



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Identificação molecular de bactérias promotoras de crescimento isoladas de Urucum

MOLECULAR IDENTIFICATION OF GROWTH-PROMOTING BACTERIA ISOLATED FROM URUCUM

Gabriela Cristina Da Silva Biet *, Patricia Dayane Carvalho Schaker †, Taynara Cassia Seratti ‡,

RESUMO

As bactérias promotoras de crescimento em plantas atuam por diferentes mecanismos para contribuir com o desenvolvimento vegetal, disponibilizando nutrientes e conferindo proteção contra fitopatógenos, por exemplo. O presente trabalho objetivou realizar a identificação molecular de três bactérias isoladas da rizosfera do urucum com potencial em promover o crescimento vegetal. Essas bactérias apresentaram capacidade de produção do hormônio vegetal auxina, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. Para isso, extraiu-se DNA bacteriano por dois métodos: método choque-térmico e método lise térmica e posteriormente, amplificação do gene 16S rDNA pela técnica reação em cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se purificação com polietilenoglicol (PEG) 20% e corrida em gel eletroforese para avaliar qualidade e quantidade de DNA amplificado. O sequenciamento ocorreu pelo método Sanger e as sequências obtidas comparadas com as depositadas no NCBI utilizando software BLAST. Os isolados LB 2 e LB 24 comparados ao banco de dados *nr* do NCBI são pertencentes ao gênero *Bacillus* com 100% de identidade com as espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis* e *B. siamensis*. Como perspectiva futura, pretende-se sequenciar outros genes que permitam a definição da espécie, como *rpo*.

Palavras-chave: 16S rDNA, rizosfera, *Bacillus*, BPCP

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria act by different mechanisms to contribute to plant development, providing nutrients and protection against phytopathogens, for example. The present work aimed to carry out the molecular identification of three bacteria isolated from the annatto rhizosphere with potential to promote plant growth. These bacteria were capable of producing the plant hormone auxin, nitrogen fixation and phosphate solubilization. For this, bacterial DNA was extracted by two methods: heat-shock method and thermal lysis method, and later, amplification of the 16S rDNA gene by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Purification was performed with 20% polyethylene glycol (PEG) and gel electrophoresis run to assess the quality and quantity of amplified DNA. Sequencing was performed using the Sanger method and the sequences obtained were compared with those deposited at the NCBI using BLAST software. The isolates LB 2 and LB 24 compared to the NCBI *nr* database belong to the genus *Bacillus* with 100% identity with the species *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis* and *B. siamensis*. As a future perspective, it is intended to sequence other genes that allow the definition of the species, such as *rpo*.

Keywords: 16S rDNA, rhizosphere, *Bacillus*, PGPR

* Engenharia de Bioprocessos de Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; gabrielabiet@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo (Toledo); patriciaschaker@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; taynaraseratti@alunos.utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

As rizobactérias são um conjunto de bactérias colonizadoras da região rizosférica, delimitada pelas raízes das plantas, sendo altamente rica em nutrientes, sais minerais e matéria orgânica e destaca-se por ser uma região com alta diversidade microbiana (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992). As rizobactérias são reconhecidas pela sua capacidade de beneficiar o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos, como produção de fito hormônios (auxinas, giberelinas, citocininas), e indiretos, como no controle de fitopatógenos (HAQUE *et al* 2020; ALMEIDA; COLLARES; BARBOSA, 2015). Nesse sentido, a utilização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas RPCPs (ou PGPR, do inglês *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), torna-se uma alternativa para a substituição e/ou redução do uso de fertilizantes químicos, uma vez que permite maior absorção e disponibilidade de nutrientes para a planta, além de poder atuar na defesa contra fitopatógenos (CUNHA, 2017).

A bioprospecção dessas bactérias envolve técnicas de microbiologia e bioquímica que indicam o potencial de promoção de crescimento vegetal. Trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa levaram ao isolamento de três linhagens de rizobactérias da rizosfera de Urucum que apresentaram capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio (BIET *et al*, 2020). Um passo importante para o desenvolvimento de um novo bioproduto com base no uso dessas bactérias é a correta identificação da espécie, o que garantiria a segurança do seu uso e expansão das oportunidades de aplicação.

Para isso, as técnicas de sequenciamento de DNA apresentam algumas vantagens, como rapidez e precisão dos resultados. O gene marcador molecular usualmente utilizado para identificação de bactérias é o 16S rDNA, pois é compartilhado entre todas as espécies, apresentando função homóloga na síntese proteica, taxa de evolução lenta, e tamanho adequado para sequenciamento pela técnica de Sanger (SILVEIRA, 2004; JANDA; ABBOTT 2007). Em vista disso, o presente trabalho teve por objetivo realizar a identificação molecular de rizobactérias previamente isoladas da rizosfera de Urucum e caracterizadas em relação ao potencial de promoção do crescimento vegetal por meio do sequenciamento da região 16S.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Extração de DNA

A extração do DNA ocorreu por dois métodos distintos, sendo o método choque-térmico e método por lise térmica. No método de choque térmico, inicialmente obteve-se biomassa das bactérias LB 2, LB 24 e LB 35 em tubos tipo Falcon contendo 3 mL de meio Luria Bertani (LB) e 100 µL de inóculo bacteriano (estoque em glicerol), e mantidas em shaker a 150 rpm e 37°C, overnight. Após crescimento, transferiu-se 1,0 mL de inóculo para microtubos de 1,5 mL e então centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm por 5 min, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esta última etapa, então, novamente adicionou-se 1,0 mL de inóculo e centrifugou-se. No pellet formado, adicionou-se 100 µL de água ultrapura para cada amostra e vortexou-se para homogeneização. Encaminhou-se as amostras para banho maria a 100°C por 15 min, vortexou-se e deixou-se no banho de gelo durante 10 min. Centrifugou-se as amostras a 14.000 rpm por 5 min e transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos de 1,5 mL e armazenou-se em freezer, para posterior etapa de amplificação do gene 16S.

No método de lise térmica, com as células obtidas em meio LB nas mesmas condições citadas anteriormente, transferiu-se 1,0 mL para microtubos de 1,5 mL e centrifugou-se a 5.000 rpm durante 4 min e descartou-se a fração sobrenadante. Novamente, transferiu-se 1,0 mL de células para seu respectivo microtubo



e centrifugou-se a fim de obter mais células. Em seguida, adicionou-se 500 µL de solução tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) ao pellet formado e centrifugou-se a 5.000 rpm por 2 min e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se 3 vezes a etapa de lavagem com tampão TE. Posteriormente, ressuspendeu-se o pellet com 100 µL de TE e deixou-se em banho quente a 98°C por 10 min. Em seguida centrifugou-se as amostras durante 30 segundos a 13.000 rpm e transferiu-se a fração sobrenadante para novos microtubos de 1,5 mL e armazenou-se em freezer a -20°C para posterior etapa de amplificação do gene 16S.

2.2 Amplificação do gene 16S pela técnica de PCR

Após extração do DNA, a técnica de PCR foi utilizada para amplificar a região genômica que codifica para a subunidade 16S do ribossomo procariótico. Utilizou-se o kit Ludwig Biotecnologia, de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, cada reação de 50 µL continha 0,5 µM dos primers 1492R (5'CGGTTACCTTGTTACGACTT3') e 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') 2,5 U/L de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de dNTP mix, 1X Tampão de amostra, 1,5 mM MgCl₂ e 7 µL de DNA. Os microtubos foram inseridos no termociclador (Applied Biosystems) para amplificação da região 16S. A ciclagem utilizada foi de 2 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação total por 45 segundos a 94°C, anelamento de primers por 30 segundos a 55°C, e extensão por 1 min a 72°C. Por fim, as amostras foram mantidas por 10 min a 72°C para extensão final. Após ciclagem completa, os produtos da PCR foram mantidos a 4°C no termociclador e posteriormente transferidos para freezer a -20°C. Como controle negativo substituiu-se o volume de amostra ou material genético por água ultrapura no mix de reação.

A confirmação da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1%) utilizando-se tampão TBE 1X contendo o intercalante de DNA (*Safe, Invitrogen*). A corrida eletroforética foi realizada a 80 volts durante 60 min. Posteriormente, revelou-se o gel em transiluminador (*Loccus*).

2.3 Sequenciamento e análise dos dados

Para sequenciamento, as amostras de PCR foram purificadas utilizando PEG 20% (LIS; SCHLEIF, 1975) e realizou-se novamente eletroforese para quantificação final da concentração de DNA por meio da comparação da intensidade das bandas com o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen) e 100 pb (Promega). As amostras foram enviadas para sequenciamento Sanger (ACTGene Análises Moleculares).

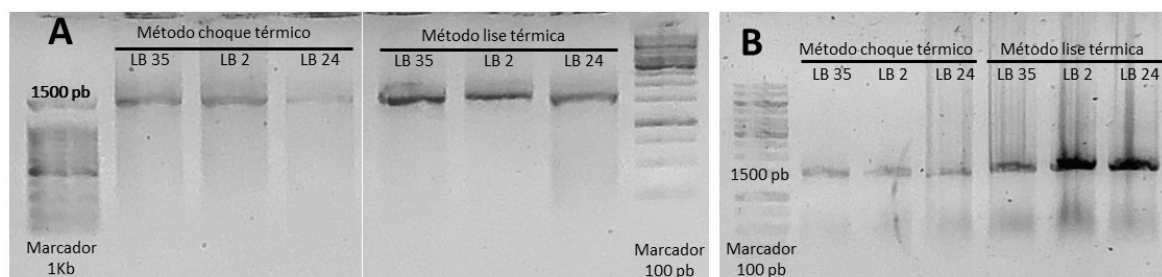
O cromatograma do sequenciamento para os primers R e F das amostras foram analisados no software BioEdit *Sequence Alignment Editor* quanto à qualidade. Selecionou-se manualmente regiões do cromatograma com mínimos ruídos, picos bem definidos e linha de base estável e com comprimento <450 pb. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados *nr* do NCBI utilizando o software *nucleotide* BLAST. A porcentagem de identidade foi utilizada para definição da espécie.

3 RESULTADOS

A amplificação da região do gene 16S rDNA foi realizada para as três rizobactérias com potencial em contribuir com o crescimento vegetal, nomeadas de LB 2, LB 24 e LB 35, utilizando DNA obtidos por ambos os métodos de extração. No gel de eletroforese (Fig. 1A), observa-se que houve a amplificação na altura do fragmento de aproximadamente 1500 pb do gene 16S, e presença de bandas mais fortes para as amplificações utilizando o DNA extraído pelo método de lise térmica.

Após a purificação dos produtos de PCR, um novo gel de eletroforese foi obtido (Fig. 1B), sendo possível verificar a presença das bandas de tamanho esperado. Novamente, observa-se que as amostras onde foi utilizado DNA obtido pelo método de lise térmica manteve a presença de bandas mais intensas.

Figura 1 – Gel eletroforese após amplificação do gene 16S rDNA (A) e após etapa de purificação com PEG 20% (B).



Fonte: Autoria própria (2021)

As amostras de melhor qualidade foram devidamente quantificadas e enviadas para sequenciamento Sanger. Para os isolados LB 2 e LB 24 os eletroferogramas resultantes apresentaram qualidade com mínimos ruídos e picos constantes. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no NCBI, sendo que ambos os isolados apresentaram 100% de identidade com espécies do gênero *Bacillus* (Tabela 1), 100% de cobertura e E-value de 0.0. No entanto, não foi possível definir qual das espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis* ou *B. siamensis* pertencem.

Os dados de sequenciamento obtidos para o isolado LB 35 foram de baixa qualidade, impossibilitando a sua identificação.

Tabela 1 – Identificação de estirpes bacterianas pela sequência parcial do gene 16S rRNA.

Rizobactéria	Tamanho da sequência pb	Nome científico	E-Value	Identidade (%)	Cobertura (%)
LB 2	450	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.0	100	100
		<i>Bacillus velezensis</i>	0.0	100	100
		<i>Bacillus subtilis</i>	0.0	100	100
		<i>Bacillus siamensis</i>	0.0	100	100
LB 24	408	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.0	100	100
		<i>Bacillus velezensis</i>	0.0	100	100
		<i>Bacillus subtilis</i>	0.0	100	100
		<i>Bacillus siamensis</i>	0.0	100	100

Fonte: Autoria própria (2021).

Apesar de não ter sido obtida a sequência completa dos aproximadamente 1500 pb amplificados, o gene 16S rRNA apresenta algumas limitações quanto a identificação de espécies bacterianas, pois apresenta baixa capacidade filogenética, uma vez que há muitas sequências semelhantes ou até idênticas no banco de dados. Esse comportamento é especialmente frequente no gênero *Bacillus*, para o qual é descrita uma limitação da identificação de espécie baseada apenas no gene 16S rDNA (JEYARAM *et al* 2011). Nesses casos é indicado



o sequenciamento de outros genes de evolução mais rápida para definição da espécie, ou seja, genes que codificam para proteínas, como é o caso do gene *recQ*, utilizado para diferenciação de espécies de *Bacillus* (HEO et al, 2019). Outra opção é o uso da técnica de PCR-RFLP, onde o produto de amplificação do gene 16S rDNA é clivado com enzimas de restrição, gerando um perfil de bandas no gel de eletroforese que permite distinguir espécies de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, entre outras (JEYARAM et al, 2011). Assim, como perspectiva futura, torna-se necessário a busca por outros genes e técnicas, além das mencionadas, a fim de conseguir definir a espécie das bactérias de interesse.

4 CONCLUSÃO

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu identificar o gênero das bactérias LB 2 e LB 24 como *Bacillus*, porém sem conclusão quanto à espécie. Quanto ao isolado LB 35, não foi possível identificar gênero e espécie do isolado devido a falhas no sequenciamento. Para trabalhos futuros, torna-se necessário a obtenção de sequências mais longas do gene, seja pelo uso de primers internos para sequenciamento ou obtenção de sequências mais longas e de alta qualidade, bem como o sequenciamento de outros genes que permitam a definição correta das espécies ou a aplicação da técnica de PCR-RFLP. Dessa forma, o potencial de cada microrganismo pode ser explorado focando na obtenção de algum produto de interesse econômico e garantindo sua segurança para aplicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná que forneceu espaço e infraestrutura e a bolsa para o desenvolvimento deste projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R. M. de. COLLARES, D. G. BARBOSA, P. F. D. **Bioprospeção microbiana**. Embrapa. 2015. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/137596/1/bioprospecao-microbiana-web.pdf>> acesso em 12 set. 2021
- BENTO, Manuela A. de O. **Prospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias da serapilheira e do solo em área de floresta atlântica do norte fluminense**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, maio de 2013. Disponível em:<<https://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2014/06/DISSERTA%C3%87%C3%83O-FINAL-REVISADA-manu.pdf>> acesso em 05 set. 2021
- BIET, Gabriela C. da S. *et al.* **Prospecção de bactérias promotoras de crescimento vegetal da rizosfera de urucum**. XXV Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica – SICITE UTFPR – câmpus Toledo. 2020. ID:6041. Disponível em:<<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2020>> Acesso em 13 set. 2021



- CUNHA, Thammi, Q. G. da. **Promoção de crescimento de plantas de tomate mediada por isolados bacterianos**. 2017.43f. Dissertação (Mestrado em olericultura) Instituto Federal Goiano, GO, 2017. Acesso em: 02 jun. 2020.
- HAQUE, M. et al. **Biofilm Producing Rhizobacteria With Multiple Plant Growth-Promoting Traits Promote Growth of Tomato Under Water-Deficit Stress**. *Frontiers in microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2020.542053. 26 nov. 2020. Acesso em 12 set. 2021
- HEO, Jun. e colaboradores. **Genetic marker gene, *recQ*, differentiating *Bacillus subtilis* and the closely related *Bacillus* species**. *Journals investing in science*. doi: 10.1093/femsle/fnz172. *FEMS Microbiology Letters*, 336, 2019, fnz172.
- JANDA, J. M. ABBOTT, S. L. **Sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação bacteriana no laboratório de diagnóstico: vantagens, perigos e armadilhas**. *Journal of Clinical Microbiology*. 11 de julho de 2007. 10.1128 / JCM.01228-07. PMID: 17626177.
- JEYARAM K. et al. **Diferenciação distinta de espécies intimamente relacionadas do grupo *Bacillus subtilis* com importância industrial**. *Journal of Microbiological Methods*. v.87 ed.2. p.161-164. 26 agosto de 2011. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.08.011>> acesso em 07 set. 2021
- JÚNIOR, José R. V. et al. **Rizobactérias como agente de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Embrapa. Porto Velho RO. 2013. Documentos, 155. ISSN 0103-9865.
- LIS, J; SCHLEIF, R. **Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol**. *Nucleic Acids Research*, v. 2, p. 383-390, 1975.
- SILVEIRA, É. L da. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA**. Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho". Jaboticabal: SP. 2004. Disponível em:<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94868/silveira_el_me_jabo.pdf?sequence=1> acesso em 05 set. 2021