

Identificação molecular de microrganismos do solo da região oeste do Estado do Paraná

Molecular identification of soil microorganisms in the western region of the State of Paraná

RESUMO

Taynara Cassia Seratti
tayerattiel@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Thiago Cintra Maniglia
thiagomaniglia@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Ao mesmo tempo que o Brasil comemora liderança no setor do agronegócio, é um dos países que mais utiliza agrotóxicos. Uma das alternativas é o uso de bactérias que possam substituir o uso desses pesticidas. Nesse contexto, este trabalho consistiu na identificação molecular de espécies de microrganismos isolados anteriormente de amostras de solo da região da cidade de Toledo Paraná, esperando encontrar espécies de *Bacillus* com posterior aplicação biotecnológica. Dessa forma, dos 34 isolados, escolheu-se 13 com morfologias diferentes e realizou-se o procedimento de reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual foi amplificado o gene 16S, além de purificação das amostras amplificadas, eletroforese em gel de agarose, sequenciamento e análise das sequências nucleotídicas obtidas. Analisou-se a similaridade com bancos de dados genéticos do algoritmo Blast e encontrou-se que dos 13 isolados, 54% são pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, 23% ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, 15% apresentaram alta semelhança com *Bacillus megaterium* e 8% não foi possível classificar. Portanto, ao conhecer gênero e os grupos ou espécies as quais as amostras possivelmente pertencem, é possível ter uma noção das aplicações e direcionar as pesquisas em trabalhos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia. Prospecção. Biologia molecular.

ABSTRACT

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



At the same time that Brazil celebrates leadership in the agribusiness sector, it is one of the countries that most uses pesticides. One of the alternatives is the use of bacteria that can replace the use of these pesticides. In this context, this work consisted of the molecular identification of microorganism species previously isolated from soil samples in the region of the city of Toledo Paraná, hoping to find *Bacillus* species with later biotechnological application. Thus, of the 34 isolates, 13 were chosen with different morphologies and the polymerase chain reaction (PCR) procedure was performed, in which the 16S gene was amplified, in addition to purification of the amplified samples, electrophoresis in agarose gel, sequencing and analysis of the obtained nucleotide sequences. The similarity with genetic databases of the Blast algorithm was analyzed and it was found that of the 13 isolates, 54% belong to the *Bacillus subtilis sensu lato* group, 23% to the *Bacillus cereus sensu lato* group, 15% showed high similarity with *Bacillus megaterium* and 8% could not be classified. Therefore, by knowing the genus and the groups or species to which the samples possibly belong, it is possible to have an idea of the applications and direct the research in future works.

KEYWORDS: Biotechnology. Prospecction. Molecular biology.



INTRODUÇÃO

O Brasil tem aumentado significativamente sua produção agropecuária nos últimos anos, se tornando um grande exportador e participante ativo no comércio mundial de agronegócio, possuindo liderança mundial consolidada (SCOLARI, 2020).

Por outro lado, ao mesmo tempo que o país comemora a liderança no setor de agronegócio, segundo dados fornecidos pela Embrapa (2019), o Brasil é responsável por 1/5 do consumo mundial de agrotóxicos, para uso em controle de pragas, doenças e ervas daninhas.

O uso intenso de agrotóxicos no Brasil vem causando diversos problemas como a contaminação do solo, alimentos, água e animais, além de desequilíbrio biológico e resistência de pragas aos princípios ativos. Diante disso, tem aumentado a busca por alternativas que atendam às necessidades ambientais e dos consumidores (EMBRAPA, 2019).

Segundo Kaki (2013), algumas espécies de bactérias, já têm sido estudadas para essa finalidade, é o caso das bactérias do gênero *Bacillus*, o qual são capazes de produzir fungicidas biológicos, inseticidas e nematicidas. As espécies de *Bacillus* de acordo com Rabinovitch et al. (2015), são consideradas Gram positivas, aeróbias ou aeróbias facultativas e apresentam vantagens sobre outros gêneros devido a sua capacidade de produzir esporos em condições ambientais desfavoráveis, além de resistir a altas temperaturas. Pode-se citar como algumas dessas espécies que agem no controle biológico, *Bacillus thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. liqueniformis*.

Com o aumento do número de espécies com potencial de uso na agricultura nos últimos anos, aumentou-se também, a busca por técnicas moleculares capazes de detectar, identificar e caracterizar esses microrganismos (KONEMAN et al., 2001). As técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) são as mais utilizadas atualmente, principalmente, quando se trata de sequenciar o RNA ribossômico 16S, região em que apresenta sequências de nucleotídeos altamente conservadas e na qual é possível diferenciar espécies bacterianas (HAN, 2006).

Portanto, o presente trabalho consistiu na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento parcial do gene RNA ribossômico 16S de espécies de microrganismos isolados anteriormente de amostras de solo da região da cidade de Toledo – PR, esperando encontrar espécies de *Bacillus* com posterior aplicação biotecnológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Em um estudo anterior, obteve-se um total de 34 isolados de microrganismos do solo da região da cidade de Toledo – PR, através do protocolo de isolamento de *Bacillus*. Realizou-se a metodologia de coloração de Gram com os isolados, além de análise em microscópio óptico a fim de confirmar seu formato bacilo e extração de DNA.

Neste estudo, portanto, as análises foram realizadas com intuito de identificação molecular das espécies bacterianas.

Com o DNA dos isolados extraídos anteriormente, realizou-se a reação em cadeia da polimerase, na qual foi amplificado o gene 16S rRNA. Foi utilizado o par de primers universais R (5'CGGTTACCTTGTTACGACTT3') e F (5'AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG3'), os quais foram baseados na metodologia proposta por Chaitanya et al. (2013). A reação foi realizada em um volume final de 30 μ L, para isso, utilizou-se para cada amostra as concentrações finais recomendadas pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase, as quais são 1X tampão (PCR Buffer Mg^{2+} Plus), 0,2 mM de solução de dNTP (10 mM cada base), 0,5 μ M de cada um dos dois primers, 2,5 U de taq DNA polimerase, 7 μ L de DNA e 15,5 μ L de H_2O ultrapura. Os microtubos contendo a mistura foram levados à um termociclador, o qual teve suas condições de reação definidas de acordo com o gene a ser amplificado. De forma geral, o processo seguiu as seguintes etapas: 2 minutos à 95°C para que ocorra a desnaturação total do DNA, seguido de 35 ciclos compostos por desnaturação (95°C por 40 segundos), anelamento (51°C por 40 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto), além de um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C. O produto da reação foi mantido a 4°C até retirada do termociclador. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o uso.

Após realizar o procedimento de amplificação do gene 16S rRNA, as amostras foram purificadas. O procedimento consistiu em adicionar a quantidade de 1:1 de polietilenoglicol (PEG) e o produto de PCR em um microtubo. A solução foi homogeneizada, e posteriormente colocadas em banho-maria com temperatura de 37°C por 15 minutos. Em seguida, realizou-se uma centrifugação (12.000 rpm por 15 minutos) a fim de sedimentar os resíduos. O sobrenadante foi então retirado e adicionado ao tubo 125 μ L de etanol 80% gelado, centrifugou-se novamente por 5 minutos a 13.000 rpm. Retirou-se novamente o sobrenadante e repetiu-se o processo com etanol por 2 vezes. Por fim, o sobrenadante foi retirado removendo o máximo possível do etanol. Deixou-se secar em temperatura ambiente até que não restasse mais etanol no microtubo. O DNA foi ressuscitado em água milliQ em volume proporcional à concentração inicial do DNA.

Após a purificação do produto do PCR foi realizado o método de eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado a partir de 10 mL de TBE 10 \times seguido da adição de 90 mL de água destilada e 1 g de agarose. Em seguida, o preparo foi aquecido por aproximadamente 3 minutos e com a solução morna adicionou-se 10 μ L de SYBR *Safe* DNA. Posteriormente, 5 μ L de DNA juntamente com 1,5 μ L de *Loading Buffer* foi aplicado no gel de agarose. Aplicou-se também nos primeiros poços de cada linha, 5 μ L de *Ladder*, a fim de quantificar as amostras. A fonte elétrica da cuba de eletroforese foi programada em uma voltagem de 80V, corrente de 230 mA, 20 W e tempo de corrida definido em 60 minutos. Após a eletroforese foi realizado o registro fotográfico do gel em transiluminador de luz LED azul.

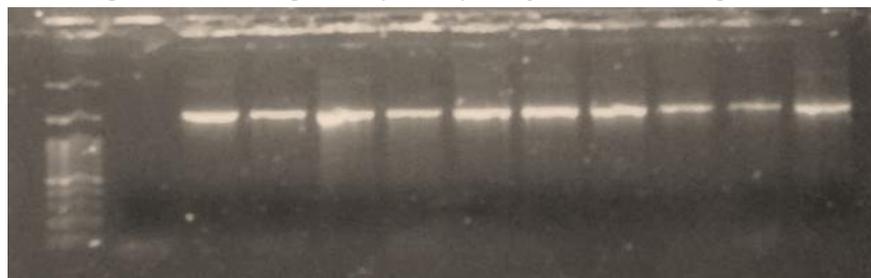
Em seguida, as amostras foram encaminhadas para uma empresa terceirizada que foi responsável pelo sequenciamento a partir do método de Sanger. As amostras continham uma quantidade do DNA amplificado e purificado entre 30 e 60 ng, juntamente com 5 mols do primer F, completando-se o volume para 6 μ L. As amostras foram desidratadas em estufa de secagem a 60°C e posteriormente enviadas via correio para a empresa responsável.

As sequências de DNA obtidas através do sequenciamento do gene *16S* foram analisadas através do alinhamento local de sequências de DNA utilizando-se a ferramenta *nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) para encontrar sequências similares à dos isolados. Realizou-se um alinhamento múltiplo de sequências através da ferramenta *Clustal Omega* disponível no site do EBI (*European Bioinformatics Institute*) por meio da utilização das sequências obtidas com as selecionadas no BLAST para devida correção de bases sequenciadas incorretamente. A correção dos eletroferogramas foi possível através da análise no programa *BioEdit*. Após a edição, as sequências foram analisadas novamente no BLAST para identificação molecular das espécies.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que já fora extraído o DNA dos isolados, prosseguiu-se com a amplificação do DNA na região *16S* de 13 dos 34 isolados. Através da análise das colônias obtidas após diluição, selecionou-se as morfologicamente diferentes, obtendo-se então, 13 amostras que representam as espécies presentes no solo. O gel de eletroforese com 10 dos 13 isolados após a amplificação do DNA, pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 – Gel de agarose após amplificação do DNA na região *16S*



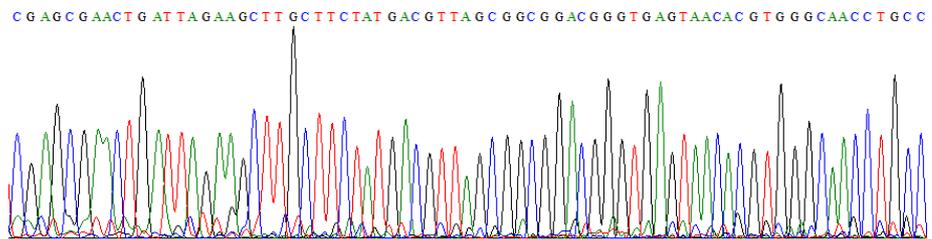
Fonte: Autoria própria (2020).

A partir da Figura 1, pode-se concluir que a amplificação do gene *16S* foi eficiente, uma vez que, o brilho e a espessura das bandas foram significativos. Além disso as bandas apresentam tamanho correspondentes ao da região desejada.

A análise da sequência nucleotídica do gene que codifica para RNA ribossômico *16S* é considerado um dos melhores métodos para a identificação de bactérias a nível de gênero e espécie. Essa região possui sequências de nucleotídeos altamente conservadas, intercaladas por sequências variáveis que permitem a identificação bacteriana (HAN, 2006).

Mediante sequenciamento das amostras, foi obtido o eletroferograma contendo os picos de captação de luz correspondentes as respectivas bases nucleotídicas das sequências do *16S*. A Figura 2 apresenta parte da sequência de uma das treze amostras.

Figura 2 – Resultado do sequenciamento parcial do gene 16S de uma das amostras estudadas



Fonte: Autoria própria (2020).

Após a edição das sequências e remoção das bases erradas no programa BioEdit, analisou-se a similaridade com sequências disponíveis em bancos de dados genéticos através do algoritmo Blast. Foi possível a identificação do gênero das 13 amostras, as quais todas pertencentes ao gênero *Bacillus*. No entanto, quando analisado a nível de espécies, a maioria das amostras apresentaram variações. Para fins de comparação no Blast, considerou-se apenas espécies cultiváveis e com cobertura de 100%.

A amostra 1 apresentou identidade de 99,89% com *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pacificus* e *B. paranthracis*. A amostra 2 teve 99,78% de similaridade com *Bacillus megaterium*. Já a amostra 3, apresentou 99,87% de identidade com *Bacillus siamensis*, 99,75% com *B. velezensis* e 99,62% com *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*. A amostra 4 apresentou 100% de identidade com *Bacillus megaterium*.

A quinta amostra apresentou 100% de similaridade com as espécies de *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* e *B. siamensis*. A 6 apresentou um percentual de 99,86% de identidade com *Bacillus amyloliquefaciens*, com *B. siamensis* e *B. subtilis*. Para a amostra 7, obteve-se 96,91% de similaridade com *Bacillus cereus*, *B. paramycoides*, *B. tropicus* e *B. wiedmannii*. Já a amostra 8 apresentou identidade de 98,62% com *Bacillus haynesii* e 98,48% com *B. licheniformis*.

A amostra 9 apresentou 100% de identidade com *Bacillus amyloliquefaciens*, mas em cobertura inferior se assemelhou em 100% também com *B. velezensis* e *B. siamensis*. A décima amostra apresentou 100% de similaridade com *Bacillus glycinifermentans* e 99,62% com *B. paralicheniformis*. A amostra 11, assemelhou-se 99,56% com *Bacillus amyloliquefaciens* e em 99,45% com *B. velezensis*. Já a amostra 12 apresentou 99,86% de identidade com *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. siamensis* e com *B. subtilis*. Por fim, a amostra 13 obteve identidade de 99,74% com *Bacillus cereus*, *B. wiedmannii*, *B. paramycoides* e *B. tropicus*.

O gênero *Bacillus* pode ser dividido em grandes grupos de espécies que apresentam alto grau de similaridade genética, estando portanto, estreitamente relacionadas através de seus táxons. O grupo do *Bacillus cereus* e o grupo do *Bacillus subtilis* são os mais estudados devido à grande importância médica, industrial e biotecnológica (SANTOS, 2018).

O grupo do *Bacillus cereus*, referido como *B. cereus sensu lato* compreendia até o ano de 2015, 12 espécies, sendo elas, o *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*, *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B.*

bingmayongensis e *B. wiedmannii* (LIU et al., 2015; MILLER et al., 2016). Aproximadamente dois anos depois, LIU et al. (2017), apresentaram uma proposta de inclusão de mais nove espécies intimamente relacionadas ao grupo *B. cereus sensu lato*: *Bacillus paranthracis*, *B. pacificus*, *B. tropicus*, *B. albus*, *B. mobilis*, *B. luti*, *B. proteolyticus*, *B. nitratireducens* e *B. paramycoides*. Dessa forma, é possível dizer que as amostras 1, 7 e 13 pertencem ao grupo do *Bacillus cereus*.

Já o grupo do *Bacillus subtilis* (*B. subtilis sensu lato*), compreende as espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. sonorensis*, *B. velezensis*, *B. axarquiensis*, *B. tequilensis*, *B. aerius*, *B. aerophilus*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis*, *B. safensis*, *B. methylotrophicus*, *B. siamensis*, *B. xiamenensis*, *B. vanillea*, *B. paralicheniformis*, *B. glycinifermentas*, *B. oryzicola*, *B. gobiensis* e *B. nakamurai* (SANTOS, 2018; FAN et al., 2017).

Dentro do grupo do *Bacillus subtilis*, é possível encontrar uma grande semelhança entre as espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* e *B. siamesis*. Essa estreita relação fez com que um novo grupo fosse criado dentro do grande complexo *B. subtilis*, o “grupo operacional *B. amyloliquefaciens*” (FAN et al., 2017).

Dessa maneira, as amostras 3, 5, 6, 9, 10, 11 e 12 podem ser consideradas pertencentes ao grupo do *Bacillus subtilis*. A amostra 8, apesar de ter alta similaridade com uma espécie membro do grupo *B. subtilis*, apresenta similaridade com uma espécie (*B. haynesii*) ainda não pertencente ao grupo, apesar de, através de análises filogenômicas ser comprovada a estreita relação com esse grupo (DUNLAP et al., 2017).

No entanto, as espécies pertencentes ao grupo do *B. cereus* como ao do *B. subtilis*, apresentam grande dificuldade de distinção quando baseadas somente na análise do gene 16S rDNA, o qual é falha na diferenciação de espécies devido à alta conservação de sequências nucleotídicas (FAN et al., 2017). Portanto, uma alternativa é realizar o sequenciamento de outros genes como 23S rDNA, 5S rDNA e *gyrB* (proteína girase) por exemplo, para conseguir diferenciar as espécies e chegar a uma conclusão confiável sobre a identidade específica de cada isolado (WANG et al., 2007).

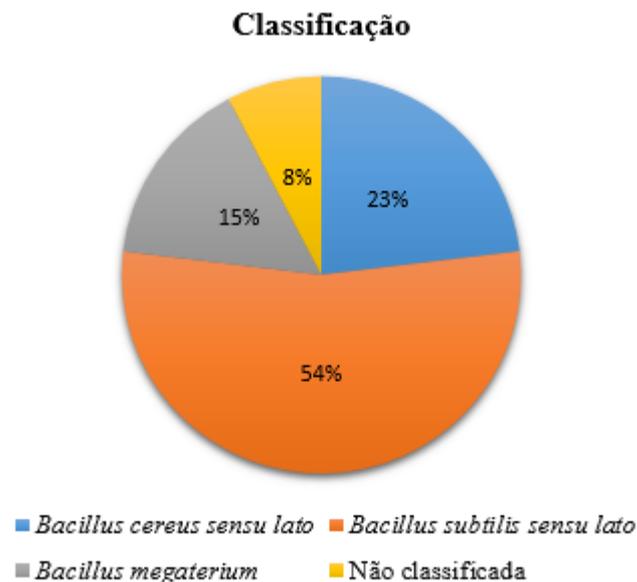
Quanto à aplicação biotecnológica, as espécies pertencentes ao grupo *B. cereus* são caracterizadas pela produção de endotoxinas, apresentando grande potencial ao controle biológico, diminuindo o emprego de inseticidas químicos (SANTOS, 2014).

Já o grupo *B. subtilis*, além de englobar espécies com características fungicidas e bactericidas, também tem grande aplicação na indústria devido à não patogenicidade contra seres humanos. As aplicações vão desde a produção de enzimas (proteases, amilases e celulases), fermentação de alimentos, até a formulação de bioinoculantes, uma vez que esse grupo apresenta grande potencial em promover o crescimento vegetal (SANTOS, 2014).

A amostra 2 e 4 apresentaram uma alta semelhança com *Bacillus megaterium*, essa espécie é caracterizada por ser capaz de sintetizar um poliéster natural que pode ser utilizado em embalagens por exemplo, além de ser muito utilizado na indústria para a produção de proteínas (α -amilases e β -amilases) e ser capaz de produzir compostos essenciais para a síntese de novos antibióticos a base de β -lactama (HASSEMER, 2016).

A classificação das amostras quanto ao grupo ou espécie pertencente pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 – Porcentagem de classificação das 13 amostras isoladas



Fonte: Autoria própria (2020).

Dessa forma, ao conhecer os grupos ou espécies as quais as amostras possivelmente pertencem, é possível direcioná-las para testes bioquímicos a serem realizados em um próximo trabalho.

CONCLUSÃO

Através da amplificação da região 16S e sequenciamento de 13 das 34 amostras isoladas, foi possível a identificação a nível de gênero desses microrganismos. Como a região 16S tem sequências de nucleotídeos altamente preservadas e a relação entre os grupos encontrados são muito próximas, não conseguiu-se a distinção a nível de espécie dos 13 isolados. E, em razão da pandemia do novo Coronavírus, não foi possível a análise de outros genes para confirmar a identificação das espécies.

No entanto, a partir dos grupos encontrados (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*), e de espécies como *B. megaterium* e *B. haynesii*, foi possível ter uma noção das diversas aplicações biotecnológicas que esse gênero possui, direcionando assim, as pesquisas a serem realizadas em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

CHAITANYA, K; NAGAMANI, P; SK, M. Production of exopolysaccharide and polyhydroxybutyrate by newly isolated *Bacillus* APO3 from industrial effluents. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 404-414, 2013.

DUNLAP, C. et al. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 2720-2725, 2017.

EMBRAPA. **Controle Biológico**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>. Acesso em: 22 mai. 2020.

FAN, B. et al. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 22, 2017.

HAN. Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. In: Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. **Springer**, Boston, MA, 2006.

HASSEMER, G. **Produção de P (3HB) por *Bacillus megaterium* utilizando permeado de Soro de Leite**. 2016. 80 f. (Dissertação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

KAKI, A. Biocontrol and Plant Growth Promotion Characterization of *Bacillus* Species Isolated from Calendula officinalis Rhizosphere. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 447-452, 2013.

KONEMAM, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medsi, 2001.

LIU, Y. et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **National Library of Medicine**. 2015.

LIU, Y. et al. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 2499-2508, 2017.

MILLER, R. et al. *Bacillus wiedmannii* sp. nov. is a new psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and environments in the USA. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, p. 4744-4753, 2016.

RABINOVITCH, L; OLIVEIRA, E. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. Instituto Oswaldo Cruz, 1.Ed, Rio de Janeiro, 2015.

SANTOS, J. **Seleção de estirpes de *Bacillus spp.* tóxicas a *Meloidogyne spp.* e promotoras de crescimento vegetal.** 2018. 121 p. (Dissertação) – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SCOLARI, D. **Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil.** Embrapa Informação Tecnológica. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/417182/1/Producaoagricolamundial.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2020.

WANG, L. et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, *16S* rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1846–1850, 2007.