum_C85* (-PHg) apresentou atividade positiva para todas
413 as enzimas testadas (Tabela S2).

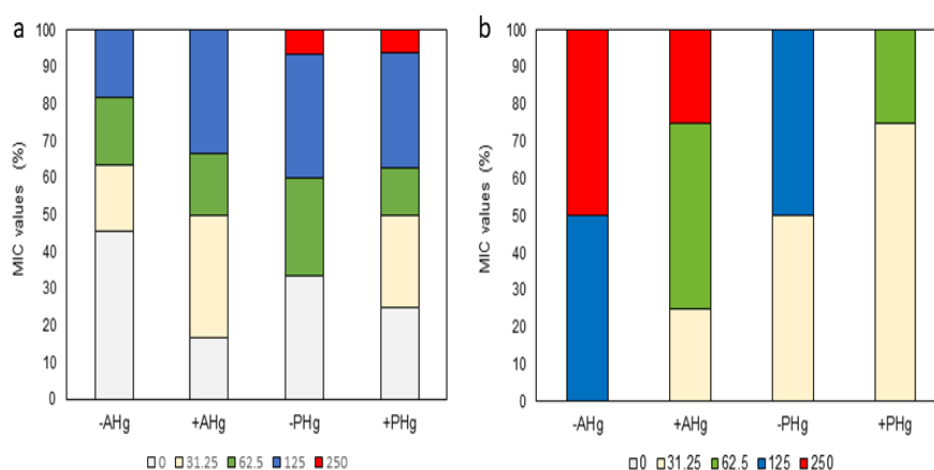
414 **Tabela 2** Porcentagem de características funcionais de comunidades isoladas de locais
415 contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg)

	Traços Funcionais (%)							
	-LB				+LB			
	-AHg	+AHg	-PHg	+PHg	-AHg	+AHg	-PHg	+PHg
Amônia	63.00	93.00	80.00	89.00	50.00	50.00	0.00	25.00
Amilase	18.00	27.00	47.00	28.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Celulase	27.00	33.00	40.00	22.00	50.00	25.00	0.00	50.00
Solubilização de Fosfato	18.00	30.00	33.00	22.00	25.00	50.00	0.00	50.00
Esterase	18.00	7.00	27.00	11.00	0.00	50.00	0.00	50.00
Protease	18.00	73.00	33.00	61.00	0.00	50.00	0.00	25.00
Produção de Sideróforos	9.00	0.00	0.00	17.00	0.00	25.00	0.00	25.00
Ácido Indol Acético	81.00	80.00	80.00	78.00	100.00	75.00	50.00	75.00

416 A adição de mercúrio a meio de cultivo para seleção de bactérias propiciou o
417 isolamento de linhagens que apresentaram traços funcionais importantes na resistência a

418 metais pesados. Sideróforos e esterase foram traços exclusivos em linhagens bacterianas
 419 isoladas das raízes de hospedeiros coletados em área contaminada (+AHg e +PHg) (Tabela
 420 S1).

421 A presença do gene *merA* presente no operon *mer* foi detectada por PCR. Sete
 422 linhagens apresentaram amplificação com amplicons de tamanho esperado para os oligos
 423 utilizados. Com exceção de *Burkholderia cenocepacia_C14*, as demais espécies foram
 424 isoladas de raízes coletadas em áreas contaminadas (Tabela S1). Em relação a concentração
 425 mínima inibitória (MIC), as linhagens isoladas de locais contaminados tiveram maiores
 426 valores de (Fig. 6a). Todas as linhagens isoladas de +LB apresentaram valores de MIC>0
 427 (Fig. 6b).



428

429 **Fig. 6** Concentração mínima inibidora de mercúrio de linhagens isoladas em meio -LB (A)
 430 e + LB (B)

431 Das 71 linhagens, 19.72% foram resistentes a Cd^{2+} , 49.30% a Pb^{2+} e 35.21%
 432 resistentes a Zn^{2+} (Tabela S2). Encontramos linhagens resistentes a Pb^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} em
 433 comunidades obtidas com e sem contaminação ⁺ (Tabela S2). As linhagens foram mais
 434 sensíveis ao Pb^{2+} (Tabela S3). Três linhagens foram resistentes a todos os metais testados,
 435 incluindo o mercúrio (*Deinococcus sp_C6*, *Solibacillus silvestris_C51* e *Sporosarcina*

436 *thermotolerans_C81*) todas isoladas de ambientes contaminados (Tabela S2). Quinze
 437 linhagens foram tolerantes a mais de dois metais (Tabela S2). Em geral, linhagens tolerantes
 438 a maiores concentrações de Hg são também tolerantes a outros metais (Tabela S2).

439 O perfil de resistência a antimicrobianos foi avaliado com onze antibióticos.
 440 Linhagens resistentes a estes antibióticos foram encontradas em todas as comunidades
 441 avaliadas, independente do hospedeiro e contaminação. Das 71 linhagens isoladas, 46.78%
 442 foram resistentes a Cefalotina – CFL e 38.03% resistentes a Penicilina – PEN (Tabela S2).
 443 A maior sensibilidade foi encontrada para Oxacilina – OXA, pois somente 7.04% das
 444 linhagens demonstraram resistência a este antibiótico (Tabela S2).

445 A maior porcentagem de resistência nos isolados de locais não contaminados foi para
 446 Cefalotina - CFL com 30% (12 linhagens) de linhagens resistentes (Tabela 3). A maior
 447 sensibilidade foi encontrada para os antibióticos Imipenem - IPM e Oxacilina – OXA com
 448 6.67% (2 linhagens) de isolados resistentes (Tabela 3).

449 **Tabela 3** Porcentagem de resistência a antibióticos das comunidades isoladas de locais
 450 contaminados (+Hg) e não contaminados (-Hg)

	Resistência a antibióticos (%)		
	Total	+Hg	-Hg
CAZ (30 µg)	23.94	24.39	23.33
CFL (30 µg)	46.48	48.78	43.33
CFO (30 µg)	23.94	29.27	16.67
CPM (30 µg)	14.08	12.20	16.67
IPM (10 µg)	11.27	14.63	6.67
MER (10 µg)	12.68	14.63	10.00
OXA (1 µg)	7.04	7.32	6.67
PEN (10 µg)	38.03	43.90	30.00
POL (300 µg)	19.72	17.07	23.33
PPT (110 µg)	14.08	14.63	13.33
SUT (25 µg)	36.62	43.90	26.67

451

452 As linhagens isoladas de locais com contaminação (+Hg) apresentaram maior
 453 porcentagem de resistência aos antibióticos comparadas as isoladas de locais sem
 454 contaminação com exceção apenas para Cefepime - CPM e Polimixina - POL (Tabela 3). A

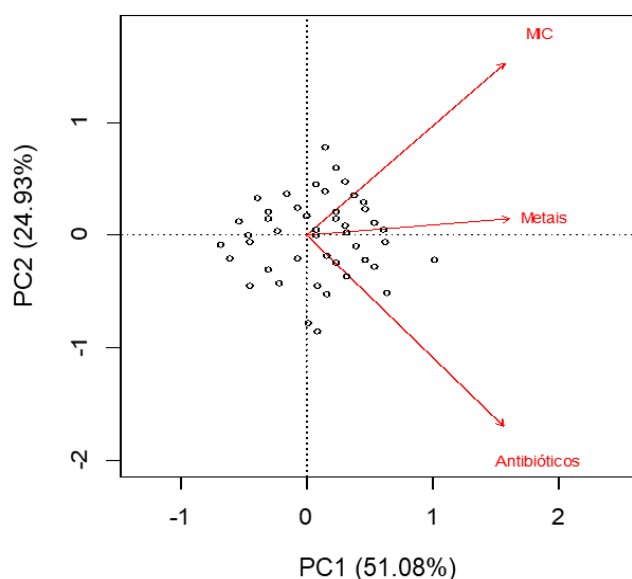
455 maior resistência ocorreu para os antibióticos Cefalotina – CFL 48.78% (20 isolados) de
456 resistência, Penicilina – PEN e Sulfazotrin – SUT com 43.90% de resistência (16 isolados)
457 (Tabela 3).

458 As linhagens *Solibacillus silvestris_C51*, *Sporosarcina thermotolerans_C37*,
459 *Stenotrophomonas maltophilia_C62* foram resistentes a oito dos nove antibióticos testados,
460 as três linhagens foram isoladas de locais com contaminação, apresentaram $MIC \geq 32.5$
461 $\mu\text{g/mL}$ e presença de plasmídeo (Tabela S2).

462 Considera-se multirresistência quando uma espécie apresenta resistência a três ou
463 mais a antibióticos. Neste cenário, a maioria das linhagens multirresistentes foram isoladas
464 em locais com contaminação (Tabela S2). A linhagem com maior resistência foi
465 *Stenotrophomonas maltophilia_C62* isolada de *P. acuminatum* em local contaminado com
466 resistência a sete dos nove antibióticos testados e aos metais Hg^{2+} e Zn^{2+} (Tabela S1).

467 A análise de coordenadas principais (PCA) foi utilizada para avaliar o efeito da
468 contaminação na resistência a multimetais e antibióticos das rizobactérias isoladas (Fig.7).
469 O primeiro e segundo eixo explicaram 24.93% e 51.08%, respectivamente. No total, os dois
470 eixos explicaram 76.01% da variância (Fig. 7). Indicando que a contaminação por mercúrio
471 está correlacionada a maior resistência a multimetais e antibióticos. Este resultado é
472 confirmado através do mapa de calor (Fig. S4).

473 A presença do plasmídeo foi detectada em vinte e cinco linhagens e dentre estas,
474 dezessete são linhagens isoladas de locais com contaminação por Hg (Tabela S1). Através
475 da correlação de Spearman verificamos uma correlação entre a presença do plasmídeo a
476 resistência a multimetais e antibióticos ($R=0.19$).



477

478 **Fig. 7** Análise de coordenadas principais (PCA) exibindo a relação entre os isolados e
 479 resistência a metais e antibióticos

480 **Promoção do crescimento de *Z. mays* em substrato com e sem mercúrio**

481 A capacidade de bactérias rizosféricas em proteger e promover o crescimento do hospedeiro
 482 em condições de contaminação por mercúrio foi avaliada utilizando as espécies *Bacillus*
 483 *mycoides_C1*, *Arthrobacter defluvii_C11*, *Bacillus megaterium_C28*, *Microbacterium*
 484 *trichothecelyticum_C34* e *Enterobacter sp._C35* Estas espécies foram selecionadas por que
 485 possuem tolerância ao mercúrio ($MIC \geq 125 \mu\text{g/mL}$) e apresentaram diferentes traços
 486 funcionais importantes para a promoção de crescimento vegetal (Tabela 4).

487 **Tabela 4** Traços funcionais das linhagens utilizadas. Com exceção de *Bacillus cereus_C29*,
 488 as demais espécies apresentarem $MIC \geq 125 \mu\text{g/mL}$

Espécies	Linhagens	Traços
Controle com Hg	C+Hg	-
Controle sem Hg	C-Hg	-
<i>Bacillus cereus</i> (MIC=0)	C29	amônia
<i>Bacillus mycoides</i>	C1	amilase, esterase, amônia, AIA
<i>Arthrobacter defluvii</i>	C11	amilase, celulase, solubilização de fosfato, protease, amônia, AIA
<i>Bacillus megaterium</i>	C28	amilase, celulase, amônia, AIA
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	C34	amônia, <i>merA</i> , AIA, produção de sideróforos, protease

Enterobacter sp.

C35

celulase, esterase, amônia, AIA

489 (-) Controles sem uso de inoculantes

490 O mercúrio é tóxico ao crescimento e desenvolvimento do milho. A adição deste
 491 metal pesado resultou na diminuição da altura, massa seca e diâmetro do caule de *Z. mays*
 492 (Tabela 5). O uso de rizobactérias influenciou positivamente o crescimento em substrato
 493 contaminado por mercúrio (Tabela 5). Todas as linhagens selecionadas pela resistência ao
 494 mercúrio e traços funcionais aumentaram o diâmetro do caule e promoveram o crescimento
 495 da parte aérea de *Z. mays* (Tabela 5). De acordo com a eficiência de promoção de
 496 crescimento (GPE), as linhagens *Bacillus mycooides_C1*, *Arthrobacter defluvii_C11*,
 497 *Microbacterium trichothecenolyticum_C34* e *Enterobacter sp_C35* proporcionaram um
 498 aumento do tamanho da raiz, com valores de GPE variando de 28 a 45.23% (Tabela 5), em
 499 contrapartida a linhagem *Bacillus megaterium_C28* reduziu em 7.61% o tamanho das raízes
 500 de *Z. mays* (Tabela 5). Todas as linhagens aumentaram o comprimento da parte aérea,
 501 incluindo a linhagem controle que proporcionou o aumento em 25.10% em relação ao
 502 controle sem inoculação (Tabela 5). A eficiência da inoculação chegou a atingir 55.23% na
 503 parte aérea de *Z. mays* inoculada com a linhagem *Bacillus mycooides_C1* (Tabela 5). As
 504 espécies *Bacillus mycooides_C1*, *Bacillus megaterium_C28* e *Enterobacter sp_C35*
 505 promoveram o crescimento do caule, parte aérea e raiz de *Z. mays* em substrato contaminado
 506 melhor que o controle sem contaminação ($p < 0.05$; teste de Dunnett) (Tabela 5).

507 **Tabela 5** Efeito da inoculação de rizobactérias em parâmetros de crescimento de *Zea mays*

Linhagens	Caule (mm)	^a GPE (%)	Parte Aérea (cm)	GPE (%)	Raiz (cm)	GPE (%)	Peso seco	
							Raiz	Parte Aérea
C-Hg	3.25±0.34*	-	41.54±6.88*	-	33.09±7.02*	-	0.310±0.064	0.363±0.096*
C+Hg	2.93±0.52	-	31.11±5.37**	-	26.54±3.21**	-	0.278±0.096	0.242±0.055**
<i>B. cereus_C29</i>	3.39±0.76	15.56	38.92±7.98*	25.1	33.97±6.24*	28	0.298±0.057**	0.266±0.097**
<i>B. mycooides_C1</i>	3.84±0.17*, **	31.06	48.29±3.34*, **	55.23	36.63±5.78*	38.03	0.398±0.086*	0.385±0.096*
<i>A. defluvii_C11</i>	4.36±0.73*, **	48.84	44.33±4.56*	42.48	37.32±5.61*	40.61	0.309±0.059	0.380±0.119*
<i>B. megaterium_C28</i>	3.80±0.37*	29.52	48.02±4.63*, **	54.35	24.52±3.33**	-7.61	0.383±0.135*	0.406±0.054*
<i>M. trichothecenolyticum_C34</i>	3.66±0.56*	24.98	42.30±4.07*	35.97	32.66±4.28*	23.05	0.287±0.055	0.297±0.085
<i>Enterobacter sp_C35</i>	4.33±0.58*, **	47.78	45.97±6.90*	47.77	38.54±8.13*, **	45.23	0.348±0.120	0.439±0.109*

508 Os dados são a média±desvio padrão. (*) indica diferença estatística do controle com
509 mercúrio (C+Hg) com os tratamentos e (**) indica a diferença estatística do controle sem
510 mercúrio (C-Hg) com os tratamentos ($p < 0.05$; teste de teste de Dunnett). (-) controle sem
511 valor de GPE.

512 ^aGPE: Eficácia da promoção do crescimento

513 A concentração de mercúrio no solo mantido sem cultivo de milho e sem inoculação
514 de bactérias permaneceu em $33.54 \pm 1.74 \text{ mg/Kg}^{-1}$ (Tabela 6). O cultivo do milho resultou na
515 redução da concentração de mercúrio disponível no solo, e este efeito foi acentuado pelo uso
516 de determinadas espécies bacterianas (Tabela 6). Ocorreu a redução de mercúrio no solo em
517 $87.86 \pm 1.42\%$ com a inoculação da linhagem *Microbacterium trichothecenolyticum_C34*
518 (Tabela 6). As raízes apresentaram maior quantidade de Hg^{2+} do que o solo e parte aérea
519 (Tabela 6). As linhagens *Arthrobacter defluvii_C11*, *Bacillus megaterium_C28*,
520 *Microbacterium trichothecenolyticum_C34* e *Enterobacter sp_C35* aumentaram o acúmulo
521 de Hg^{2+} nas raízes (Tabela 6), o acúmulo de Hg^{2+} aumentou em $43.06 \pm 7.08\%$ com a
522 inoculação de *Enterobacter sp_C35* e (Tabela 6). O acúmulo de Hg^{2+} na parte aérea foi baixo
523 em todos os tratamentos, inclusive o controle. A maior concentração de Hg^{2+} foi encontrada
524 na parte aérea do milho inoculado com a linhagem *Enterobacter sp_C35* (Tabela 6).

525 O fator de translocação variou entre 0 e 0.038 e houve diferença entre tratamentos e
526 controle, exceto com a inoculação de *Bacillus mycoides_C1* que obteve o TF próximo ao do
527 controle com mercúrio - C+Hg ($p < 0.05$; teste de Dunnetts) (Tabela 6). Todas as linhagens
528 inoculadas foram capazes de reduzir o mercúrio no solo, inclusive a bactéria controle (Tabela
529 6). A inoculação de rizobactérias em *Z. mays* demonstrou que as linhagens *Arthrobacter*
530 *defluvii_C11*, *Bacillus megaterium_C28* e *Enterobacter sp_C35* aumentaram
531 significativamente o fator de bioacumulação ($p < 0.05$; teste de Dunnett) (Tabela 6).

532 O mercúrio residual no solo sem cultivo de milho possui efeito tóxico para as raízes
533 de alface. Houve redução de $22.97 \pm 4.77\%$ no comprimento das raízes das plantas quando
534 utilizamos solo contendo mercúrio em relação ao controle no qual utilizamos solo livre de

535 contaminação (Tabela 6). Todas as linhagens, incluindo a controle *Bacillus cereus_C29*
536 aumentaram o crescimento das raízes de *Z. mays* em solo contaminado (Tabela 6).

537 As raízes de cebola foram mais sensíveis ao mercúrio. A presença do metal reduziu
538 em $23.66 \pm 5.39\%$ o comprimento das raízes e ocorreu inibição total das raízes no tratamento
539 utilizando somente solo contaminado sem cultivo de milho (Tabela 6). Solo oriundo do
540 cultivo de milho inoculado com *Microbacterium trichothecenolyticum_C34* e *Enterobacter*
541 *sp_C35* aumentaram significativamente o comprimento das raízes ($p < 0.05$; teste de Dunnett)
542 indicando menor efeito tóxico destas amostras (Tabela 6). Em contrapartida, a linhagem
543 controle *Bacillus cereus_C29* e as linhagens *Bacillus mycoides_C1* e *Arthrobacter*
544 *defluvii_C11* reduziram o comprimento das raízes de cebola, e a linhagem *Bacillus*
545 *megaterium_C28* inibiu completamente o crescimento das raízes de *A. cepa* (Tabela 6). Em
546 ambas espécies vegetais o solo contaminado sem cultivo de milho apresentou maior
547 toxicidade que os demais tratamentos indicando que o cultivo e inoculação reduz a
548 toxicidade do mercúrio adicionado ao solo (Tabela 6).

549 **Tabela 6** Concentração de Hg²⁺ no solo e bioacumulação nos tecidos de *Zea mays* inoculadas
 550 com linhagens de bactérias rizosféricas e toxicidade da biorremediação sob raízes *Lactuca*
 551 *sativa* e *Allium cepa*

Tratamentos	Concentração de Hg			^a BCF	^b TF	Toxicidade	
	mg.Kg ⁻¹					Alface(mm)	Cebola(mm)
	Solo	Raiz	Folha				
Solo	33.54±1.74	-	-	-	-	10.03±3.69*	-
C-Hg	0.02±0.01*	0.0	0.0	0.0	0.0	15.99±0.07	52.87±4.38*
C+Hg	7.81±0.02	645±103	22.52±3.45	82.53±13.68	0.038±0.009	12.43±0.71	39.69±0.48
<i>Bacillus cereus_C29</i>	6.01±0.60*	527±63	12.7±0.57*	92.80±10.78	0.021±0.002*	17.09±0.67	29.98±2.85*
<i>Bacillus mycoides_C1</i>	4.23±0.48*	396±23	12.14±1.25*	91.27±8.80	0.032±0.005	17.57±4.08	44.20±4.47
<i>Arthrobacter defluvii_C11</i>	5.52±0.57*	880±169*	16.3±0.70	144.48±32.99*	0.018±0.003*	20.82±2.50	27.57±1.08*
<i>Bacillus megaterium_C28</i>	4.86±0.65*	777±29*	14.3±2.87*	161.27±15.77*	0.018±0.002*	24.82±2.06*	-
<i>M. trichothecenolyticum_C34</i>	3.91±0.60*	739±158*	18.99±11.54*	187.47±12.82*	0.023±0.002*	23.54±4.84*	55.31±0.31*
<i>Enterobacter sp_C35</i>	5.67±0.30*	923±45*	20.53±8.87*	160.07±2.86*	0.018±0.004*	22.54±3.45*	53.39±2.11*

552 Os dados são a média±desvio padrão. (*) indica diferença estatística do controle com
 553 mercúrio (C+Hg) com os tratamentos (p<0.05; teste de Dunnett p<0.05). (-) indica ausência
 554 dos parâmetros testados.

555 ^aBCF: Fator de bioacumulação

556 ^bTF: Fator de translocação

557 **Discussão**

558 Neste estudo, consideramos a contaminação por mercúrio um fator estressante sobre
 559 a diversidade e funcionalidade de comunidades bacterianas rizosféricas. Obtivemos
 560 comunidades de rizobactérias de hospedeiros crescendo solo contaminado com mercúrio
 561 (3.24 mg/kg⁻¹) (Pietro-Souza et al. 2017) e comparamos com comunidades oriundas do
 562 sistema radicular de hospedeiros colonizando solos não contaminados. *Aeschynomene*
 563 *fluminensis* é uma Fabaceae, reconhecida como indicadora de áreas úmidas (Pinder & Rosso,
 564 1998) enquanto *Polygonum acuminatum* é uma Polygonaceae distribuída mundialmente em
 565 climas temperados e utilizada amplamente como planta medicinal (Derita et al. 2009). Estas
 566 duas espécies foram selecionadas por que são plantas abundantes em áreas úmidas

567 contaminadas por mercúrio no município de Poconé (Pietro-Souza et al. 2017).
568 Compreender como as comunidades bacterianas da rizosfera são influenciadas pelo mercúrio
569 e determinar o papel dessas comunidades sobre a proteção da planta em condições de estresse
570 são importantes fatores para o desenvolvimento de processos eficientes de biorremediação.

571 *Influência da contaminação por mercúrio na estruturação de comunidades*

572 A quantidade e a diversidade de bactérias nas rizosferas dos hospedeiros foram
573 maiores em áreas contaminadas (Tabela 1 e Fig. 2). Esse padrão corrobora com a hipótese
574 de perturbação intermediária predizendo que uma comunidade submetida a um nível de
575 perturbação intermediário tem como resultado comunidades com alta biodiversidade
576 (Connel 1979). Espécies que respondem positivamente a presença de um contaminante, se
577 sobressaem a outras que tem o metal como um fator limitante, assim, há uma maior
578 probabilidade de crescimento, resultados de uma menor competição por nutrientes naquele
579 local (Wang et al. 2007). Este padrão foi observado na diversidade bacteriana em solo
580 cultivado com arroz num gradiente de Hg onde a maior diversidade bacteriana foi encontrada
581 em solos com maiores concentração concentrações de Hg (6 mg.Kg^{-1})(Liu et al. 2014).

582 Encontramos espécies dos filos Actinobacteria, Deinococcus-Thermus,
583 Proteobacteria e Firmicutes, sendo este último mais abundantemente isolado independente
584 da planta e contaminação (Fig. 1). Um importante característica de algumas espécies de
585 Firmicutes é a capacidade de diferenciação de endósporos. Estas estruturas são altamente
586 especializadas permitindo a persistência da espécie por longos períodos em condições
587 ambientais desfavoráveis, podendo ser uma estratégia eficiente para sobrevivência em
588 ambientes poluídos por metais (Sauvain et al. 2014). Alguns estudos demonstram uma
589 correlação entre a tolerância de bactérias formadoras de endósporos e contaminação do solo
590 por urânio (Holmes et al. 2015) ou água contendo altos níveis de Pb, Cu e Zn (Nakagawa et
591 al. 2002). Essas observações concordaram com estudos sobre resistência ao mercúrio que

592 detectaram Firmicutes como grupos dominantes em solos (Freitas et al. 2008; Wang et al.
593 2013).

594 *Bacillus* foi o gênero abundante em todas as nossas amostras (Tabela S1). O gênero
595 *Bacillus* é descrito como abundante em diferentes comunidades microbianas de solos
596 contaminados por metais pesados, sendo considerado importante para o ciclo do nitrogênio
597 em áreas impactadas pela urbanização e um importante gênero utilizado na biorremediação
598 de derivados do petróleo (Medeiros et al. 2016; Sarkar et al. 2016). Além disso, espécies
599 deste gênero isolada da baía de Minamata foram descritas como resistentes a mercúrio (Uang
600 et al. 2010).

601 A espécie *Deinococcus sp.* pertencente ao filo Deinococcus-Thermus foi
602 exclusivamente detectada na rizosfera de *Polygonum acuminatum* crescendo em local
603 contaminado por mercúrio. Deduzimos que a sua presença correlacione com a capacidade
604 de bactérias deste filo resistirem a condições ambientais extremas inclusive a radiação (Fig.
605 1) (White 1999). A linhagem *Deinococcus sp_ C6* apresentou tolerância ao mercúrio na
606 concentração de 62.5 µg/mL e aos demais metais pesados avaliados Cd²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺, e
607 apresentou resistência aos antibióticos Ceftazidima, Cefalotina, Imipenem e
608 Piperacilina+Tazobactan, além de apresentar traços funcionais importantes para a promoção
609 do crescimento vegetal: AIA, Protease e Amônia (Tabela S2). A espécie mais estudada,
610 *Deinococcus radiodurans*, possui tolerância a radiação e metais tóxicos, como urânio e
611 mercúrio (Appukuttan et al. 2006; Bauermeister et al. 2011). A presença deste filo pode ser
612 utilizada como bioindicador para monitorar a contaminação por mercúrio e esta hipótese
613 necessita de validação experimental.

614 A rizosfera de *Aeschynomene fluminensis* e *Polygonum acuminatum* é colonizada por
615 comunidades que se diferenciam em composição e abundância (Fig. 2; Tabela S1). A espécie
616 vegetal exerce forte influência sobre a comunidade rizosférica principalmente através da
617 secreção de exsudados (Berendsen et al. 2012). A disponibilidade de recursos na rizosfera,

618 qualitativa e quantitativa, fornece diferentes pressões seletivas capazes de moldar a
619 comunidade microbiana em plantas crescendo num mesmo tipo de solo (Minz et al. 2013).

620 A espécie *Microbacterium trichotecenolyticum* foi abundante e a espécie indicadora
621 na rizosfera de áreas contaminadas (Fig. 1). Membros do gênero *Microbacterium* são
622 descritos como resistentes a metais como, cromo, chumbo e mercúrio (Abou-Shanab et al.
623 2007) e são utilizadas na biorremediação de chumbo pela resistência ao metal e presença de
624 traços que promovem o crescimento de plantas (Afzal et al. 2017). *Bacillus cereus* foi a
625 espécie abundante nas comunidades isoladas de ambientes contaminados, esta espécie já foi
626 utilizada para biorremediação de mercúrio (Dash and Das 2015; Govarthanan et al. 2015)
627 promoção de crescimento de plantas e atividades antimicrobianas contra patógenos (Passari
628 et al. 2018).

629 Uma pressão seletiva ao meio de cultura propicia o crescimento de uma parcela
630 resistente da comunidade cultivável. Verificamos que a suplementação de mercúrio ao meio
631 de cultivo resultou numa menor riqueza e diversidade de espécies bacterianas. Ao adicionar
632 mercúrio para o isolamento, selecionamos linhagens que tenham algum mecanismo que as
633 permitam crescer na presença do metal o que explica a menor riqueza de espécies (Deng and
634 Wang 2012).

635 Os padrões de co-ocorrência mostraram um maior número de relações positivas em
636 ambiente sem mercúrio e menor em ambientes com mercúrio (Figura 5), esses padrões
637 podem ser resultado de processos bióticos, que atuam independentemente em cada táxon, ou
638 de interação com interdependência metabólica ou competição (Horner-Devine et al. 2007).
639 Ambientes sob estresse, apresentaram um maior número de espécies com traços e resistência
640 a metais e antibióticos, assim, essas espécies podem estar relacionadas a diferentes
641 características do ambiente que habitam, produzindo uma menor co-ocorrência entre as
642 espécies, já que cada uma tem um papel específico nesta comunidade (Horner-Devine et al.
643 2007).

644 *Caracterização funcional da comunidade*

645 As interações entre plantas e microrganismos na rizosfera controlam processos
646 biogeoquímicos importantes. Entre os microrganismos que colonizam a rizosfera, alguns são
647 conhecidos por desempenhar papéis importantes para o *fitness* da planta, auxiliando na
648 aquisição de nutrientes, proteção contra fitopatógenos e estimulam o crescimento da vegetal
649 através de, por exemplo, a produção de hormônios vegetais (Bulgarelli et al. 2013; Philippot
650 et al. 2013; Muehe et al. 2015). Além de promoção do crescimento da planta, os
651 microrganismos da rizosfera aceleram a remoção de metais em solos contaminados. Isso
652 ocorre através do crescimento das raízes permitindo uma absorção maior ou aumentando a
653 biodisponibilidade do metal (Mishra et al. 2017).

654 Assim, a caracterização do potencial funcional das comunidades microbianas da
655 rizosfera é importante para vincular a atividade da comunidade do solo ao crescimento e à
656 saúde das plantas e é importante na busca de espécies eficientes na biorremediação. Além
657 disso, a funcionalidade é um componente é parte da diversidade geral de comunidade
658 bacterianas e possivelmente fornece uma medida prática e relevante ecologicamente da
659 diversidade microbiana e pode explicar como as espécies alteram ou não sua funcionalidade
660 na presença de contaminantes (Zak et al. 1994).

661 Ao adicionar mercúrio no meio de cultivo, as comunidades de locais contaminados
662 apresentaram uma maior quantidade de traços importantes para a sobrevivência em locais
663 contaminados. Sideróforos e esterase auxiliam no crescimento da planta e desenvolvimento
664 as raízes, aumentando a disponibilidade de nutrientes e alterando a biodisponibilidade de
665 metais tóxicos (Funes Pinter et al. 2017). A capacidade de secreção de AIA foi encontrada
666 em grande parte das linhagens isoladas independente de local e espécie. Este fitohormônio
667 sintetizado por rizobactérias pode estimular a exsudação radicular e aumento de raízes
668 laterais para superar a toxicidade provocada por metais e, portanto, promover o crescimento
669 de plantas (Glick, 2010). Linhagens produtoras de AIA e com alta tolerância a Cu e Ni

670 promoveram o crescimento radicular de *Brassica juncea* em solo contaminado por Ni
671 (Belimov et al. 2016) assim como rizobactéria produtora de AIA estimula o crescimento de
672 gramíneas em locais com contaminação por Cd e Cr (Saif and Khan 2017).

673 Das sete espécies com gene *merA*, seis eram de locais contaminados (Tabela S2). A
674 enzima redutase mercúrica – *merA* – é um eficiente mecanismo de resistência ao mercúrio
675 que converte através de um processo de detoxificação o Hg^{2+} para Hg^0 , uma forma inerte e
676 menos tóxica do mercúrio (Dash and Das 2012). A resistência microbiana através do gene
677 *merA* tem sido utilizada para remediação de áreas contaminadas por metais, e tem se
678 mostrado uma excelente padrão na escolha de linhagens eficientes (Dash and Das 2014).

679 Cada espécie vegetal moldou uma comunidade bacteriana com traços específicos em
680 sua rizosfera e conseqüentemente a presença do metal influenciou de formas distintas
681 (Tabela 2). As plantas são capazes de selecionar as bactérias que habitam sua rizosfera
682 através de diferentes mecanismo como, por exemplo, a arquitetura das raízes e exsudação de
683 compostos específicos do estágio da planta, uma mesma espécie bacteriana pode apresentar
684 características específicas de acordo com seu hospedeiro (Segura et al. 2009).

685 Todas as comunidades apresentaram linhagens resistentes a mercúrio, incluindo
686 espécies isoladas de áreas não contaminadas (Tabela S2), indicando que diversos fatores
687 podem moldar a resistência em comunidades, incluindo as características do solo, traços
688 específicos da linhagem e tempo de adaptação (Ranjard et al. 1997; Epelde et al. 2015)
689 (Ranjard et al. 1997). O mesmo resultado foi encontrado para a comunidade de fungos
690 endofíticos de *P. acuminatum* e *A. fluminensis* (Pietro-Souza et al. 2017).

691 Maiores valores de MIC foram encontrados em linhagens de locais contaminados
692 isoladas em meio +LB (Figura 4). As MICs são importantes para verificar o nível de
693 resistência das linhagens, geralmente estão associadas a concentração e toxicidade de metais
694 no solo (Zampieri et al. 2016). Linhagens isoladas de locais contaminados apresentaram
695 maior quantidade de linhagens produtoras de sideróforos (Tabela S2). Estes compostos

696 orgânicos atuam na captação de ferro pelos organismos que podem diminuir a toxicidade de
697 metais alterando a disponibilidade de elementos tóxicos na rizosfera (Rajkumar et al. 2010).
698 Maiores valores de MIC e produção de sideróforos em linhagens isoladas em locais com
699 contaminação confirmam nossa hipótese de que a presença do mercúrio seleciona linhagens
700 com capacidades específicas para resistir ao metal, características que são utilizadas para a
701 biorremediação.

702 O solo é considerado um reservatório com alta diversidade de genes de resistência a
703 antibióticos, a resistência de espécies bacterianas no solo pode ser maior que num ambiente
704 hospitalar (Nesme and Simonet 2015). A alta resistência bacteriana nesse ambiente ocorre
705 através de, por exemplo, o uso indiscriminado de antibióticos na agricultura e contaminação
706 por metais (Wales and Davies, 2015).

707 Populações bacterianas suscetíveis a antibióticos tornam-se resistentes tanto por
708 mutação genética quanto por transferência horizontal de genes, a transferência de genes de
709 resistência pode ocorrer entre membros de uma mesma espécie e entre espécies diferentes,
710 através de diferentes mecanismos (Huddleston 2014).

711 Encontramos uma correlação entre MIC e multirresistência a metais e antibióticos,
712 ou seja, quanto maior o valor de MIC, maior a multirresistência (Fig. 7). A multirresistência
713 bacteriana a metais e antibióticos pode ocorrer através de diferentes mecanismos, genes que
714 codificam a resistência podem estar transcricionalmente ligados ou um mesmo gene pode
715 conferir resistência a metais e antibióticos (Ktan, 2013). Além disso encontramos uma maior
716 porcentagem de linhagens com plasmídeo em locais contaminados (Tabela S1). Os
717 plasmídeos são elementos genéticos móveis, que permitem a transmissão horizontal de genes
718 entre espécies e desempenham um papel importante na disseminação da resistência
719 bacteriana a antibióticos e metais (Garbisu et al. 2018). Esta característica pode ser a
720 responsável pela maior resistência em espécies de ambientes contaminados, isso porque os

721 genes que conferem ambas resistências são comumente localizados nos mesmos plasmídeos
722 (Barkay et al., 2003). Resultado semelhante foi encontrado em um estudo que demonstrou
723 um aumento na ocorrência de plasmídeos em linhagens isoladas de sedimentos marinhos
724 contaminados mercúrio, e ocorreu uma correlação entre resistência a mercúrio e tetraciclina
725 (Rasmussen and Sorensen 1998).

726 Outro estudo observou que mesmo em um solo com baixas concentrações de
727 alumínio, cobre, manganês e chumbo ocorreu um aumento na resistência a antibióticos, e
728 esse resultado foi atribuído a dois fatores (I) A quantidade de genes pode aumentar
729 juntamente com a riqueza de espécies após a exposição aos metais e (II) aumento de
730 linhagens com traços de resistência (Knapp et al. 2017).

731 Em uma comunidade a exposição a antibióticos pode resultar na seleção de vários
732 mecanismos de resistência diferentes, podendo ser características de uma espécie ou
733 adquirida através de plasmídeo ou outros mecanismos (Kraupner et al. 2018). Os
734 antibióticos com maior resistência foram Cefalotina – CFL e Penicilina – PEN (Tabela S2).
735 A Cefalotina e Penicilina são antibióticos pertencente a classe dos β -lactâmicos, o principal
736 mecanismo de resistência bacteriana aos β -lactâmicos é através da produção de enzimas que
737 apresentam grupos nucleofílicos capazes de promover a abertura do anel β -lactâmico
738 (Nikaido 2009). A grande disseminação de β -lactamases e de plasmídeos resistentes a
739 múltiplos antibióticos está causando uma dificuldade crescente no tratamento de doenças, e
740 acredita-se que a principal origem dessa resistência ocorre através do depósito de genes de
741 resistência em bactérias do solo que sofrem constantes pressões por atividade antropogênicas
742 (Martínez 2008; Cases and Lorenzo 2005; Nakahara et al. 1977). Outro mecanismo de
743 resistência a penicilina no solo pode ocorrer através da Co- evolução com fungos que
744 colonizam o solo e são produtores de penicilina (Bhullar et al. 2012)

745 Encontramos linhagens resistentes a uma ampla gama de antibióticos, *Solibacillus*
746 *silvestris_C51*, *Sporosarcina thermotolerans_C37*, *Stenotrophomonas maltophilia_C62*

747 foram isoladas de ambientes contaminados e resistentes a oito antibióticos, todas com
748 plasmídeo (Tabela S2). O solo é um depósito natural de genes de resistência, no entanto, a
749 presença de contaminantes, como o mercúrio, exerce uma pressão que seleciona
750 características de resistência que liberam no ambiente bactérias multirresistentes que podem
751 ser patógenos difíceis de serem combatidos (Brown and Balkwill 2009; Nesme and Simonet
752 2015).

753 Este fato enfatiza a importância de evitar a excessiva contaminação por metais no
754 ambiente e a necessidade de desenvolver técnicas eficientes na remediação destes
755 contaminantes, a fim de evitar a disseminação de bactérias multirresistentes.

756 ***Biorremediação de mercúrio em Zea mays***

757 As rizobactérias resistentes a metais pesados e promotoras de crescimento de plantas
758 (PGPR) podem otimizar a fitorremediação por diferentes mecanismos, entre elas, promoção
759 da remediação ou diminuição da disponibilidade de metais nos solos, facilitando a
760 translocação de metal do solo para as raízes (bioacumulação) e da raiz para os tecidos
761 (translocação) (Rajkumar et al. 2012; Ma et al. 2016). É essencial considerar a combinação
762 adequada de planta/bactéria para aumentar a eficiência da fitorremediação (Ma et al. 2016).
763 As cinco espécies testadas *Bacillus mycoides_C1*, *Arthrobacter defluvii_C11*, *Bacillus*
764 *megaterium_C28*, *Microbacterium trichothecenolyticum_C34* e *Enterobacter sp_C35* foram
765 eficientes na promoção do crescimento do milho em substrato contaminado por mercúrio
766 (Tabela 5). A eficiência na promoção de crescimento atingiu 55.23% ao inocular o milho
767 com *Bacillus mycoides_C1* (Tabela 5). Todas as espécies testadas apresentavam pelo menos
768 um traço de promoção de crescimento de plantas e MIC > 125 µg/mL de Hg²⁺ indicando que
769 estas características podem ser utilizadas num processo de seleção de linhagens para
770 biorremediação de mercúrio.

771 Índices como BCF e TF são importantes na escolha de espécies que possam ser
772 eficientes na fitoextração de metais (Ali et al., 2013). As concentrações de mercúrio nas

773 raízes foram superiores aos valores encontrados no solo e parte aérea (Tabela 6) e o fator de
774 translocação foi <1 para todas as linhagens (Tabela 6). Valores de $TF > 1$ indica uma maior
775 capacidade de bioacumulação nas raízes e menor capacidade de transferência para as partes
776 aéreas (Balabanova et al. 2015). Estudos mostram que as raízes são uma barreira na
777 transferência do mercúrio presente no solo para os tecidos aéreos de plantas (Sierra et al.
778 2009). Além disso, as raízes do milho podem produzir fitoquelatinas ($HgPC_2$, $HgGC_2$) que
779 dificultam a transferência do mercúrio para partes aéreas (Cui et al., 2014).

780 As linhagens diminuíram significativamente a concentração de mercúrio no solo
781 (Tabela 6), além da capacidade de bioacumulação nas raízes essas linhagens podem interagir
782 com o mercúrio disponível no solo e reduzi-lo por processos de biovolatilização (Wang et al.
783 2018). Plantas que armazenam metais pesados nas raízes são classificadas como
784 fitoremediadoras, esta capacidade pode ser melhorada com a inoculação de linhagens
785 bacterianas, espécies capazes de acumular metais tóxicos com alto BCF e baixo TF são
786 classificadas como fitoestabilizadoras (Abdu et al. 2018). Neste estudo a interação entre
787 planta e rizobactérias melhoraram o efeito fitoestabilizador de *Z. mays*, sendo uma
788 alternativa eficaz na remoção de mercúrio do solo.

789 Os produtos de um processo de biorremediação podem ser incorporados ao ambiente
790 e causar prejuízos maiores que a própria contaminação, o metabolismo vegetal pode
791 transformar o contaminante em um produto químico ainda mais tóxico que o inicial (Segura
792 et al. 2009). Os bioensaios com vegetais são considerados mais sensíveis e simples, sendo
793 uma excelente forma de monitorar a toxicidade em ambientes (Leme and Marin-Morales
794 2009). Bactérias podem transformar mercúrio em metilmercúrio, o que torna um risco em
795 processos de biorremediação, o metilmercúrio é a forma orgânica mais comum, é uma
796 neurotoxina que biomagnifica na cadeia alimentar e pode levar a morte (Tchounwou et al.
797 2003). O solo residual da inoculação de *Z. mays* com as linhagens não apresentou toxicidade

798 (Tabela 6), assim, essas linhagens são eficientes na biorremediação e não liberam
799 metilmercúrio no ambiente.

800 As linhagens que se destacaram na biorremediação foram *Enterobacter sp_C35* e
801 *Microbacterium trichothecelyticum_C34*, essas espécies aumentaram a bioacumulação de
802 mercúrio nas raízes de *Z. mays* e os resíduos não apresentaram toxicidade em *Allium cepa* e
803 *Lactuca sativa* (Tabela 6). Estas espécies secretam esterases e o fitohormônio AIA, ambos
804 importantes para promoção de crescimento e biorremediação. Além disso, *Enterobacter*
805 *sp_C35* apresentou resistência a Pb e Zn e *Microbacterium trichothecelyticum_C34* foi
806 tolerante a Cd, assim são candidatas promissoras na biorremediação de outros metais ou em
807 locais com contaminação por mais de um metal. *Enterobacter sp.* bioacumuladora de
808 mercúrio foi capaz de remediar o metal em um meio de cultivo simultaneamente ao seu
809 crescimento, uma análise específica permitiu verificar o acúmulo do mercúrio na parede
810 celular, tornando incapaz de voltar para o meio ambiente, superando uma das desvantagens
811 do processo de biorremediação (Sinha and Khare 2012). Além disso, a inoculação de
812 *Enterobacter sp.* estimulou o crescimento de *Centella asiática L.* em solo contaminado por
813 cádmio, a inoculação aumentou os valores de bioacumulação e translocação mesmo sob alta
814 concentração de Cd o solo, sendo eficiente na fitorremediação deste metal (Li et al. 2018).

815 *Microbacterium trichothecenolyticum*, isolada das raízes de *Dodonaea viscosa L.*,
816 apresentou atividade para traços promotores de crescimento como: amônia, sideróforos,
817 solubilização de fosfato, celulase, protease e pectinase (Afzal et al. 2017), enquanto
818 *Microbacterium sp.* promoveu o crescimento de *Arabis alpine* sob estresse por metais
819 pesados (Sun et al. 2018) e biorremediadora de hidrocarbonetos (Ali et al. 2015).

820 Este estudo forneceu dados que indicam que comunidades cultiváveis de
821 rizobactérias são influenciadas pela contaminação edáfica com mercúrio. A presença do
822 metal aumentou a diversidade e influenciou na funcionalidade das comunidades. Linhagens
823 com traços de promoção de crescimento e alta resistência ao mercúrio foram eficientes

824 indução da fitoremediação por milho. Dados de sequenciamento de nova geração pode
825 avaliar deste metal em espécies não cultiváveis que não podem ser detectadas através de
826 técnicas convencionais de isolamento, fornecendo um panorama mais amplo da influencia
827 do mercúrio em rizobactérias.

828 **Conclusão**

829 Nossos dados confirmam a hipótese de que a contaminação por mercúrio altera a estrutura e
830 funcionalidade de comunidades bacterianas da rizosfera de *A. fluminensis* e *P. acuminatum*.
831 A presença do metal estimulou a diversidade de espécies e alterou distintamente o perfil
832 funcional das rizobactérias de ambos hospedeiros. Traços importantes para a resistência a
833 Hg^{2+} , como altos valores de MIC, presença do gene *merA* e plasmídeo foram encontrados
834 em maior número nas linhagens de comunidades com contaminação. A inoculação de
835 linhagens de rizobactérias com alto valores de MIC e traços funcionais em *Z. mays* reduziu
836 em até $87.86 \pm 1.42\%$ do mercúrio no solo e aumento em $43.06 \pm 7.08\%$ a fitoextração de Hg^{2+}
837 pelas raízes. *Enterobacter sp_C35*. e *Microbacterium trichothecelyticum_C34* são linhagens
838 eficientes na promoção da fitoextração do mercúrio capaz de tornar o solo menos tóxico a
839 espécies vegetais sensíveis a contaminação.

840 **Agradecimentos**

841 Agradecemos a coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
842 (CAPES) e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo
843 financiamento da pesquisa.

844 **REFERÊNCIAS**

845 Abdu A, Jusop S, Abdul-hamid H, Karim R, Nazrin M (2018) Potentiality of *Melastoma*
846 *malabathricum* as Phytoremediators of soil contaminated with sewage sludge. *Ecology*
847 105: 27–35 <https://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0002>

- 848 Abou-Shanab R, Van Berkum P, Angle JS (2007) Heavy metal resistance and genotypic
849 analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present
850 in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*
851 68:360–367 . [https://doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.051](https://doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.051)
- 852 Afzal I, Iqar I, Shinwari ZK, Yasmin A (2017) Plant growth-promoting potential of
853 endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth*
854 *Regul* 81:399–408 . [https://doi: 10.1007/s10725-016-0216-5](https://doi:10.1007/s10725-016-0216-5)
- 855 Ali N, Al-Awadhi H, Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, Sorkhoh N, Radwan SS (2015)
856 Bioremediation of Atmospheric Hydrocarbons via Bacteria Naturally Associated with
857 Leaves of Higher Plants. *Int J Phytoremediation* 17:1160–1170 . [https://doi:](https://doi:10.1080/15226514.2015.1045125)
858 [10.1080/15226514.2015.1045125](https://doi:10.1080/15226514.2015.1045125)
- 859 Almoneafy A, Kakar K, Nawaz Z, Li B, Saand M, Chun-lan Y, Xie G (2014) Tomato plant
860 growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus*
861 strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis* 63:59–70 . [https://doi:](https://doi:10.1007/s13199-014-0288-9)
862 [10.1007/s13199-014-0288-9](https://doi:10.1007/s13199-014-0288-9)
- 863 Audet P, Charest C (2007) Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical
864 perspective. *Environ Pollut* 147:231–237. [https://doi: 10.1016/j.envpol.2006.08.011](https://doi:10.1016/j.envpol.2006.08.011)
- 865 Bagur-gonzález MG, Estepa-molina C, Martín-peinado F, Morales-ruano S (2010) Toxicity
866 assessment using *Lactuca sativa* L . bioassay of the metal (loid) s As , Cu , Mn , Pb
867 and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site.
868 [https://doi: 10.1007/s11368-010-0285-4](https://doi:10.1007/s11368-010-0285-4)
- 869 Balabanova B, Stafilov T, Bačeva K (2015) Bioavailability and bioaccumulation
870 characterization of essential and heavy metals contents in *R. acetosa*, *S. oleracea* and
871 *U. dioica* from copper polluted and referent areas. *J Environ Heal Sci Eng* 13: .
872 [https://doi: 10.1186/s40201-015-0159-1](https://doi:10.1186/s40201-015-0159-1)
- 873 auer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a

- 874 standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493.
- 875 Barkay, T.; Miller, S. M.; Summers, A. O. (2003) Bacterial mercury resistance from atoms
876 to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 355-384.
- 877 Benimeli CS, Fuentes MS, Abate CM, Amoroso MJ (2008) Bioremediation of lindane-
878 contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *Int*
879 *Biodeterior Biodegrad* 61:233–239. [https://doi: 10.1016/j.ibiod.2007.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.09.001)
- 880 Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Wright GD
881 (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*, 7(4),
882 e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003495>
- 883 Brown MG, Balkwill DL (2009) Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep
884 terrestrial subsurface. *Microb Ecol* 57: 484–493. [https://doi: 10.1007/s00248-008-](https://doi.org/10.1007/s00248-008-9431-6)
885 9431-6
- 886 Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P (2013)
887 Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol*
888 64:807–38 . [https://doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120106](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106)
- 889 Carrim AJ, Barbosa EC, Vieira JD, 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates
890 of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Arch. Biol. Technol.*
891 49, 353–359. [http://dx.doi.org/10.1590/S1516- 89132006000400001](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000400001).
- 892 Cappuccino JG, and Sherman N (2002) *Microbiology: A Laboratory Manual*. 6th Edition,
893 Pearson Education Inc., San Francisco, 15-224.
- 894 Cases I, Lorenzo V (2005) Promoters in the environment: transcriptional regulation in its
895 natural context. *Nature Reviews Microbiology*, 3(2), 105.
896 [https://doi:10.1038/nrmicro1084](https://doi.org/10.1038/nrmicro1084)
- 897 Connell J.H 1978 Diversity in tropical rainforests and coral reefs. *Science*, 199: 1302-1310.
- 898 Correia J, Cesar R, Marsico E, Diniz GTN, Zorro MC, Castilhos Z (2014) Mercury
899 contamination in alligators (*Melanosuchus niger*) from Mamirauá Reservoir (Brazilian

- 900 Amazon) and human health risk assessment. *Environ Sci Pollut Res* 21:13522–13527 .
901 [https://doi: 10.1007/s11356-014-3282-0](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3282-0)
- 902 Dahshan H, Abd-Elall AMM, Megahed AM (2013) Trace Metal Levels in Water, Fish, and
903 Sediment From River Nile, Egypt: Potential Health Risks Assessment. *J Toxicol*
904 *Environ Heal Part A* 76:1183–1187. [https://doi: 10.1080/15287394.2013.848421](https://doi.org/10.1080/15287394.2013.848421)
- 905 Das S, Dash HR, Chakraborty J (2016) Genetic basis and importance of metal resistant genes
906 in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal
907 pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:2967–2984. [https://doi: 10.1007/s00253-](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7364-4)
908 [016-7364-4.](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7364-4)
- 909 Dash HR, Das S (2015) Bioremediation of inorganic mercury through volatilization
910 and biosorption by transgenic *Bacillus cereus* BW-03(pPW-05). *Int Biodeterior*
911 *Biodegradation* 103:179–185 . [https://doi: 10.1016/j.ibiod.2015.04.022](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.022)
- 912 Dash HR, Das S (2012) Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer
913 genes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 75:207–213
914 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>
- 915 Dash HR, Das S (2014) Bioremediation potential of mercury by *Bacillus* species isolated
916 from marine environment and wastes of steel industry. *Bioremediat J* 18:204–212 .
917 [https://doi: 10.1080/10889868.2014.899555](https://doi.org/10.1080/10889868.2014.899555)
- 918 Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Duncan LC (2001) Is the microbial community in a
919 soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance?. *Soil Biol*
920 *Biochem* 33:1143–1153. [https://doi: 10.1016/S0038-0717\(01\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00018-9)
- 921 Deng X, Wang P (2012) Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their
922 bioaccumulation process. *Bioresour Technol* 121:342–347 . [https://doi:](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.017)
923 [10.1016/j.biortech.2012.07.017](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.017)
- 924 Derita MG, Leiva ML, Zacchino SA (2009) Influence of plant part, season of collection and
925 content of the main active constituent, on the antifungal properties of *Polygonum*

- 926 acuminatum Kunth. J Ethnopharmacol 124:377–383 .https://doi:
927 10.1016/j.jep.2009.05.029
- 928 Epelde L, Lanzén A, Blanco F, Urich T, Garbisu C (2015) Adaptation of soil microbial
929 community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-
930 Zn mine. FEMS Microbiol Ecol 91: . https://doi: 10.1093/femsec/fiu007
- 931 Funes Pinter I, Salomon MV, Berli F, Bottini R, Piccoli P (2017) Characterization of the
932 As(III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to in vitro-grown
933 grapevine. Appl Soil Ecol 109:60–68 . https://doi: 10.1016/j.apsoil.2016.10.003
- 934 Gai K, Hoelen TP, Hsu-Kim H, Lowry G V (2016) Mobility of Four Common Mercury
935 Species in Model and Natural Unsaturated Soils. Environ Sci Technol 50:3342–3351.
936 https://doi: 10.1021/acs.est.5b04247
- 937 Garbisu C, Garaiurrebaso O, Lanzén A, Álvarez-Rodríguez I, Arana L, Blanco F, Alkorta
938 I (2018) Mobile genetic elements and antibiotic resistance in mine soil amended with
939 organic wastes. Science of The Total Environment, 621, 725-733.
940 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.221
- 941 Govarathanan M, Lee SM, Kamala-Kannan S, Oh BT (2015) Characterization, real-time
942 quantification and in silico modeling of arsenate reductase (arsC) genes in arsenic-
943 resistant *Herbaspirillum* sp. GW103. Res Microbiol 166:196–204. https://doi:
944 10.1016/j.resmic.2015.02.007
- 945 Griffith DM, Veech J a., Marsh CJ (2016) cooccur : Probabilistic Species Co-Occurrence
946 Analysis in R. J Stat Softw 69:1–17 . https://doi: 10.18637/jss.v069.c02
- 947 Hartmann A, Rothballer M, Schmid M (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere
948 microbial ecology and soil bacteriology research. In: Plant and Soil. pp 7–14.
949 https://doi: 10.1007/s11104-007-9514-z
- 950 Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water culture method for growing plants without soils.
951 Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

- 952 Horner-Devine MC, Silver JM, Leibold MA, Bohannan BJM, Colwell RK, Fuhrman JA,
953 Green JL, Kuske CR, Martiny JBH, Muyzer G, Øvreås L, Reysenbach AL, Smith VH
954 (2007) A comparison of taxon co-occurrence patterns for macro- and microorganisms.
955 Ecology 88:1345–1353 . [https://doi: 10.1890/06-0286](https://doi.org/10.1890/06-0286)
- 956 Huddleston JR (2014) Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential
957 spread of antibiotic resistance genes. Infection and drug resistance, 7, 167. [https:// doi:
958 10.2147/IDR.S48820](https://doi.org/10.2147/IDR.S48820)
- 959 Katznelson H, Bose B (1959) Metabolic Activity and Phosphate-Dissolving Capability of
960 Bacterial Isolates From Wheat Roots, Rhizosphere, and Non-Rhizosphere Soil. Can J
961 Microbiol 5:79–85 . [https://doi: 10.1139/m59-010](https://doi.org/10.1139/m59-010)
- 962 Knapp CW, Callan AC, Aitken B, Shearn R, Koenders A, Hinwood A (2017) Relationship
963 between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western
964 Australia. Environ Sci Pollut Res 24:2484–2494. [https://doi: 10.1007/s11356-016-
965 7997-y](https://doi.org/10.1007/s11356-016-7997-y)
- 966 Koehler TM, Thorne CB (1987) *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates
967 interspecies plasmid transfer. J Bacteriol 169: 5271–5278
- 968 Kushwaha A, Hans N, Kumar S, Rani R (2018) A critical review on speciation, mobilization
969 and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies.
970 Ecotoxicol. Environ. Saf. 147:1035–1045
971 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.049>
- 972 Kraupner N, Ebmeyer S, Bengtsson-Palme J, Fick J, Kristiansson E, Flach CF, Larsson D J
973 (2018) Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown
974 in complex aquatic bacterial biofilms. Environment international, 116, 255-268.
975 [https://doi: 10.1016/j.envint.2018.04.029](https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.029)
- 976 Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A
977 review on its application. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 682:71–81.

- 978 <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
- 979 Lemtiri A, Liénard A, Alabi T, Brostaux Y, Cluzeau D, Francis F, Colinet G (2016)
- 980 Earthworms *Eisenia fetida* affect the uptake of heavy metals by plants *Vicia faba* and
- 981 *Zea mays* in metal-contaminated soils. *Appl Soil Ecol* 104:67–78. [https://doi:](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.021)
- 982 [10.1016/j.apsoil.2015.11.021](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.021)
- 983 Li Y, Liu K, Wang Y, Zhou Z, Chen C, Ye P, Yu F (2018) Improvement of cadmium
- 984 phytoremediation by *Centella asiatica* L. after soil inoculation with cadmium-resistant
- 985 *Enterobacter* sp. FM-1. *Chemosphere* 202:280–288 . [https://doi:](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.097)
- 986 [10.1016/j.chemosphere.2018.03.097](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.097)
- 987 Liu SH, Zeng GM, Niu QY, Liu Y, Zhou L, Jiang LH, Tan X fei, Xu P, Zhang C, Cheng M
- 988 (2017) Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals
- 989 by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresour. Technol.* 224:25–33. [https:// doi:](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095)
- 990 [10.1016/j.biortech.2016.11.095](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095).
- 991 Liu YR, Wang JJ, Zheng YM, Zhang LM, He JZ (2014) Patterns of Bacterial Diversity
- 992 Along a Long-Term Mercury-Contaminated Gradient in the Paddy Soils. *Microb Ecol*
- 993 68:575–583. [https:// doi: 10.1007/s00248-014-0430-5](https://doi.org/10.1007/s00248-014-0430-5)
- 994 Ma Y, Oliveira RS, Freitas H, Zhang C (2016) Biochemical and Molecular Mechanisms of
- 995 Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. *Front Plant Sci* 7:
- 996 [.https:// doi: 10.3389/fpls.2016.00918](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00918)
- 997 Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H (2011) Plant growth promoting rhizobacteria
- 998 and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.*
- 999 29:248–258. [https:// doi:10.1016/j.biotechadv.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.12.001).
- 1000 Mahbub KR, Subashchandrabose SR, Krishnan K, Naidu R, Megharaj M (2017) Mercury
- 1001 alters the bacterial community structure and diversity in soil even at concentrations
- 1002 lower than the guideline values. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:2163–2175.
- 1003 [https://doi: 10.1007/s00253-016-7965-y](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7965-y)

- 1004 Martínez JL (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments.
1005 Science, 321(5887), 365-367. [https://doi: 10.1126/science.1159483](https://doi.org/10.1126/science.1159483)
- 1006 May Júnior JA, Quigley H, Hoogesteijn R, Tortato FR, Devlin A, Carvalho Júnior RM DE,
1007 Morato RG, Sartorello LR, Rampim LE, Haberfeld M, Paula RC , Zocche JJ (2017)
1008 Mercury content in the fur of jaguars (*Panthera onca*) from two areas under different
1009 levels of gold mining impact in the Brazilian Pantanal. *An Acad Bras Cienc.* [https://doi: 10.1590/0001-3765201720170190](https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170190)
- 1011 Miller CS, Handley KM, Wrighton KC, Frischkorn KR, Thomas BC, Banfield JF (2013)
1012 Short-Read Assembly of Full-Length 16S Amplicons Reveals Bacterial Diversity in
1013 Subsurface Sediments. *PLoS One* 8.[https:// doi: 10.1371/journal.pone.005601](https://doi.org/10.1371/journal.pone.005601)
- 1014 Mishra J, Singh R, Arora NK (2017) Alleviation of heavy metal stress in plants and
1015 remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Front Microbiol* 8:9 [https://doi: 10.3389/fmicb.2017.01706](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706)
- 1017 Muehe EM, Weigold P, Adaktylou IJ, Planer-Friedrich B, Kraemer U, Kappler A, Behrens
1018 S (2015) Rhizosphere microbial community composition affects cadmium and zinc
1019 uptake by the metal-hyperaccumulating plant *Arabidopsis halleri*. *Appl Environ*
1020 *Microbiol* 81:2173–2181 .[https:// doi: 10.1128/AEM.03359-14](https://doi.org/10.1128/AEM.03359-14)
- 1021 Nakahara, H., Ishikawa, T., Sarai, Y., Kondo, I., Kozukue, H. e Silver, S. (1977). Ligação
1022 de mercúrio, cádmio e arseniato e resistência a drogas em isolados clínicos de
1023 *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* , 33 (4), 975-976.
- 1024 Nesme J, Simonet P (2015) The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance
1025 origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environ Microbiol*
1026 7:913–30. [https://doi: 10.1111/1462-2920.12631](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631).
- 1027 Nikaido, H. (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78,
1028 119-146. view of biochemistry, 78, 119-146. [https://doi/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923)

- 1030 Oestreicher JS, Lucotte M, Moingt M, Bélanger É, Rozon C, Davidson R, Mertens F,
1031 Romaña CA (2017) Environmental and Anthropogenic Factors Influencing Mercury
1032 Dynamics During the Past Century in Floodplain Lakes of the Tapajós River, Brazilian
1033 Amazon. *Arch Environ Contam Toxicol* 72:11–30. [https://doi: 10.1007/s00244-016-](https://doi.org/10.1007/s00244-016-0325-1)
1034 [0325-1](https://doi.org/10.1007/s00244-016-0325-1)
- 1035 Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie DA (1997) Distribution, diversity and evolution of
1036 the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:239–262.
1037 [https://doi: 10.1016/S0168-6445\(97\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00003-X)
- 1038 Passari AK, Lalsiamthari PC, Zothanpuia, Leo VV, Mishra VK, Yadav MK, Gupta VK,
1039 Singh BP (2018) Biocontrol of *Fusarium* wilt of *Capsicum annuum* by rhizospheric
1040 bacteria isolated from turmeric endowed with plant growth promotion and disease
1041 suppression potential. *Eur J Plant Pathol* 150:831–846 .[https://doi: 10.1007/s10658-](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1325-3)
1042 [017-1325-3](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1325-3)
- 1043 Pestana IA, Bastos WR, Almeida MG, de Carvalho DP, Rezende CE, Souza CMM (2016)
1044 Spatial-temporal dynamics and sources of total Hg in a hydroelectric reservoir in the
1045 Western Amazon. *Brazil. Environ Sci Pollut Res* 23:9640–9648. [https://doi:](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6185-4)
1046 [10.1007/s11356-016-6185-4](https://doi.org/10.1007/s11356-016-6185-4)
- 1047 Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH (2013) Going back to the
1048 roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 11:789–799
1049 [.https://doi: 10.1038/nrmicro3109](https://doi.org/10.1038/nrmicro3109)
- 1050 Pieterse CMJ, de Jonge R, Berendsen RL (2016) The Soil-Borne Supremacy. *Trends Plant*
1051 *Sci.* 21:171–173. [https://doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.018](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.018).
- 1052 Pietro-Souza W, Mello IS, Vendruscullo SJ, Da Silva GF, Da Cunha CN, White JF, Soares
1053 MA (2017) Endophytic fungal communities of *Polygonum acuminatum* and
1054 *Aeschynomene fluminensis* are influenced by soil mercury contamination. *PLoS One*
1055 12:1–24 .[https://doi: 10.1371/journal.pone.0182017](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182017)

- 1056 Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing
1057 bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28:142–149.
1058 [https://doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002).
- 1059 Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H (2012) Perspectives of plant-associated
1060 microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30:1562–1574.
1061 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>
- 1062 Ranjard L, Richaume A, Jocteur-Monrozier L, Nazaret S (1997) Response of soil bacteria
1063 to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiol Ecol*
1064 24:321–331.[https://doi:10.1016/S0168-6496\(97\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(97)00073-1)
- 1065 Rasmussen, L.D. and Sorensen, S.J. (1998) The effect of long-term exposure to mercury on
1066 the bacterial community in marine sediment. *Curr. Microbiol.* 36, 291–297
- 1067 Rizzini Ansari N, Fernandez MA, Brito JL, Vidal LG, de Andrade Costa ES, Malm O (2016)
1068 Assessing mercury contamination in a tropical coastal system using the mussel *Perna*
1069 *perna* and the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Environ Monit Assess* 188.
1070 [https://doi:10.1007/s10661-016-5683-7](https://doi.org/10.1007/s10661-016-5683-7)
- 1071 Rodríguez Martín-Doimeadios RC, Berzas Nevado JJ, Guzmán Bernardo FJ, Jiménez
1072 Moreno M, Arrifano GPF, Herculano AM, do Nascimento JLM, Crespo-López ME
1073 (2014) Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian
1074 Amazon. *Environ Sci Pollut Res* 21:7466–7479. [https://doi:10.1007/s11356-014-2680-](https://doi.org/10.1007/s11356-014-2680-7)
1075 [7](https://doi.org/10.1007/s11356-014-2680-7)
- 1076 Saif S, Khan MS (2017) Agriculture Assessment of Heavy Metals Toxicity on Plant Growth
1077 Promoting Rhizobacteria and Seedling Characteristics of *Pseudomonas putida* SFB3
1078 Inoculated Greengram. *Acta Sci Agric* 12:47–56.
- 1079 Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination
1080 of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56. [https://doi:10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- 1081 Segura A, Rodríguez-Conde S, Ramos C, Ramos JL (2009) Bacterial responses and

- 1082 interactions with plants during rhizoremediation. *Microb. Biotechnol.* 2:452–464
- 1083 Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R (2015) Contribution of indole-3-acetic acid in the
1084 plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9.
1085 *Biol Fertil Soils* 51:321–330 .[https:// doi: 10.1007/s00374-014-0978-8](https://doi.org/10.1007/s00374-014-0978-8)
- 1086 Sinha A, Khare SK (2012) Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter*
1087 *sp.* cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation* 23:25–34 .[https://](https://doi.org/10.1007/s10532-011-9483-z)
1088 [doi: 10.1007/s10532-011-9483-z](https://doi.org/10.1007/s10532-011-9483-z)
- 1089 Sierra, M. J., Millán, R., Esteban, E., Cardona, A. I., & Schmid, T. (2008). Evaluation of
1090 mercury uptake and distribution in *Vicia sativa* L. applying two different study scales:
1091 greenhouse conditions and lysimeter experiments. *Journal of Geochemical Exploration*,
1092 96(2-3), 203-209. [https://do: 10.1016/j.gexplo.2007.04.013](https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2007.04.013)
- 1093 Srivastava R, Kumar D, Gupta SK (2005) Bioremediation of municipal sludge by
1094 vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*. *Bioresour Technol* 96:1867–
1095 1871. [https://doi: 10.1016/j.biortech.2005.01.029](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.029)
- 1096 Sun W, Xiong Z, Chu L, Li W, Soares MA, White JF, Li H (2018) Bacterial communities
1097 of three plant species from Pb-Zn contaminated sites and plant-growth promotional
1098 benefits of endophytic *Microbacterium sp.* (strain BXGe71). *J. Hazard. Mater.*
- 1099 Szymańska S, Płociniczak T, Piotrowska-Seget Z, Złoch M, Ruppel S, Hryniewicz K,
1100 Clemens S, Ma JF (2016) Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop
1101 Plants and Foods. *Microbiol Res* 182:68–79. [https://doi:10.1146/annurev-arplant-](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112301)
1102 [043015-112301. https://doi: 10.1099/ijs.0.016949-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0)
- 1103 Tchounwou PB, Ayensu WK, Ninashvili N, Sutton D (2003) Environmental exposure to
1104 mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol.* 18:
1105 149–175. [https://doi: 10.1002/tox.10116](https://doi.org/10.1002/tox.10116)
- 1106 Tindall BJ, Rosselló-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P (2010) Notes on the
1107 characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of*

- 1108 Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(1), 249-266. <https://doi:>
1109 10.1099/ijs.0.016949-0
- 1110 Thijs S, Sillen W, Weyens N, Vangronsveld J (2017) Phytoremediation: State-of-the-art and
1111 a key role for the plant microbiome in future trends and research prospects. *Int J*
1112 *Phytoremediation* 19:23–38. <https://doi:10.1080/15226514.2016.121607>
- 1113 Uang CH, Hien MC, In KL (2010) Bacterial Mercury Resistance of TnMER11 and Its ' ,
1114 Application in Bioremediation. *Interdiscip Stud Environ Chem* 23–29. <https://doi:>
1115 10.1007/s00253-018-8847-2
- 1116 Veiga MM, Meech JÁ, Onate N (1994). Mercury pollution from deforestation. *Nature*, 368:
1117 816-817.
- 1118 Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in
1119 eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*,
1120 19(24), 6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- 1121 Wales AD, Davies RH (2015) Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy
1122 metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4(4), 567-604.
1123 <https://doi:10.3390/antibiotics4040567>
- 1124 Wang X, He Z, Luo H, Zhang M, Zhang D, Pan X, Gadd GM (2018) Multiple-pathway
1125 remediation of mercury contamination by a versatile selenite-reducing bacterium. *Sci*
1126 *Total Environ* 615:615–623. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.336>
- 1127 Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X, Chen Y (2007) The influence of soil heavy metals
1128 pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near
1129 a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:75–81. <https://doi:>
1130 10.1016/j.ecoenv.2006.03.007
- 1131 Wang, W., Deng, Z., Tan, H., & Cao, L. (2013). Effects of Cd, Pb, Zn, Cu-resistant
1132 endophytic *Enterobacter* sp. CBSB1 and *Rhodotorula* sp. CBSB79 on the growth and
1133 phytoextraction of Brassica plants in multimetal contaminated soils. *International*

- 1134 journal of phytoremediation, 15(5), 488-497.
1135 <https://dx.doi.org/10.1080/15226514.2012.716101>
- 1136 Yu Z, Li J, Li Y, Wang Q, Zhai X, Wu G, Liu P, Li X (2014) A mer operon confers mercury
1137 reduction in a *Staphylococcus epidermidis* strain isolated from Lanzhou reach of the
1138 Yellow River. *Int Biodeterior Biodegrad* 90:57–63. [https://doi:](https://doi:10.1016/j.ibiod.2014.02.002)
1139 [10.1016/j.ibiod.2014.02.002](https://doi:10.1016/j.ibiod.2014.02.002)
- 1140 Zak J, Willig M, Moorhead D, Wildman H (1994) Functional diversity of microbial
1141 communities: a quantitative approach. *Soil Biol Biochem* 26:1101–1108. [https:// doi:](https://doi:10.1016/0038-0717(94)90131-7)
1142 [10.1016/0038-0717\(94\)90131-7](https://doi:10.1016/0038-0717(94)90131-7)
- 1143 Zampieri BDB, Pinto AB, Schultz L, de Oliveira MA, de Oliveira AJFC (2016) Diversity
1144 and Distribution of Heavy Metal-Resistant Bacteria in Polluted Sediments of the Araçá
1145 Bay, São Sebastião (SP), and the Relationship Between Heavy Metals and Organic
1146 Matter Concentrations. *Microb Ecol* 72:582–594 .[https:// doi: 10.1007/s00248-016-](https://doi:10.1007/s00248-016-0821-x)
1147 [0821-x](https://doi:10.1007/s00248-016-0821-x)
- 1148 Zhao H, Xia B, Fan C, Zhao P, Shen S (2012) Human health risk from soil heavy metal
1149 contamination under different land uses near Dabaoshan Mine, Southern China. *Sci*
1150 *Total Environ* 417–418:45–54. [https:// doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.12.047](https://doi:10.1016/j.scitotenv.2011.12.047)
1151

Material Suplementar

O mercúrio altera estrutura e função de comunidades de rizobactérias e seleciona linhagens eficientes na biorremediação de Hg

Caylla Mariano¹, Ivani Mello¹, Breno Martins¹ William Pietro¹,
Gilvan Ferreira²; Ailton Terezo³, Marcos Soares¹

¹Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

² Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brasil

³Central Analítica de Combustíveis, Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

drmasoares@gmail.com

Fig. S1 Abundância Relativa de filos das comunidades

Fig. S2 Dendrograma de Dissimilaridade (Bray Curtis)

Fig. S3 Dendrograma de Dissimilaridade (Jaccard)

Fig. S4 Mapa de calor dos isolados e características de resistência

Tabela S1 Comunidade de bactérias rizosféricas isoladas de locais contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg) pelos métodos de plaqueamento (P) e enriquecimento (E) em meio de cultivo com (+LB) e sem mercúrio (-LB)

Tabela S2 Traços por linhagens isoladas

Tabela S3 Porcentagem de características funcionais da comunidade

Fig. S1

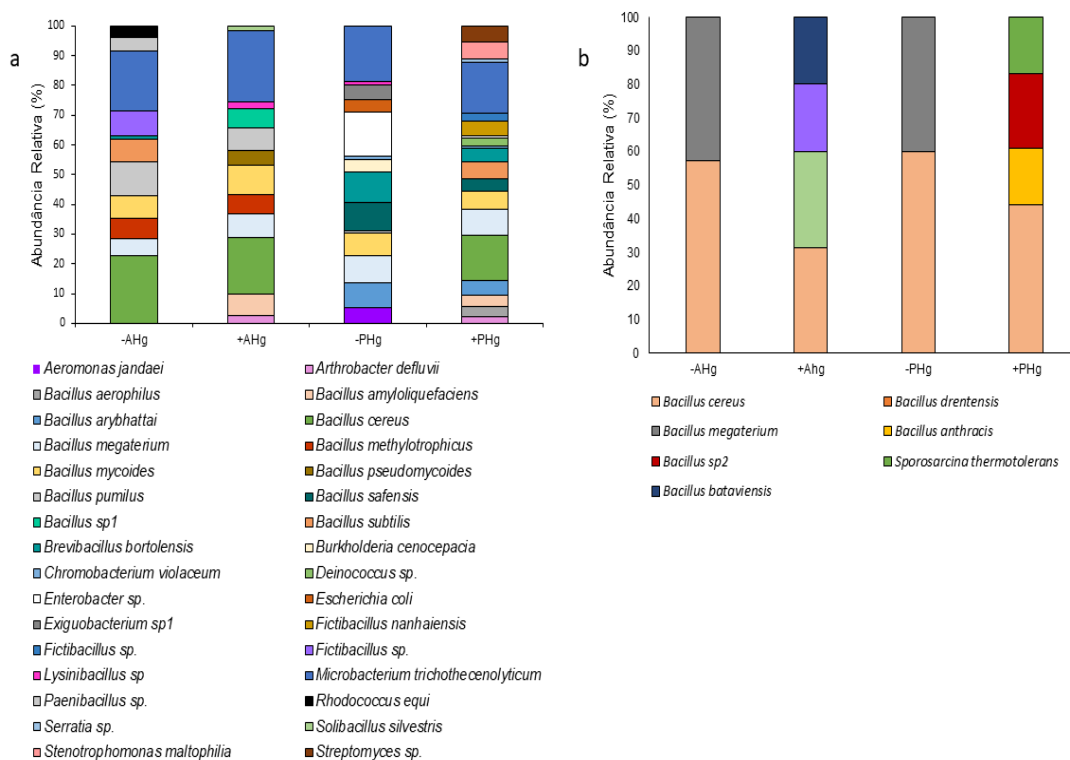


Fig. S1 Composição da comunidade de rizobactérias. Linhagens isoladas de *Aeschynomene fluminensis* e *Polygonum acuminatum* de áreas contaminadas (+AHg e +PHg) e não contaminadas (-AHg e -PHg). Em meio de cultivo sem (-LB) e com Hg (+LB)

Fig. S2

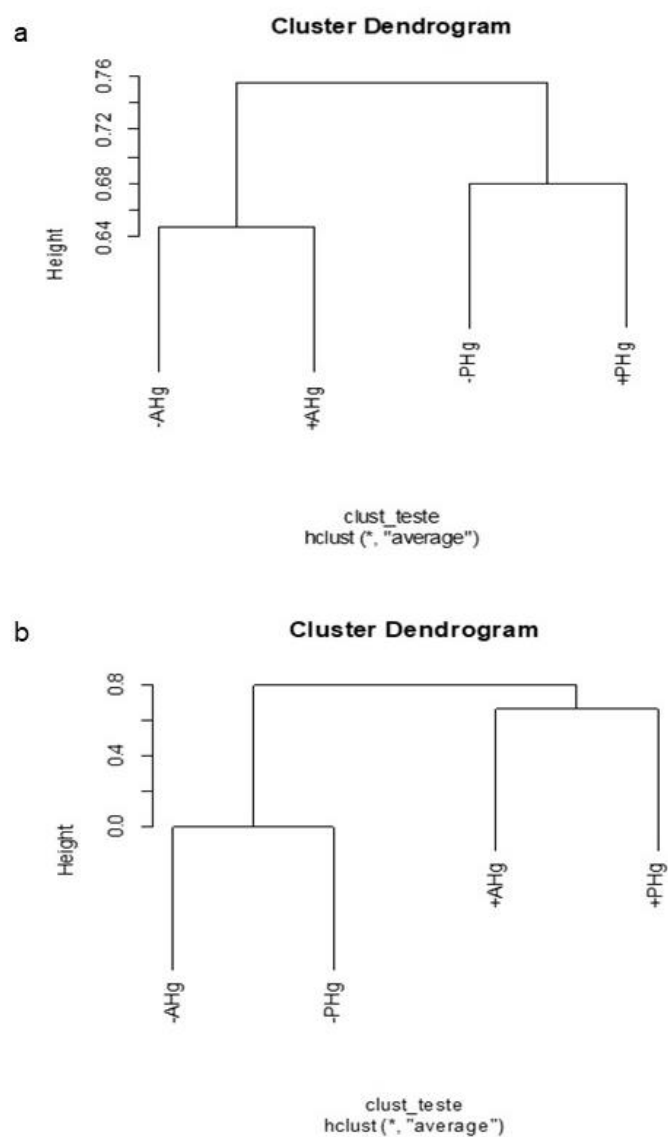


Fig. S2 Dendrograma de Dissimilaridade (Bray Curtis). Isolados de *Aeschynomene Fluminensis* e *Polygonum acuminatum* de áreas não contaminadas (-AHg e -PHg) e contaminadas (+ AHg e + PHg) por mercúrio. (A) -LB e (B) +LB

Fig. S3

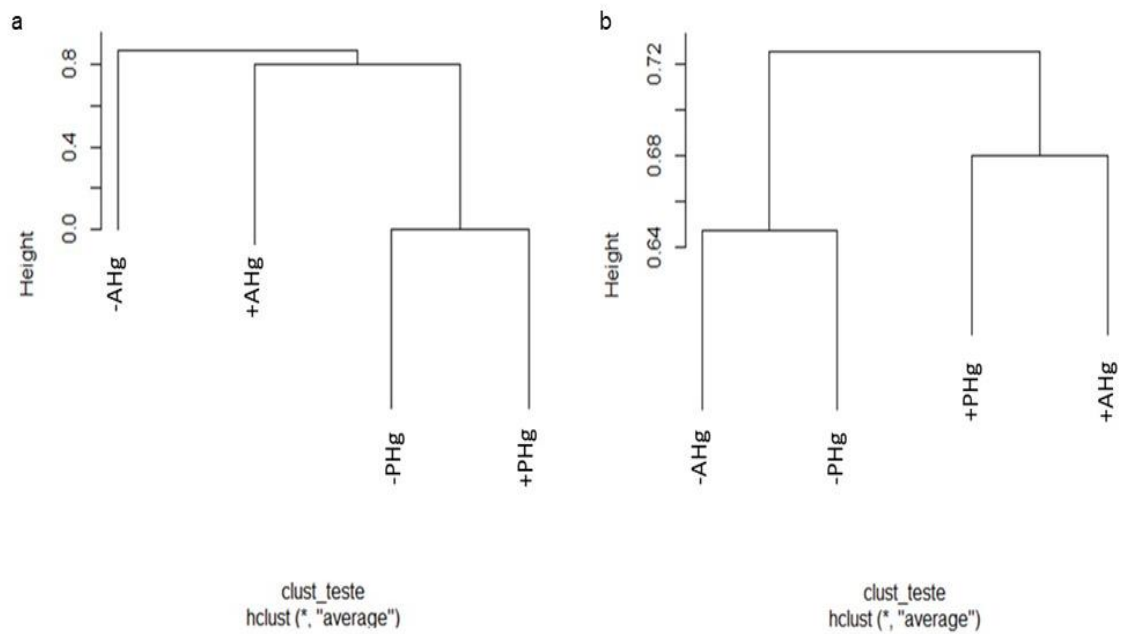


Fig. S3 Dendrograma de Dissimilaridade (Jaccard). Traços funcionais de *Aeschynomene fluminensis* e *Polygonum acuminatum* de áreas não contaminadas (-AHg e -PHg) e contaminadas (+AHg e +PHg) por mercúrio. Meio de cultivo (A) -LB e (B) +LB

Tabela S1 Comunidade de bactérias rizosféricas isoladas de locais contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg) e traços funcionais

Espécie	Local	^aMET	Placa	^cAmi	^dCel	^eFos	^fEst	^gPro	^hSid	ⁱAmo	<i>merA</i>	AIA	Plasmidio
<i>Bacillus cereus</i> _C27	-AHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus megaterium</i> _C68	-AHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus methylotrophicus</i> _C69	-AHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus mycoides</i> _C2	-AHg	P	-LB	-	+	+	+	+++	-	+	-	+	-
<i>Bacillus pumilus</i> _C39	-AHg	P	-LB	+	+	-	-	+++	+	+	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> _C40	-AHg	P	-LB	-	-	-	+	++	+	+	-	+	-
<i>Brevibacillus bortolensis</i> _C41	-AHg	P	-LB	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Fictibacillus sp1.</i> _C42	-AHg	P	-LB	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i> _C88	-AHg	P	-LB	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Paenibacillus sp.</i> _C49	-AHg	P	-LB	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Rhodococcus equi</i> _C65	-AHg	P	-LB	-	-	+	-	++	-	+	-	+	+
<i>Arthrobacter defluvii</i> _C89	+AHg	P	-LB	+	-	-	-	++	-	+	+	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> _C13	+AHg	P	-LB	-	-	-	-	+++	-	+	-	+	+
<i>Bacillus cereus</i> _C29	+AHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Bacillus megaterium</i> _C9	+AHg	P	-LB	+	-	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Bacillus methylotrophicus</i> _C87	+AHg	P	-LB	-	-	-	-	+++	-	-	-	+	-
<i>Bacillus mycoides</i> _C38	+AHg	P	-LB	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>Bacillus pseudomycooides</i> _C5	+AHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus pumilus</i> _C43	+AHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus sp1.</i> _C21	+AHg	P	-LB	-	-	+	-	++	-	+	-	+	-
<i>Lysinibacillus sp.</i> _C44	+AHg	P	-LB	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i> _C86	+AHg	P	-LB	-	+	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Solibacillus silvestris</i> _C51	+AHg	P	-LB	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>Aeromonas jandaei</i> _C23	-PHg	P	-LB	+	+	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Bacillus arybhatai</i> _C24	-PHg	P	-LB	-	+	+	+	++	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i> _C7	-PHg	P	-LB	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Bacillus megaterium</i> _C28	-PHg	P	-LB	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-

<i>Bacillus mycoides_C1</i>	-PHg	P	-LB	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus pumilus_C25</i>	-PHg	P	-LB	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>Bacillus safensis_C55</i>	-PHg	P	-LB	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Brevibacillus bortolensis_C15</i>	-PHg	P	-LB	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Burkholderia cenocepacia_C14</i>	-PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Chromobacterium violaceum_C3</i>	-PHg	P	-LB	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Enterobacter sp._C35</i>	-PHg	P	-LB	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>Escherichia coli_C33</i>	-PHg	P	-LB	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Exiguobacterium sp1._C31</i>	-PHg	P	-LB	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Lysinibacillus sp._C8</i>	-PHg	P	-LB	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Microbacterium Trichothecenolyticum_C85</i>	-PHg	P	-LB	+	+	+	+	++	-	+	-	+	-
<i>Arthrobacter defluvii_C11</i>	+PHg	P	-LB	+	+	+	-	++	-	+	-	+	+
<i>Bacillus aerophilus_C57</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens_C53</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Bacillus arybhatai_C54</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Bacillus megaterium_C20</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	+	+++	-	+	-	+	+
<i>Bacillus mycoides_C16</i>	+PHg	P	-LB	-	+	+	+	++	+	+	-	+	+
<i>Bacillus safensis_C32</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis_C10</i>	+PHg	P	-LB	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>Brevibacillus bortolensis_C36</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Chromobacterium violaceum_C4</i>	+PHg	P	-LB	-	+	+	-	+++	+	-	-	+	+
<i>Deinococcus sp._C6</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Enterobacter sp._C70</i>	+PHg	P	-LB	-	+	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Fictibacillus nanhaiensis_C52</i>	+PHg	P	-LB	+	-	-	-	++	-	+	-	+	-
<i>Fictibacillus sp._C59</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Microbacterium trichotecenolyticum_C34</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	++	-	+	-	+	+
<i>Serratia sp._C17</i>	+PHg	P	-LB	+	-	-	-	++	-	+	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia_C62</i>	+PHg	P	-LB	+	-	-	-	+++	-	-	-	+	+
<i>Streptomyces sp._C47</i>	+PHg	P	-LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus_C40</i>	-AHg	P	+LB	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+

<i>Bacillus megaterium_C58</i>	-AHg	P	+LB	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sporosarcina thermotolerans_C37</i>	+AHg	P	+LB	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>Bacillus bataviensis_C81</i>	+AHg	P	+LB	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Bacillus cereus_C12</i>	+AHg	P	+LB	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus drentensis_C21</i>	+AHg	P	+LB	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Bacillus cereus_C75</i>	-PHg	P	+LB	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus megaterium_C76</i>	-PHg	P	+LB	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus anthracis_C77</i>	+PHg	P	+LB	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Bacillus cereus_C78</i>	+PHg	P	+LB	-	+	-	-	++	+	+	-	-	-
<i>Bacillus sp2_C79</i>	+PHg	P	+LB	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Sporosarcina thermotolerans_C81</i>	+PHg	P	+LB	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Bacillus cereus_C101</i>	+AHg	E	+LB	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>Bacillus anthracis_C92</i>	+AHg	E	+LB	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>Rhodococcus aetheviorans_C98</i>	+PHg	E	+LB	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-

^aMET: Método de isolamento: (P) Plaquamento e (E) Enriquecimento

^bMIC: Concentração mínima inibitória

^cAmi: amilase

^dCel: celulase

^eFos: solubilização de fosfato

^fEst: esterase

^gPro: protease

^hSid: produção de sideróforos

ⁱAmo: produção de amônia

Tabela S2 Multirresistência a antibióticos e metais das linhagens isoladas de locais contaminados (+AHg e +PHg) e não contaminados (-AHg e -PHg)

Espécie	Local	Antibióticos										Metais			MIC			
		CAZ (30 µg)	CFL (30 µg)	CFO (30 µg)	CPM (30 µg)	IPM (10 µg)	MER (10 µg)	OXA (1 µg)	PEN (10 µg)	POL (300 µg)	PPT (110 µg)	SUT (25 µg)	Cd ²⁺	Pb ²⁺		Zn ²⁺		
<i>Bacillus cereus</i> _C27	-AHg	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	125
<i>Bacillus megaterium</i> _C68	-AHg	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	125
<i>Bacillus methylophilus</i> _C69	-AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0
<i>Bacillus mycoides</i> _C2	-AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	0
<i>Bacillus pumilus</i> _C39	-AHg	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	62.5
<i>Bacillus subtilis</i> _C40	-AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	31.25
<i>Brevibacillus bortolensis</i> _C41	-AHg	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	0
<i>Fictibacillus sp1.</i> _C42	-AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	31.25
<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i> _C88	-AHg	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	0
<i>Paenibacillus sp.</i> _C49	-AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0
<i>Rhodococcus equi</i> _C65	-AHg	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	62.5
<i>Arthrobacter defluvii</i> _C89	+AHg	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	31.25
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> _C13	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	31.25
<i>Bacillus cereus</i> _C29	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0
<i>Bacillus megaterium</i> _C9	+AHg	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	125
<i>Bacillus methylophilus</i> _C87	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62.5
<i>Bacillus mycoides</i> _C38	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	125
<i>Bacillus pseudomycooides</i> _C5	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31.25
<i>Bacillus pumilus</i> _C43	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Bacillus sp1.</i> _C21	+AHg	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	31.25
<i>Lysinibacillus sp.</i> _C44	+AHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	62.5
<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i> _C86	+AHg	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	125
<i>Solibacillus silvestris</i> _C51	+AHg	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	125
<i>Aeromonas jandaei</i> _C23	-PHg	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	125
<i>Bacillus aryabhatai</i> _C24	-PHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Bacillus cereus</i> _C7	-PHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Bacillus megaterium</i> _C28	-PHg	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	125
<i>Bacillus mycoides</i> _C1	-PHg	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	125
<i>Bacillus pumilus</i> _C25	-PHg	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	62.5
<i>Bacillus safensis</i> _C55	-PHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62.5
<i>Brevibacillus bortolensis</i> _C15	-PHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	62.5
<i>Burkholderia cepacia</i> _C14	-PHg	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	0
<i>Chromobacterium violaceum</i> _C3	-PHg	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	0
<i>Enterobacter sp.</i> _C35	-PHg	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	125
<i>Escherichia coli</i> _C33	-PHg	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	62.5
<i>Exiguobacterium sp1.</i> _C31	-PHg	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	125
<i>Lysinibacillus sp.</i> _C8	-PHg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>Microbacterium Trichothecenolyticum</i> _C85	-PHg	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	250

Plant and Soil - ISSN: 0032-079X (versão impressa) ISSN: 1573-5036 (versão eletrônica)

Instruções para os autores

Submissão de manuscrito

A submissão de um manuscrito implica: que o trabalho descrito não tenha sido publicado antes; que não está sob consideração para publicação em nenhum outro lugar; que sua publicação foi aprovada por todos os coautores, se houver, bem como pelas autoridades responsáveis - tacitamente ou explicitamente - no instituto onde o trabalho foi realizado. O editor não será considerado legalmente responsável por eventuais reclamações de compensação.

Permissões

Os autores que desejarem incluir figuras, tabelas ou passagens de texto que já tenham sido publicadas em outro local deverão obter permissão do proprietário dos direitos autorais para o formato impresso e on-line e incluir provas de que tal permissão foi concedida ao enviar seus artigos. Qualquer material recebido sem tal evidência será assumido como originário dos autores.

Submissão Online

Por favor, siga o hiperlink “Submit online” à direita e faça o upload de todos os seus arquivos manuscritos seguindo as instruções dadas na tela.

Época da publicação

O Editor-Chefe atribui manuscritos a um Editor de Seção, que toma a decisão editorial final com base no parecer de pelo menos dois revisores independentes. Os manuscritos serão revisados dentro de 2 meses após a submissão e publicados dentro de 4 meses após a aceitação final. Quando os trabalhos são aceitos sujeitos a revisão, geralmente apenas uma única versão revisada será considerada, e o manuscrito revisado deve ser submetido dentro de 8 semanas da aceitação em princípio.

Padrões internacionais para autores

Plant e Soil endossa a seguinte declaração de posicionamento sobre padrões internacionais para autores, desenvolvida na 2ª Conferência Mundial sobre a Integridade.

da Pesquisa em Cingapura, em julho de 2010, e publicada no site da Comissão de Ética de Publicação.

Revisão de pré-submissão

Plant e Soil exige que todos os manuscritos sejam “revisados internamente” antes de serem enviados por terceiros da própria instituição do autor ou de outra instituição (observe que isso exclui co-autores e editores de inglês). Durante a submissão on-line de seu manuscrito, os autores serão solicitados a nomear este terceiro. Qualquer manuscrito que não atender a este requisito não será considerado para publicação e devolvido ao autor.

Carta de apresentação

Os autores devem enviar uma carta de apresentação com seu manuscrito, descrevendo como o manuscrito submetido se enquadra no âmbito da planta e do solo e, em particular, como o estudo melhora nossa compreensão mecanicista das interações planta-solo. Qualquer outra informação dos autores ao Editor-Chefe deve também ser incluída nesta carta.

Fotografia de capa

Após a aceitação do manuscrito, aconselhamos o autor a fornecer à revista uma fotografia colorida de alta resolução para acompanhar o título do artigo no conteúdo da revista on-line. A melhor fotografia entre os trabalhos de cada volume será apresentada na capa e no artigo da versão impressa de Plant e Soil, gratuitamente. Idealmente, as fotografias digitais devem ter uma resolução mínima de 300 dpi, um tamanho de imagem de 15 cm x 10 cm e salvas como arquivo tiff ou jpeg.

Folha de rosto

A página de título deve incluir:

O nome do (s) autor (es)

Um título conciso e informativo

A (s) afiliação (ões) e endereço (s) do (s) autor (es)

O endereço de e-mail, números de telefone e fax do autor correspondente

Abstrato

O resumo não deve exceder 200 palavras e deve ser dividido nas seguintes seções:

1. Objetivos (indicando os principais objetivos e questões de pesquisa)
2. Métodos

3. Resultados (indicando os principais resultados)

4. Conclusões

Para revisões e comentários, as seções de resumo podem ser alteradas para: Background, Scope e Conclusions.

O resumo não deve conter abreviações indefinidas ou referências não especificadas.

Artigos Regulares devem ser divididos nas seguintes seções:

- Resumo
- Abreviaturas
- Introdução
- Materiais e Métodos
- Resultados
- discussão
- Agradecimentos
- Referências
- Palavras-chave

Por favor, forneça 4 a 6 palavras-chave que podem ser usadas para fins de indexação.

Os manuscritos devem ser enviados no Word.

- Use uma fonte normal e simples (por exemplo, Times Roman de 10 pontos) para o texto.
- Use itálico para ênfase.
- Use a função de numeração automática de páginas para numerar as páginas.
- Não use funções de campo.
- Use paradas de tabulação ou outros comandos para recuos, não a barra de espaço.
- Use a função de tabela, não planilhas, para criar tabelas.
- Use o editor de equações ou MathType para equações.
- Salve seu arquivo no formato docx (Word 2007 ou superior) ou no formato doc (versões mais antigas do Word).

Cabeçalhos

Por favor, não use mais do que três níveis de títulos exibidos.

Abreviaturas

Abreviaturas devem ser definidas na primeira menção e usadas consistentemente a partir de então.

Notas de rodapé

Notas de rodapé podem ser usadas para fornecer informações adicionais, que podem incluir a citação de uma referência incluída na lista de referências. Eles não devem consistir apenas em uma citação de referência e nunca devem incluir os detalhes bibliográficos de uma referência. Eles também não devem conter figuras ou tabelas.

Notas de rodapé para o texto são numeradas consecutivamente; aqueles para tabelas devem ser indicados por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos). As notas de rodapé do título ou os autores do artigo não recebem símbolos de referência.

Sempre use notas de rodapé em vez de notas de fim.

Agradecimentos

Agradecimentos de pessoas, subsídios, fundos, etc. devem ser colocados em uma seção separada na página de título. Os nomes das organizações de financiamento devem ser escritos por extenso.

Numeração de linhas

A numeração de linhas deve ser usada em todo o manuscrito.

Nomes científicos, unidades e símbolos

O (s) nome (s) latino (s), assim como a autoridade (e, quando apropriado, cultivar precedido por cv.) Das espécies investigadas devem ser mencionadas tanto no Resumo quanto nos Materiais e Métodos. Nomes de gêneros e espécies em latim devem ser colocados em itálico. Somente unidades SI devem ser usadas.

Para conteúdo mineral, os elementos (P, N, K, etc.) devem ser usados.

Os isótopos devem ser indicados como ^{14}C , ^{32}P , etc.

Os íons devem ser mencionados como H^+ , Mg^{2+} , etc.

Para concentração molar, itálico M deve ser usado.

Citação

Cite referências no texto em ordem alfabética primeiro, e ordem cronológica em segundo.

Alguns exemplos:

1. A pesquisa de negociação abrange muitas disciplinas (Thompson, 1990).
2. Esse resultado foi posteriormente contradito por Becker e Seligman (1996).
3. Este efeito tem sido amplamente estudado (Abbott 2002; Barakat et al., 1995a, b; Kelso e Smith, 1990; Medvec et al., 1999, 2000).

Lista de referência

A lista de referências deve incluir apenas trabalhos que são citados no texto e que foram publicados ou aceitos para publicação. Comunicações pessoais e obras inéditas só devem ser mencionadas no texto. Não use notas de rodapé ou notas de fim como substituto de uma lista de referências.

As entradas da lista de referências devem ser alfabetizadas pelos sobrenomes do primeiro autor de cada trabalho.

- Artigo de jornal

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L. (2009) Efeito do treinamento intermitente de alta intensidade na variabilidade da frequência cardíaca em crianças pré-púberes. *Eur J Appl Physiol* 105: 731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Idealmente, os nomes de todos os autores devem ser fornecidos, mas o uso de “et al” em longas listas de autores também será aceito:

Smith J, Jr Jones M, Houghton L et al (1999) Futuro do seguro de saúde. *N Engl J Med* 965: 325-329

- Artigo por DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Implicações clínicas da produção desregulada de citocinas. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Livro

South J, Blass B (2001) O futuro da genômica moderna. Blackwell, Londres

- Capítulo de livro

Brown B, Aaron M (2001) A política da natureza. In: Smith J (ed) O surgimento da moderna genômica, 3rd edn. Wiley, Nova York, pp 230-257

- Documento on-line

Doe J (1999) Título do documento subordinado. In: O dicionário de substâncias e seus efeitos. Sociedade Real de Química. Disponível via DIALOG.<http://www.rsc.org/dose/title> de documento subordinado.

Acessado em 15 jan 1999

- Todas as tabelas devem ser numeradas usando algarismos arábicos.
- As tabelas devem sempre ser citadas em texto em ordem numérica consecutiva.
- Para cada tabela, forneça uma legenda da tabela (título) explicando os componentes da tabela.
- Identifique qualquer material publicado anteriormente, fornecendo a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.

As notas de rodapé das tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídas abaixo do corpo da tabela.

[Submissão Eletrônica de Figuras](#)

Forneça todas as figuras eletronicamente.

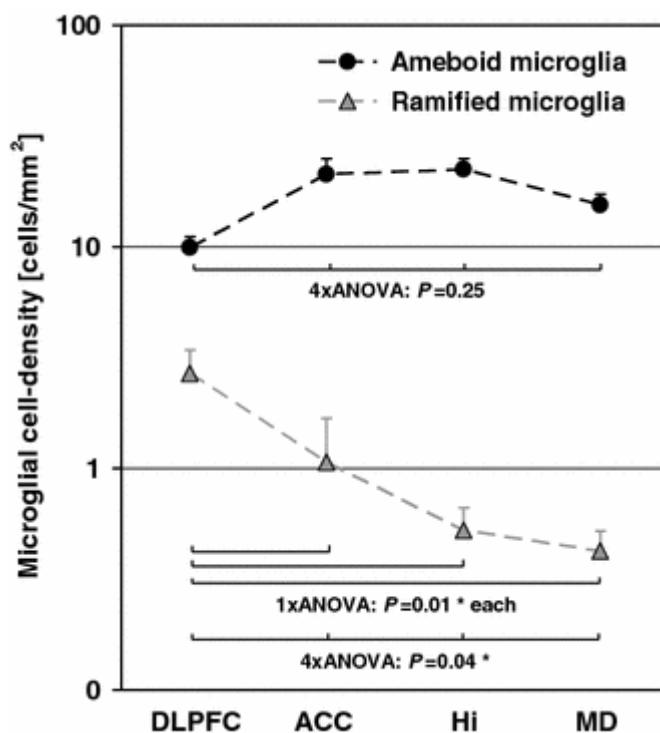
Indique qual programa gráfico foi usado para criar o trabalho artístico.

Para gráficos vetoriais, o formato preferido é EPS; para meios-tons, use o formato TIFF. Arquivos MSOffice também são aceitáveis.

Gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.

Nomeie seus arquivos de figura com "Fig" e o número da figura, por exemplo, Fig1.eps.

[Arte de linha](#)



Definição: Gráfico preto e branco sem sombreado.

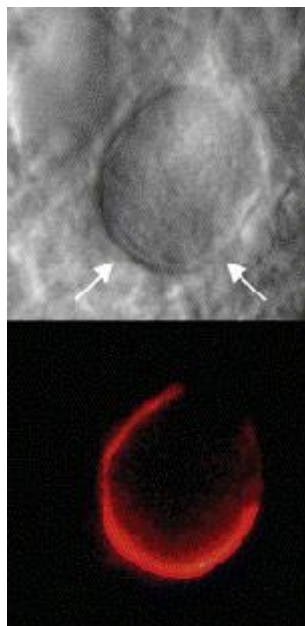
Não use linhas fracas e / ou letras e verifique se todas as linhas e letras dentro das figuras são legíveis no tamanho final.

Todas as linhas devem ter pelo menos 0,1 mm (0,3 pt) de largura.

Os desenhos de linhas e desenhos de linha digitalizados no formato de bitmap devem ter uma resolução mínima de 1200 dpi.

Gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.

Arte de meio-tom

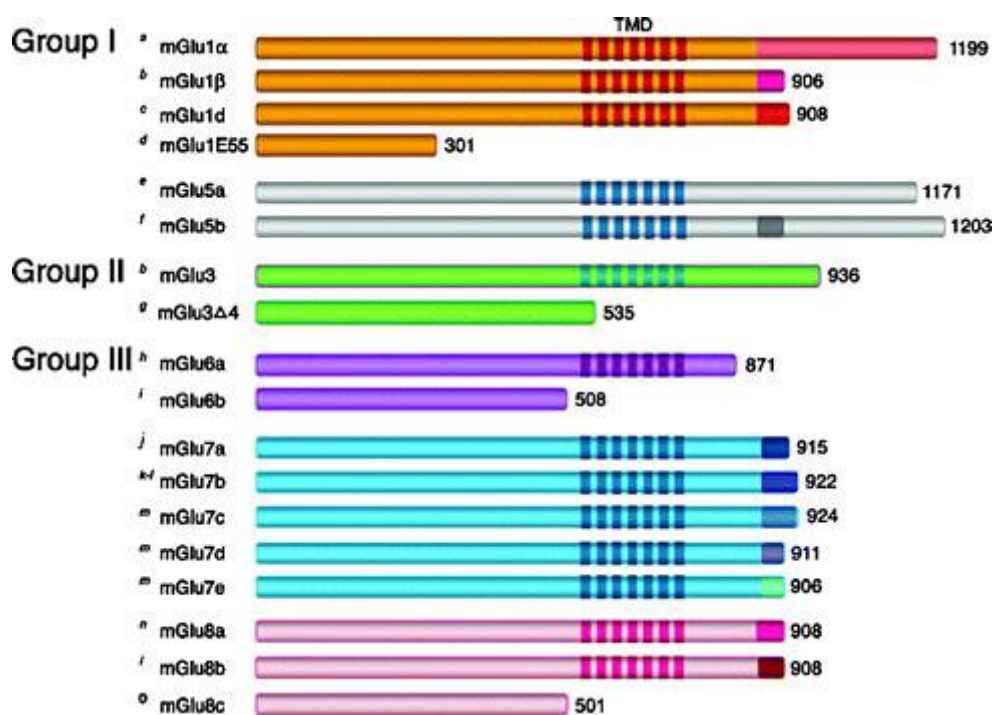


Definição: Fotografias, desenhos ou pinturas com bom sombreamento, etc.

Se alguma ampliação for usada nas fotografias, indique isso usando barras de escala dentro das próprias figuras.

Meios-tons devem ter uma resolução mínima de 300 dpi.

Arte Combinada



Definição: uma combinação de meio-tom e arte de linha, por exemplo, meios-tons contendo linhas, letras extensas, diagramas de cores, etc.

A arte combinada deve ter uma resolução mínima de 600 dpi.

Arte da cor

A arte da cor é gratuita para publicação online.

Se aparecer preto e branco na versão impressa, certifique-se de que as informações principais ainda estarão visíveis. Muitas cores não são distinguíveis umas das outras quando convertidas para preto e branco. Uma maneira simples de verificar isso é fazer uma cópia xerográfica para ver se as distinções necessárias entre as diferentes cores ainda são aparentes. Se as figuras forem impressas em preto e branco, não se refira à cor nas legendas.

As ilustrações coloridas devem ser enviadas como RGB (8 bits por canal).

Figura Lettering

Para adicionar letras, é melhor usar Helvetica ou Arial (fontes sem serifa).

Mantenha as letras consistentemente dimensionadas em toda a sua arte final, geralmente de 2 a 3 mm (8 a 12 pt).

A variação do tamanho do tipo dentro de uma ilustração deve ser mínima, por exemplo, não use o tipo 8-pt em um eixo e o tipo 20-pt para a etiqueta do eixo.

Evite efeitos como sombreamento, letras de contorno, etc.

Não inclua títulos ou legendas nas suas ilustrações.

Numeração de Figuras

Todas as figuras devem ser numeradas usando algarismos arábicos.

As figuras devem ser sempre citadas em texto em ordem numérica consecutiva.

As partes da figura devem ser indicadas por letras minúsculas (a, b, c, etc.).

Se um apêndice aparecer em seu artigo e contiver uma ou mais figuras, continue a numeração consecutiva do texto principal. Não numerar as figuras do apêndice,

"A1, A2, A3, etc." Os números em apêndices on-line (material suplementar eletrônico) devem, no entanto, ser numerados separadamente.

Legenda das figuras

Cada figura deve ter uma legenda concisa descrevendo com precisão o que a figura descreve.

Inclua as legendas no arquivo de texto do manuscrito, não no arquivo de figura.

As legendas das figuras começam com o termo Fig. Em negrito, seguido pelo número da figura, também em negrito.

Nenhuma pontuação deve ser incluída após o número, nem qualquer pontuação deve ser colocada no final da legenda.

Identifique todos os elementos encontrados na figura na legenda da figura; e use caixas, círculos, etc., como pontos de coordenadas em gráficos.

Identifique o material publicado anteriormente, dando a fonte original na forma de uma citação de referência no final da legenda da figura.

Figura de colocação e tamanho

As figuras devem ser enviadas separadamente do texto, se possível.

Ao preparar suas figuras, dimensione as figuras para ajustá-las na largura da coluna.

Para a maioria dos periódicos, os números devem ter 39 mm, 84 mm, 129 mm ou 174 mm de largura e não mais de 234 mm.

Para livros e revistas do tamanho de livros, os números devem ter 80 mm ou 122 mm de largura e não mais de 198 mm.

Permissões

Se você incluir figuras que já foram publicadas em outro lugar, deverá obter permissão do (s) proprietário (s) dos direitos autorais para o formato impresso e on-line. Esteja ciente de que alguns editores não concedem direitos eletrônicos de graça e que a Springer não poderá reembolsar quaisquer custos que possam ter ocorrido para receber essas permissões. Em tais casos, material de outras fontes deve ser usado.

Acessibilidade

A fim de dar às pessoas de todas as habilidades e incapacidades acesso ao conteúdo de suas figuras, certifique-se de que

Todas as figuras têm legendas descritivas (usuários cegos poderiam então usar um software de texto para fala ou um hardware de texto para Braille)

Os padrões são usados em vez de ou em adição às cores para transmitir informações (usuários daltônicos poderiam então distinguir os elementos visuais)

Qualquer figura de figura tem uma taxa de contraste de pelo menos 4,5: 1

Springer aceita arquivos multimídia eletrônicos (animações, filmes, áudio, etc.) e outros arquivos suplementares para serem publicados on-line, juntamente com um artigo ou capítulo

de um livro. Esse recurso pode adicionar dimensão ao artigo do autor, pois certas informações não podem ser impressas ou são mais convenientes em formato eletrônico.

Antes de enviar conjuntos de dados de pesquisa como material suplementar eletrônico, os autores devem ler a política de dados de pesquisa da revista. Encorajamos os dados de pesquisa a serem arquivados nos repositórios de dados sempre que possível.

Submissão

Forneça todo o material suplementar em formatos de arquivo padrão.

Por favor, inclua em cada arquivo as seguintes informações: título do artigo, nome do periódico, nomes dos autores; afiliação e endereço de e-mail do autor correspondente.

Para acomodar downloads de usuários, lembre-se de que arquivos de tamanho maior podem exigir tempos de download muito longos e que alguns usuários podem ter outros problemas durante o download.

Áudio, Vídeo e Animações

Proporção: 16: 9 ou 4: 3

Tamanho máximo do arquivo: 25 GB

Duração mínima do vídeo: 1 seg

Formatos de arquivo suportados: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Texto e Apresentações

Envie seu material em formato PDF; Os arquivos .doc ou .ppt não são adequados para a viabilidade a longo prazo.

Uma coleção de figuras também pode ser combinada em um arquivo PDF.

Planilhas

As planilhas devem ser enviadas como arquivos .csv ou .xlsx (MS Excel).

Formatos Especializados

Formato especializado, como .pdb (químico), .wrl (VRML), .nb (caderno Mathematica) e .tex também podem ser fornecidos.

Coletando Múltiplos Arquivos

É possível coletar vários arquivos em um arquivo .zip ou .gz.

Numeração

Se estiver fornecendo material suplementar, o texto deve mencionar especificamente o material como uma citação, semelhante a figuras e tabelas.

Consulte os arquivos suplementares como "Recurso on-line", por exemplo, "... conforme mostrado na animação (Recurso on-line 3)", "... dados adicionais são fornecidos no Recurso on-line 4".

Nomeie os arquivos consecutivamente, por exemplo, "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Legendas

Para cada material suplementar, forneça uma legenda concisa descrevendo o conteúdo do arquivo.

Processamento de arquivos suplementares

Material suplementar eletrônico será publicado como recebido do autor sem qualquer conversão, edição ou reformatação.

Acessibilidade

Para permitir que pessoas com todas as habilidades e deficiências acessem o conteúdo de seus arquivos suplementares, certifique-se de que

O manuscrito contém uma legenda descritiva para cada material suplementar

Os arquivos de vídeo não contêm nada que pisque mais de três vezes por segundo (para que os usuários propensos a ataques causados por esses efeitos não sejam colocados em risco)