



Identificação Molecular de Bactérias de Solo com Potencial Biotecnológico

MOLECULAR IDENTIFICATION OF SOIL BACTERIA WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

Lizandra da Costa Brasil Pontes*, Thiago Cintra Maniglia†.

RESUMO

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem inúmeras aplicações biotecnológicas. O intuito do presente trabalho foi realizar a bioprospecção através do isolamento e identificação molecular de bactérias do gênero *Bacillus* do solo. A princípio o experimento foi conduzido com a seleção de três isolados bacterianos (2AA, 2AC e 2AF), obtidos a partir de uma amostra de solo de plantio de milho da cidade de Toledo – Paraná. As amostras foram cultivadas em meio LB líquido por 48 horas e o DNA extraído por fervura. Posteriormente, ocorreu a análise do gene 16S rRNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Por fim, as amostras foram sequenciadas e analisadas. Os resultados das análises das sequências revelou similaridade de 100% entre as amostras 2AC e 2AF, apresentando identidade genética com espécies do grupo do *Bacillus subtilis* e o 2AA apresentou 100% de identidade genética com amostras de *Bacillus megaterium*. Com base nos resultados obtidos nesse trabalho é possível ter uma noção das diversas aplicações biotecnológicas das bactérias isoladas e podendo assim ser direcionado a pesquisas futuras.

Palavras-chave: Aplicações biotecnológicas, bioprospecção, 16S rRNA, *Bacillus*

ABSTRACT

Bacteria from *Bacillus* genus have numerous biotechnological applications. The aim of the present study was to carry out bioprospecting by isolation and molecular identification of *Bacillus* bacteria from soil. At first, the experiment was conducted with the selection of three bacterial isolates (2AA, 2AC e 2AF), obtained from soil sample of corn plantation in the city of Toledo – Paraná. The samples were cultivated in liquid LB medium for 48 hours conducted with the selection of three bacterial isolates (2AA, 2AC e 2AF), obtained from soil sample of corn plantation in the city of Toledo – Paraná. The samples were cultivated in liquid LB medium for 48 hours and the DNA extracted by boiling. Subsequently, the 16S rRNA gene was analyzed by polymerase chain reaction (PCR). Finally, the samples were sequenced and analyzed. The results of sequences analysis revealed 100% similarity between the 2AC and 2AF samples, showing genetic identity with species from the *Bacillus subtilis* group, and the 2AA showed 100% genetic identity with *Bacillus megaterium* samples. Based on the results presented here, it is possible to observe different biotechnological applications of the isolated bacteria and than design future research.

Keywords: Biotechnological applications, bioprospecting, 16S rRNA, *Bacillus*

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos surgiram na terra por volta de 3,8 – 3,7 bilhões de anos atrás. Desde então a diversificação microbiana induziu mudanças à biosfera terrestre (MADIGAN et al., 2016). De tal maneira que, vivendo nos mais variados habitats da Terra, em uma íntima associação com o meio ambiente, promovem reações que podem ser exploradas de maneira vantajosa (TORTORA et al., 2017).

Com a finalidade de utilizar esses organismos para o benefício humano, é necessário estudá-los de modo a conhecê-los suficientemente para sua aplicação. Com isso, se desenvolveram técnicas de investigação

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.
lizandrabrasilpontes@gmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo; thiagomaniglia@utfpr.edu.br



genômica que envolvem a identificação, o mapeamento, o sequenciamento, a análise e a comparação de genomas (MADIGAN et al., 2016).

Esses métodos são baseados no estudo de moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), envolvendo diversos princípios e técnicas que permitem a investigação minuciosa a nível molecular desses microrganismos. Assim, o conhecimento básico do objeto de estudo é importante para a seleção das técnicas, visando às aplicações posteriores (BRUNO et al., 2017).

Dentre as principais espécies pesquisadas, estão as bactérias do gênero *Bacillus*. Estas são em formas de bastonete, Gram-positivas, dispõem de habilidades fisiológicas que lhes permitem viver em ambientes naturais, possuem inúmeras aplicações biotecnológicas e são amplamente catalogadas (TURNBULL, 1996).

O conhecimento sobre a diversidade microbiana pode trazer inúmeros proveitos. Como no trabalho publicado por Brunale (2017) que garante que essa categoria de estudo aplicada ao diesel e biodiesel trará ganho de qualidade em ambos os combustíveis. Em outro segmento, Carneiro et al. (2003) avalia a utilização de *Bacillus* no controle de *Colletotrichum* sp. em seringueira, que por conta do conhecimento sobre os microrganismos aplicados, pode identificar as espécies que apresentam a eficácia proposta. Em virtude das diversas funções, quais seriam as bactérias encontradas no solo de plantio de milho localizado na região da cidade de Toledo – Paraná e suas respectivas aplicações?

O objetivo principal da presente pesquisa foi realizar a bioprospecção através do isolamento e identificação molecular de bactérias de solo com potencial para aplicação biotecnológica.

2 MÉTODO

Para o presente trabalho foram utilizados três isolados bacterianos obtidos a partir de uma amostra de solo de rizosfera de plantio de milho localizado na região da cidade de Toledo – Paraná, obtidas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa em isolamento, cultivo e análises moleculares de microrganismos de interesse biotecnológico desenvolvido entre os anos de 2019 e 2020.

2.1 Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase

Para a extração de DNA, utilizou-se o método baseado em fervura utilizando o protocolo proposto por Barea et al., (2004). Anteriormente à extração, cada amostra foi cultivada por 48 horas em meio LB líquido. A extração por fervura consiste na centrifugação das amostras à 13.000 rpm por 5 minutos, seguido do descarte do meio, posteriormente adicionou-se 100 µL de água estéril, passou-as no vórtex e as levou ao banho maria a 100°C por 15 minutos, passou-as no vórtex novamente antes do banho de gelo de 10 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante transferido para um tubo novo e armazenados em freezer -20°C.

Após a extração de DNA, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual foi amplificado o gene 16S rRNA. Para amplificação foi utilizado o par de primers universais R (5'CGGTTACCTTGTTACGACTT3') e F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'), os quais foram baseados na metodologia proposta por Chaitanya et al., (2013). A reação foi realizada em um volume final de 30 µL e utilizou-se as concentrações finais recomendadas pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase, as quais foram 1X tampão (PCR Buffer Mg²⁺ Plus), 0,2 mM de solução de dNTP (10 mM cada base), 0,5 µM de cada um dos dois primers, 2,5 U de taq DNA polimerase, 7 µL de DNA e 15,5 µL de H₂O ultrapura. As reações de PCR ocorreram em termociclador programado com 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. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o uso.



2.2 Purificação e eletroforese

Após realizar o procedimento de amplificação do gene 16S rRNA, as amostras foram purificadas antes de seguir para o sequenciamento. O procedimento consistiu em adicionar a quantidade de 1:1 de polietilenoglicol (PEG) e o produto de PCR em um microtubo de fundo cônico de 1,5 mL. 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 retirado cuidadosamente e adicionado ao tubo 125 µL de etanol 80% gelado, centrifugou-se novamente por 5 minutos a 13.000 rpm para sedimentar o produto da PCR. Retirou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem com etanol mais duas 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 tubo. O DNA foi ressuspensionado em água milliQ em volume proporcional à concentração inicial do DNA.

Após a PCR e a purificação do produto do PCR, foram realizados a eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado com 100 mL de TBE. 1 g de agarose e 10 µL de SYBR Safe DNA. Posteriormente, adicionou 5 µL de DNA ou produto de PCR juntamente com 1,5 µL de Loading Buffer e aplicado no gel de agarose. Aplicou-se também no primeiro poço, 5 µL de Ladder 100 pb.

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.

2.3 Sequenciamento das amostras e análise de bioinformática

Em seguida, as amostras foram encaminhadas para uma empresa terceirizada responsável pelo sequenciamento a partir do método de Sanger. Para o sequenciamento cada amostra continha uma quantidade do DNA amplificado e purificado entre 30 e 60 ng, juntamente com 5 mols do universal F, e completou-se o volume para 6 µL. As amostras foram desidratadas em estufa de secagem a 60°C e posteriormente enviadas via correio para a empresa responsável pelo sequenciamento.

Inicialmente as sequências de DNA obtidas no sequenciamento do gene 16S foram editadas no programa BioEdit com base nos eletroferogramas disponibilizados no serviço de sequenciamento. Após a correção dos erros de sequenciamento, as amostras foram analisadas através do alinhamento local de sequências de DNA utilizando-se a ferramenta nucleotídeo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do banco de dados de sequências de DNA do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para encontrar sequências similares à dos isolados.

3 RESULTADOS

O cultivo dos três isolados utilizados neste estudo foram identificados em projeto anterior com os nomes de 2AA, 2AC e 2AF, e podem ser visualizados na figura I.

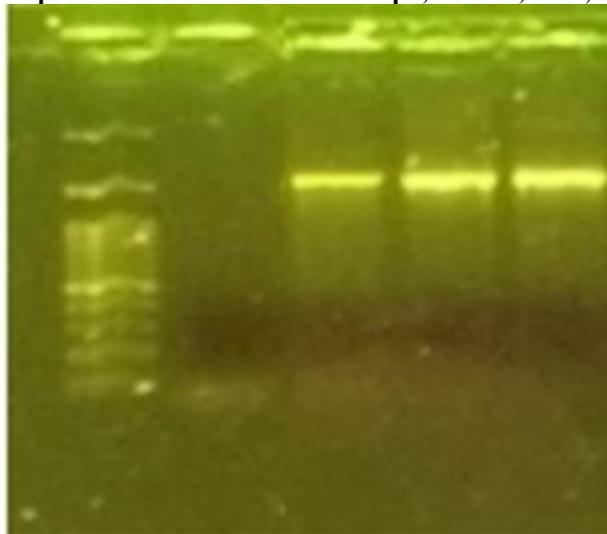
Figura I - Foto dos isolados bacterianos obtidos da amostra de solo de rizosfera com plantio de milho.



Fonte: Autoria própria (2020)

O DNA extraído para as amostras apresentou quantidade e qualidade suficientes para realizar a amplificação do gene 16S. Baratto et al., (2012), testou diferentes protocolos de extração de DNA e constatou que a extração térmica é ideal quando não se tem exigências quanto a quantidade e qualidade do DNA. A amplificação do gene produziu uma banda de aproximadamente 1500 pares de bases (pb) para as amostras. A figura II apresenta o resultado da eletroforese após a purificação do produto da PCR com as três amostras.

Figura II- Amplificação do gene 16S das amostras isoladas de solo de rizosfera. As amostras na sequência da esquerda para a direita são: Ladder 100 pb, Branco, 2AA, 2AC e 2AF.



Fonte: Autoria própria (2020)

Após a edição as sequências apresentaram tamanhos de 889 pb para a amostra 2AA, 732 pb para a amostra 2AC e 725 pb para a amostra 2AF. O alinhamento das sequências revelou uma similaridade de 100% entre as amostras 2AC e 2AF, demonstrando que esses dois isolados pertencem a mesma espécie. A análise das sequências no Blast resultou na identificação das amostras. O isolado 2AA apresentou 100% de identidade genética com amostras de *Bacillus megaterium*, e os isolados 2AC e 2AF apresentaram 100% de identidade com quatro espécies do gênero *Bacillus*, sendo elas *B. subtilis*, *B. Velezensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. Siamensis*, portanto sendo possível a identificação apenas à nível de gênero.

A espécie *B. megaterium* 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).

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).

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 de *B. subtilis*, o grupo operacional *B. Amyloliquefaciens* (FAN et al., 2017).

A análise da sequência nucleotídica do gene que codifica para RNA ribossômico 16S é considerado um dos melhores métodos para a identificação de bactérias à nível de gênero e espécie. Essa região possui sequências de nucleotídeos altamente conservadas, intercaladas por sequências variáveis que permitem a identificação bacteriana (HAN, 2006). Entretanto as espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis*, apresentam grande dificuldade de distinção quando baseadas em métodos fenotípicos tradicionais e da análise do gene 16S rDNA, devido à alta conservação das sequências nucleotídicas entre essas espécies (FAN et al., 2017).

Portanto, recomenda-se em um estudo futuro, 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).

4 CONCLUSÃO

A partir do isolamento e identificação molecular dos grupos de bactérias de solo encontrados nesse estudo, *B. megaterium* e espécies do grupo *Bacillus subtilis* é possível ter uma noção das diversas aplicações biotecnológicas que os isolados possuem, direcionando assim, as pesquisas a serem realizadas em trabalhos futuros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a direção da UTFPR, campus Toledo pelo auxílio financeiro na bolsa de iniciação científica concedida.

REFERÊNCIAS

- BARATTO, C; MEGIOLARO, F. **Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para a utilização em RAPD-PCR**. Unoesc & Ciência, Joaçaba, v. 3, n. 1, p. 121-130, jan./jun. 2012.
- BAREA, J; PARDINI, M; GUSHIKEN, T. **Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para a utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR)**. Rev. bras. hematol. Hemoter., 26 (4), 274-281, 2004.
- BRUNALE, P. P. M. **Identificação molecular de microrganismos cultiváveis contaminantes de diesel A e diesel B S500**. Dissertação (Pós-Graduação em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, p. 95. 2017. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23521/1/2017_Patr%C3%ADciaPorteladeMedeirosBrunale.pdf. Acesso em: 7 set. 2021.
- BRUNO, Alessandra Nejar. **Biociência II: aplicações e tecnologias**. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em: https://www.google.com.br/books/edition/Biociencia_II/DXdEDgAAQBAJ?hl=pt-br



BR&gbpv=0. Acesso em: 26 jul. 2021.

CARNEIRO, M. A. B. Utilização de *Bacillus* no controle de *Colletotrichum* sp em seringueira. In: XL Congresso Paulista de Fitopatologia, 2017, Campinas, São Paulo. **Anais eletrônicos**. Campinas, São Paulo: Instituto Agrônomo, p. 6. 2017. Disponível em: http://www.infobibos.com.br/anais/cpfito/40/Resumos/Resumo40CPFito_128.pdf . Acesso em: 7 set. 2021.

CHAITANYA, K; NAGAMANI, P; SK, M. **Production of exopolysaccharide and polyhidroxybutyrate by newly isolated Bacillus AP03 from industrial effluents. International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Apr, 2013, 4 (2): 404-414.

FAN, B; BLOM, J; KLENK, H; BORRIS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

HAN, X. Y.. 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

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582712986/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

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

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788582713549>. Acesso em: 25 jun. 2021.

TURNBULL, P. C. B.. **Bacillus**. In: BARON, Samuel. Medical Microbiology. 4. ed. Galveston (Tx): University Of Texas Medical Branch At Galveston, 1996. Cap. 15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>. Acesso em: 26 jun. 2021.

WANG, L; LEE, F; TAI, C; KASAI, H. 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**, 57, 1846–1850, 2007.