

Prospecção genômica de quitinases de Bacillaceae isoladas de sedimentos de rios amazônicos

Teixeira, Charles Araújo¹; Queiroz, Claudia Afras de²; Sousa, Thiago Fernandes¹; Silva, Gilvan Ferreira da³

¹Universidade Federal do Amazonas, ²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, ³Embrapa Amazônia Ocidental.
Email: gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

A família Bacillaceae é composta por organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, presentes no solo rizosférico, capazes de crescer rapidamente em resposta ao carbono orgânico disponível. Conhecidos por produzir metabólitos secundários e que podem ser usados como agentes de biocontrole. As espécies do gênero *Bacillus* se destacam por suas propriedades de promover o crescimento de plantas e pela capacidade de produção de enzimas quitinolíticas que inibem a ação de fitopatógenos. Neste estudo realizou-se prospecção genômica em busca de sequências com atividade quitinolítica em seis genomas de fungos isolados de rios amazônicos pertencentes à família Bacillaceae. Através da busca por homologia identificaram 32 sequências de proteínas, classificadas em seis grupos: GH5 (2), GH6 (2), GH12 (1), GH18 subgrupo D (23), LPMO10 (2) e metaloprotease (2). Os resultados indicam o potencial de isolados amazônicos da família Bacillaceae na prospecção de quitinases e revelam alta distribuição de quitinases do tipo GH18 nos genomas desses isolados.

Palavras-chave: *Bacillus*, Biocontrole, fitopatógenos.

Introdução

Os organismos pertencentes à família Bacillaceae são amplamente distribuídos, em sua maioria heterotróficos aeróbios ou anaeróbios facultativos, apresentam crescimento rápido em resposta ao carbono orgânico disponível, comumente encontrados em solo rizosférico, e são conhecidos pela produção de metabólitos secundários que podem ser utilizados como agentes de biocontrole (Mandic-Mulec et al. 2015).

Desta família, destacam-se as espécies do gênero *Bacillus* pela ampla gama de estudos envolvendo seus mecanismos de promoção do crescimento de plantas e inibir a ação de fitopatógenos, onde cerca de 4 a 15% do seu genoma pode estar envolvido com a síntese de metabólitos antimicrobianos e enzimas degradadoras, responsáveis pelo biocontrole (Dimkić et al. 2022).

Entre as enzimas degradadoras, estão as quitinases que atuam na parede celular de fungos, cutículas de artrópodes e ovos de nematóides (Dukariya e Kumar 2020). Segundo o banco de dados CAZy, as quitinases são divididas conforme seu mecanismo de ação, onde as quitinases (EC 3.2.1.14) atuam, aleatoriamente, clivando as cadeias de quitina em sítios internos e as β -N-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52) hidrolisam a quitina da extremidade não redutora da molécula, removendo resíduos de N-acetilglucosamina (Martínez-Zavala et al. 2020).

As glicosil hidrolases (GH) são divididas em famílias de acordo com suas sequências proteicas, onde as degradadoras de quitina são GH18, GH19, GH23 e GH48, com atividade de quitinase (EC 3.2.1.14), e GH3, GH5, GH18, GH20, GH84, GH116, com atividade β -N-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52) (Martínez-Zavala et al. 2020).

Entre as quitinases mais comuns em *Bacillus*, as glicosil hidrolases da família 18 se destacam, as GH18 possuem uma região catalítica que consiste em um domínio barril (β/α) da triosefosfato isomerase (TIM), com três subgrupos, sendo eles A, B e C, onde A possui domínio de inserção de quitina (CID), formando sulco do tipo túnel profundo, B possuem além do CID um loop de formação em telhado, formando um túnel profundo parcialmente fechado, as do subgrupo C possuem apenas o barril TIM formando uma fenda rasa e ainda existem as do subgrupo D que são as quitinases transglicosilantes (Oyeleye e Normi 2018).

O uso de bactérias deste gênero para o biocontrole, em especial de fitopatógenos, é promissor, visto que a biossíntese da quitinase, em alguns isolados, pode estar associado a mecanismos de degradação de corpos de frutificação fúngicos, e não a simples presença de quitina no meio, evidenciando a aplicação de *Bacillus* para este fim (Schönbichler et al. 2020).

O presente trabalho propõe prospectar genes responsáveis pela biossíntese de quitinases em bactérias da família Bacillaceae isoladas de sedimentos de rios amazônicos a fim de caracterizar filogeneticamente as enzimas encontradas e possibilitar a elucidação do potencial de aplicação destas no biocontrole de fitopatógenos.

Material e Métodos

Os microrganismos foram previamente isolados e testados qualitativamente quanto à degradação de quitina. Para isso, os isolados foram inoculados em meio de quitina coloidal (MQC) como única fonte de carbono. A formação de halos de degradação indica linhagem positiva para produção de quitinases.

A partir dos isolados com atividade quitinase positiva (MAD 1010, MAD 202, MAD 41, SOL 105, SOL 140, SOL 196), seus genomas foram analisados com o objetivo de identificar o gênero e a espécie, utilizando o programa TYGS (<https://tygs.dsmz.de/>).

A identificação dos genes responsáveis pela atividade quitinolítica foi realizada por meio de busca no genoma via BLAST usando proteínas quitinolíticas já caracterizadas. Para tanto, os genomas dos isolados amazônicos foram anotados usando a plataforma RAST- Rapid Annotations using Subsystems Technology (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi?page=JobDetails&job=1242927>). As proteínas homólogas resultantes, foram submetidas ao BLAST no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar a família da enzima e a relação com sequências presentes no banco de dados. As proteínas também foram examinadas individualmente usando o InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). As análises filogenéticas foram conduzidas por meio de Neighbor-Joining com auxílio do software MEGA.

Resultados e Discussão

No genoma de *Priestia megaterium* SOL 196 foram identificadas sete enzimas para degradação de quitina, e classificadas em GH18 (6) e LPM10 (1). As linhagens de *Bacillus cereus* diferiram quanto às classes e números de quitinases localizadas, no isolado MAD 202 foram identificadas quatro quitinases sendo duas pertencentes a GH18 e duas pertencentes a metaloprotease (família 60). O isolado MAD 41 apresentou nove quitinases classificadas em GH05 (1), GH06 (1), GH18 (6) e LPM10 (1). O isolado SOL 105 apresentou apenas duas quitinases da família GH18. Em *B. subtilis* MAD 1010, foi identificada apenas uma quitinase da família GH05, em contraste *B. velezensis* SOL 140 no qual

foram identificadas nove quitinases classificadas em GH06 (1), GH12 (1) e GH18 (7) (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Genomas de Bacillaceae com sequências de quitinases

Isolados	Identificação	Potencial nova espécie	Atividade	Nº de quitinases
MAD 41	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	9
MAD 202	<i>B. cereus</i>	-	+	4
MAD 1010	<i>B. subtilis</i>	-	+	1
SOL 105	<i>B. cereus</i>	-	+	2
SOL 140	<i>B. velezensis</i>	-	+	9
SOL 196	<i>Priestia megaterium</i>	-	+	7
			Total	32

Os seis genomas analisados, foram identificados como pertencentes à família Bacillaceae, e classificados em nível de espécie: *P. megaterium* (SOL 196), *B. cereus* (MAD 202, MAD 41 e SOL 105), *B. subtilis* (MAD 1010) e *B. velezensis* (SOL 140). Todos os isolados apresentaram >70% de dDDH.

As duas GH5 localizadas apresentam módulo de ligação a carboidrato do tipo 3 (CBM3) e domínio de fibronectina tipo III (FN3) característicos de quitinases dessa família (Nakamura et al. 2020). As sequências de GH6 identificadas apresentam domínios FN3 e CBM3, semelhantes aos presentes nas GH5, e as sequências de GH12 apresentam domínio ConA-like no qual faz parte do domínio de lecitinas.

Além dessa GHs, foram detectadas duas sequências de proteínas com atividade quitinase, sendo elas as mono-oxigenases de polissacarídeos líticos do tipo LPMO10 que podem atuar oxidando ligações glicosídicas da quitina (Agger et al. 2014), uma com CMB2 e domínio de ligação a quitina (CBD2) e a outra mais simples com o LPMO10.

As metaloproteases da família 60, geralmente estão associadas a módulos de ligação a carboidrato característicos de quitinases que em conjunto auxiliam na colonização de vertebrados. Dessa forma, esta enzima pode estar associada a bactérias com potencial de infecção do trato respiratório, incluindo o humano (Nakajang et al. 2012).

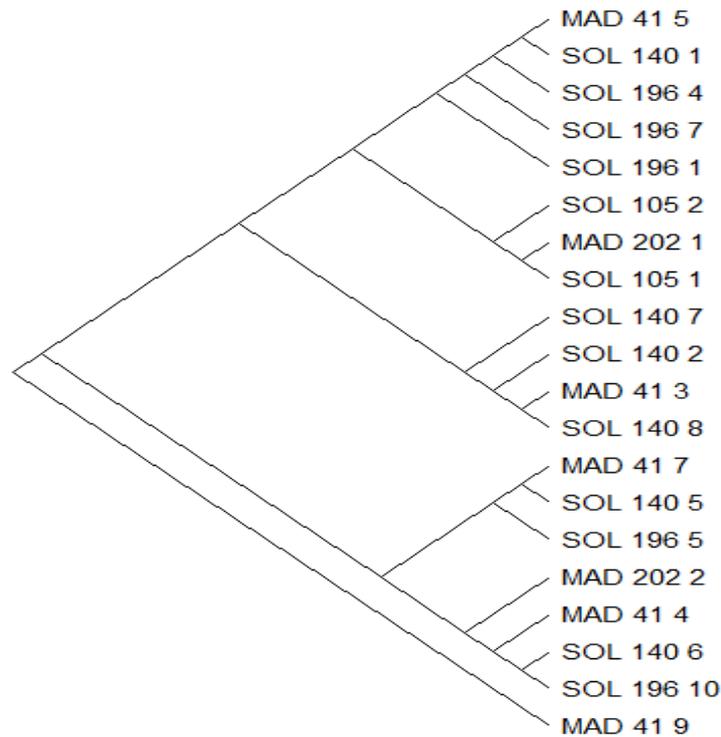


Figura 1 – Diversidade de enzimas quitinolíticas da família GH18 identificadas no genoma de isolados amazônicos da família Bacillaceae.

Conclusões

Detectaram-se 32 quitinases em organismos da família Bacillaceae isolados de rios amazônicos. Entre as enzimas com atividade de degradação de quitina presentes nos genomas amazônicos, as da família GH18 foram as mais frequentes.

Este estudo fornece um dataset de enzimas caracterizadas e disponibiliza bases para estudos posteriores acerca das suas atividades e aplicações na agricultura.

Agradecimentos

À FAPEAM programa Biodiversa (edital N° 007/2021).

Ao CNPq - programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica 2022-2024 (PIBIC N° 21/2022).

À CAPES (Procad AmazonMicro e CAPES-Amazônia Legal).

Referências

- Agger, J.W.; Isaksen, T.V.; Várnai, A.; Vidal-Melgosa, S.; Willats, W. G. T.; Ludwig, R.; Horn, S. J.; Eijsink, V. G. H.; Westereng, B. 2014. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(17): 6287–6292.
- BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. Brasil. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Acesso em 10 de fevereiro de 2023.
- Dimkić, I.; Janakiev, T.; Petrović, M.; Degrassi, G.; Fira, D. 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 117: 101754.
- InterPro. Ebi.ac.uk. Brasil. (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Acesso em 05 de fevereiro de 2023.
- Martínez-Zavala, S.A.; Barboza-Pérez, U.E.; Hernandez-Guzmán, G.; Bideshi, D. K.; Barboza-Corona, J. E. 2020. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials. *Frontiers in Microbiology* (10): 499289.
- Nakamura, A.; Daiki, I.; Akasit, V.; Visootsat, A.; Uchiyama, T.; Mizutani, K.; Kaneko, S.; Iino, R. 2020. Domain architecture divergence leads to functional divergence in binding and catalytic domains of bacterial and fungal cellobiohydrolases. *Journal of Biological Chemistry* 295(43): 14606-14617.
- Nakjang, S.; Ndeh, D.A.; Wipat, A.; Bolam, D.N.; Hirt, R.P. 2012. A novel extracellular metallopeptidase domain shared by animal host-associated mutualistic and pathogenic microbes. *PLoS ONE* 7(1): e30287.
- Oyeleye, A.; Normi, Y.M. 2018. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience Reports* 38 (4): BSR2018032300
- RAST Server. Rapid annotation using subsystem technology. Brasil. (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi?page=JobDetails&job=1242927>). Acesso em 10 de janeiro de 2023.
- TYGS. Type strain genome server. Brasil. (<https://tygs.dsmz.de/>). Acesso em 10 de janeiro de 2023.
- Schönbichler, A.; Díaz-Moreno, S.M.; Srivastava, V.; McKee, L. S. 2020. Exploring the potential for fungal antagonism and cell wall attack by *Bacillus subtilis* natto. *Frontiers in Microbiology* 11: 526759.