

Prospecção genômica do isolado *Bacillus* sp. MAD202 como potencial na indústria agrícola

Nascimento, Maria Giovana Cavalcante do¹; Sousa, Thiago Fernandes¹;
Queiroz, Cláudia Afras de³; Silva, *Gilvan Ferreira²

¹Universidade Federal do Amazonas, ²Embrapa Amazônia Ocidental, ³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

E-mails: giovana.cdn@gmail.com, gilvan.silva@embrapa.br

Resumo

Produzir alimentos com qualidade e em quantidade suficiente para atender ao crescimento populacional tornou-se um grande desafio. Esta meta exige o desenvolvimento de tecnologias racionais que otimizem o uso de recursos naturais, ampliando a capacidade produtiva, além de estratégias para redução das perdas de produção. Visando isso, nos últimos anos houve um grande aumento de uso de bioprodutos, uma vez que apresentam vantagem para atividades agrícolas como controle de fitopatógenos, sobretudo, bioprodutos a partir de culturas bacterianas como o uso do gênero *Bacillus*, que já possui diversas aplicações no mercado. Com isso, neste trabalho propõe a revisão do genoma do isolado de *Bacillus* e testes de co-cultivo contra fitopatógenos a fim de avaliar seu potencial para atividades da indústria agrícola. Para caracterização e filogenia foram utilizadas as ferramentas Antismash e TYGS, enquanto para anotação do genoma foram usados o Rast, BLASTp, além de testes contra fitopatógeno de culturas amazônicas *Moniliophthora perniciosa* (Mp01), *Fusarium decemcellulare* (fdc 307), *Fusarium* sp. (MCT10621) e *Colletotrichum scovillei* (2910). Em suma, a análise mostrou que o isolado *B. thunrigiensis* possui potencial do uso em biorremediação de cádmio, produção de sideróforo e inibição contra fitopatógenos de diferentes culturas.

Palavras-Chave: Fitopatógenos; Sideróforo; biorremediação

Introdução

Bactérias do gênero *Bacillus* são microrganismos que habitam inúmeros habitats, conhecidos como produtores de uma ampla gama de compostos antagonistas, e possuem cerca de 5 a 8% do genoma total dedicado a biossíntese de metabólitos secundários (Fira et al. 2018). Além disso, muitas espécies desse gênero são excelentes biocontroladores de pragas e doenças agrícolas. (Albuquerque 2018).

A eficiência dos bioprodutos a base de *Bacillus* também está relacionada à capacidade de espécies em realizar biossolubilização de nutrientes essenciais como o fósforo, fixar nitrogênio e produzir substâncias estimulantes (hormônios

e agentes de biocontrole) (Fernandes e Oliveira et al. 2019). O manejo de doenças mediadas por microrganismos apresenta-se como alternativa para a redução do uso de agroquímicos (Ryan et al. 2008; Alvindia et al. 2009; Zhang et al. 2016; Albuquerque 2018), este manejo, de modo geral agem significativamente por antibiose e, de maneira eventual, podem apresentar comportamentos de parasitismo e competição.

A antibiose produzida, geralmente, têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (Kupper et al. 2003; Lanna Filho et al. 2010), visando isso, atualmente é possível identificar 14 bactérias e 12 fungos registrados na USEPA (U. S. Environmental Protection Agency) destinados ao controle das enfermidades em plantas, a maioria destes microrganismos são atualmente comercializados em bioprodutos (Lanna Filho et al. 2010).

Nesse sentido, o sequenciamento e análise de genomas completos de microrganismos pode fornecer informações valiosas para triagem de microrganismos com potencial para biocontrole ou promoção de crescimento. Análises *in silico* via ferramentas de bioinformática auxiliam na identificação de vias metabólicas relacionadas a produção de hormônios vegetais, metabólitos secundários e detoxificação de metais pesados, permitindo o uso de microrganismos conforme os potenciais identificados (Balbinot 2020).

Neste estudo, foi realizada a análise genômica de uma bactéria MAD 202 do sedimento do Rio Madeira (AM) usando filogenômica para identificação da espécie e anotação e caracterização de genes relacionados à produção de metabólitos secundários e genes de resistência a metais pesados.

O objetivo deste trabalho foi realizar a prospecção genômica do isolado *Bacillus sp.* MAD202 como potencial na indústria agrícola, com base na identificação filogenômica da espécie, anotação e caracterização de genes relacionados à produção de metabólitos secundários e genes de resistência a metais pesados.

Material e Métodos

Identificação e Mineração Genômica

A caracterização do genoma do isolado foi realizada a partir da plataforma antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolites Analysis SHell) (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) conforme os padrões (Blin et al. 2019) que visam a identificação de conjuntos de genes responsáveis por uma via metabólica com base em referências contidas do banco de dados MiBIG, em conjunto as anotações genicas foram realizadas a partir da plataforma RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<https://rast.nmpdr.org/>) (Aziz et al. 2008). O pipeline Clinker foi usado para as análises de sintenia.

A partir da notação dos genes, as enzimas de interesse foram submetidas e comparadas manualmente junto a ferramenta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Eric, Nicholas e Theophilus 2014). Ainda foram realizadas análise taxonômicas visando a determinação linhagens monofiléticas por meio da ferramenta TYGS (Type (Strain) Genome Server) com base no parâmetro de hibridização de DNA-DNA (Meier-Kolthoff e Göker 2019).

Avaliação da atividade antifúngico fitopatógeno

Para avaliação do potencial antifúngico foi realizado co-cultivo contra os fitopatógenos *Moniliophthora perniciosa* (Mp01 - fitopatógeno de cultura do cacau), *Fusarium decemcellulare* (Fdc 307 - fitopatógeno de cultura do guaraná), *Colletotrichum scovillei* (2910 - fitopatógeno de plântulas de pimentão e pimentas) e *Fusarium sp.* (MCT1062 - fitopatógeno de fruto tomate) com base na metodologia de (Anith, Nysanth e Natarajan 2021) por 15 dias.

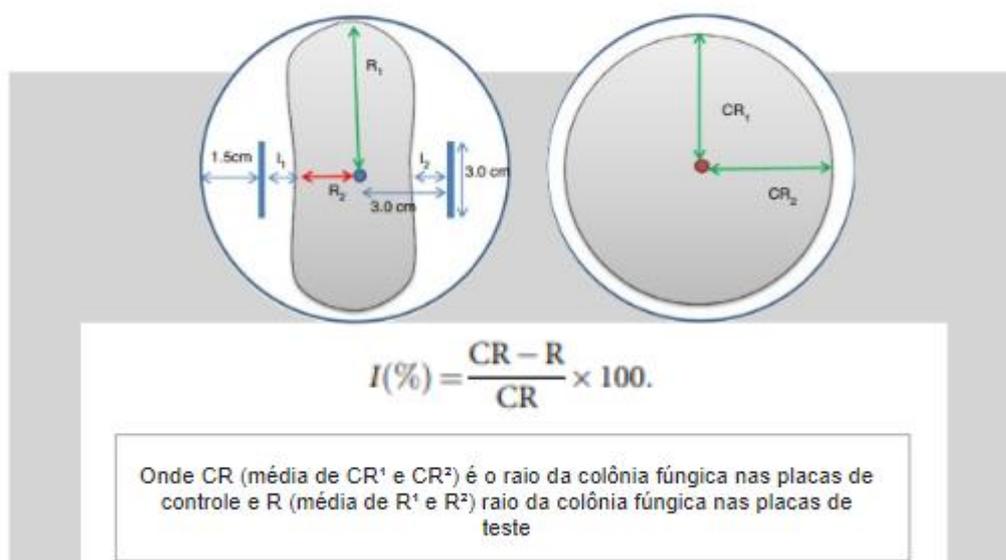


Figura 1: método de co-cultivo modificado. Fonte DOI: 10.1111/lam.13495

Resultados e Discussão

Identificação filogenética do isolado *Bacillus* sp MAD202

Com base na literatura, valores da metodologia hibridização DNA-DNA (dDDH) acima de 70% apontam equivalência de espécie. A análise de filogenômica do isolado MAD 202 apresentou maior valor de dDDH na fórmula d4 com a espécie tipo *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792, com dDDH de 82.68% e com *Bacillus cereus* ATCC 14579, com 70.5%, indicando que o isolado de *Bacillus thuringiensis*, pertencente ao grupo *Cereus*.

Este grupo inclui várias espécies de *Bacillus* com filogenia intimamente relacionada. Os membros mais bem estudados do grupo, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*, este último devido a sua característica inseticida relacionada principalmente à presença de cristais protéicos produzidos durante seu processo de esporulação compostos principalmente por δ -endotoxinas conhecidas como proteínas Cry, as quais possuem ação inseticida contra insetos pertencentes a diversas ordens, mas principalmente Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, sendo atualmente comercializada para uso de biopesticidas (Horta et al. 2017). Baseado nisso foram feitas investigações quanto ao uso isolado de *Bacillus* sp. MAD202 para uso de atividade agrícola.

Entre as 6101 Sequências de Codificação no genoma do isolado MAD 202 apenas 23% (1381) foram classificadas em subsistemas na ferramenta de anotação, em qual os recursos se distribuem em sua grande maioria entre

Aminoácidos e derivados, carboidratos, metabolismo de proteína e cofatores, respectivamente.

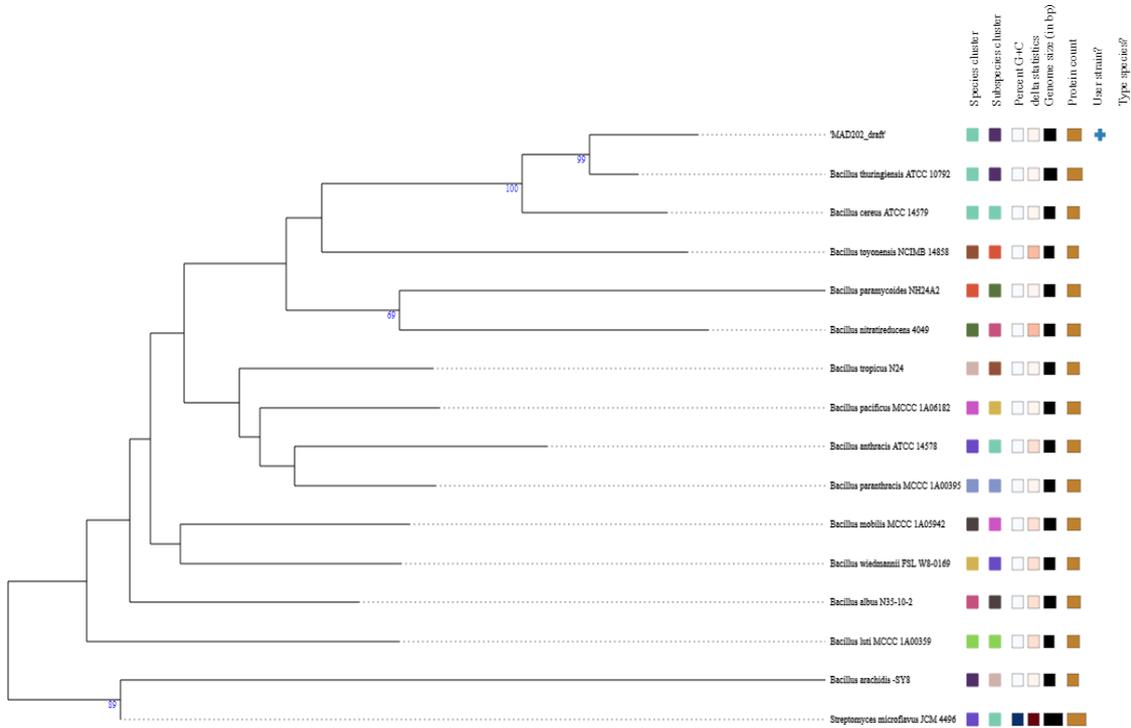


Figura 2 - Arvore filogenética MAD 202 através do genoma Anotação de genoma e caracterização de BGCs

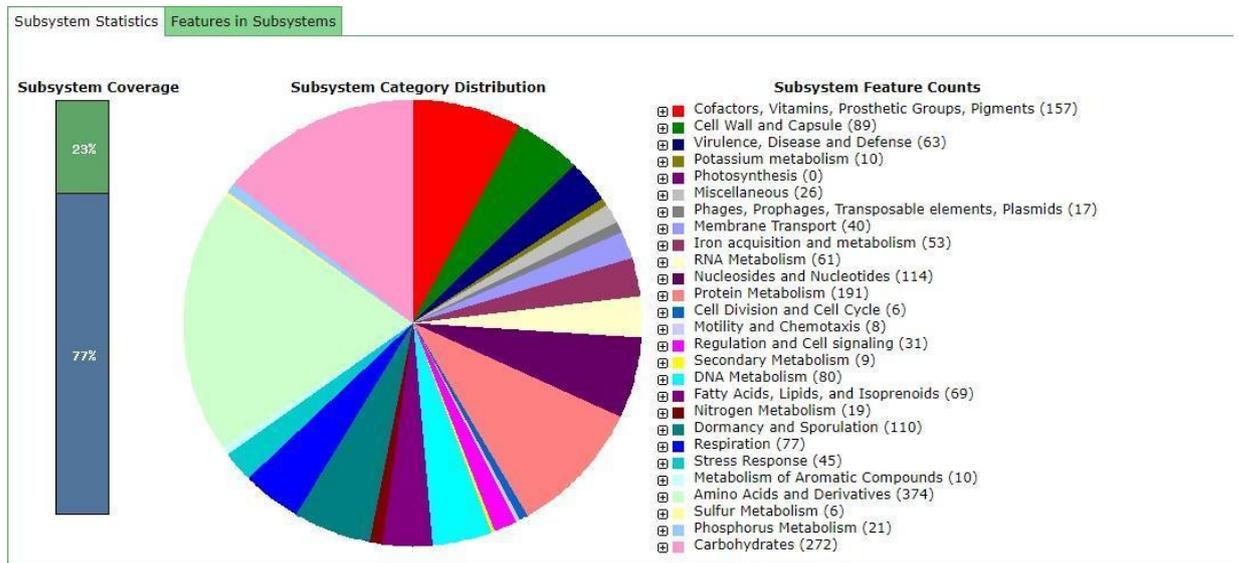


Figura 3 - Classificação de subsistemas de *Bacillus* sp. (MAD 202)

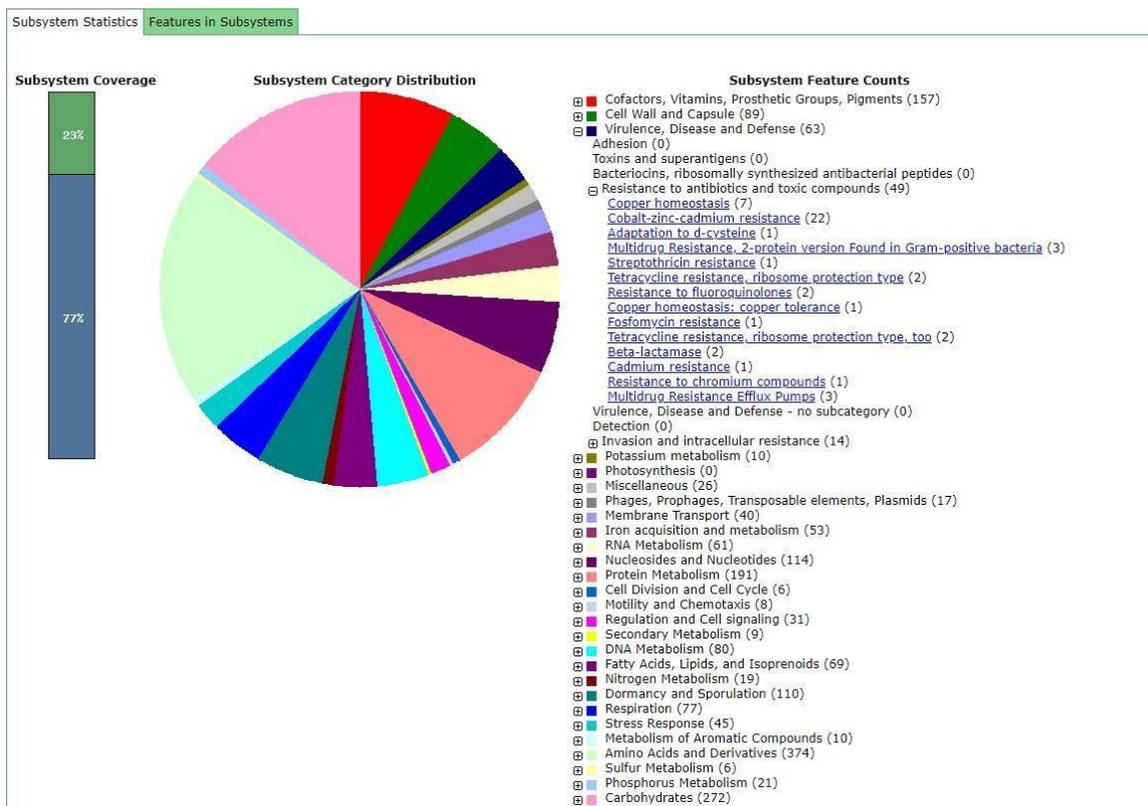


Figura 4 - Demonstração do subsistema de resistência

Por meio desta análise, é possível identificar diversos genes relacionados a resistência antimicrobianos e metais pesados, sobretudo de cádmio, apresentando um gene de resistência e outros vinte e dois ligados a resistência de cobalto, zinco e cádmio.

A destoxificação de cádmio se deve a uma ATPase (CadA), responsável pelo efluxo do metal para fora da célula. Este metal, no interior das células, causa danos irreversíveis para a produção de espécies reativas de oxigênio, redução de taxa de crescimento, diminuição da densidade da parede da célula e causa morte celular (Lee et al. 2001; Fidelis 2013). Além disso, o cádmio é um contaminante ambiental e é capaz de se acumular na cadeia alimentar, causando danos no aparelho digestório dos infectados. Portanto, a identificação de genes de resistência a esses metais pode ajudar na elaboração de estratégias para a biorremediação de ambientes terrestres e aquáticos.

A análise de BGCs identificou 13 BGCs, relacionados a produção de NRPs (4), lanthipeptídeos, laderano, Ripp, sideróforos, terpeno e betalactona. Os BGCs relacionados aos sideróforos foram os únicos que tiveram 100% de similaridade com BGCs já caracterizados no repositório MIBiG. Esses foram

relacionados a produção de petrobactina (figura 5) e bacilibactina (figura 6) Os demais BGCs apresentaram menos de 80%, demonstrando ser vias ainda não caracterizadas.

A produção de sideróforos é benéfica para as plantas ao disponibilizar o íon Fe, auxiliando na nutrição (mecanismo direto) ou reduzindo a competitividade dos patógenos transmitidos pelo solo ao limitar este nutriente (mecanismo indireto), além de atuar também na biorremediação (Tank et al. 2012; Sah e Singh 2015; Saha et al. 2015; Pahari et al. 2017; Veloso 2019).

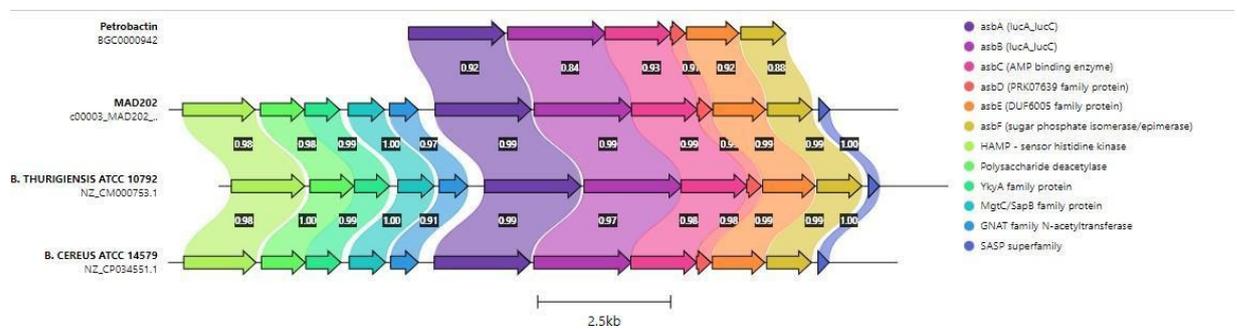


Figura 5: Sintenia entre os genes relacionados com a biossíntese de petrobactina e BGCs (biosynthetic gene clusters) localizados em *Bacillus thuringiensis* MAD 202, *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 e *Bacillus cereus* ATCC 14579

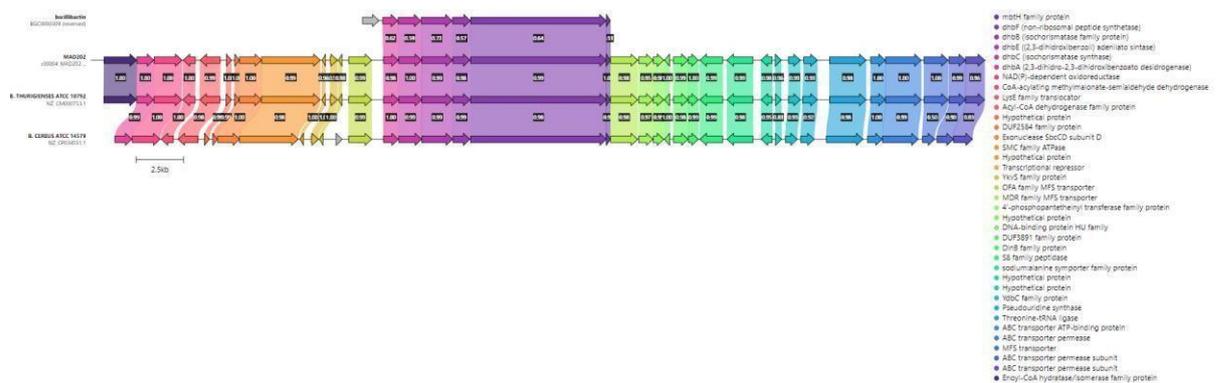


Figura 6: Sintenia entre os genes relacionados com a biossíntese de bacilibactina e BGCs (biosynthetic gene clusters) localizados em *Bacillus thuringiensis* MAD 202, *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 e *Bacillus cereus* ATCC 14579

Avaliação da atividade antifúngico fitopatógono

Os testes *in vitro* apresentaram resultados positivos quanto ao potencial antifúngico em co-cultivo contra os fitopatógenos *Moniliophthora perniciosa* (Mp01), *Fusarium decemcellulare* (fdc 307), *Fusarium* sp. (MCT10621) e

Colletotrichum scovillei (2910), sendo observado a inibição do crescimento micelial via produção de metabólitos secundários.

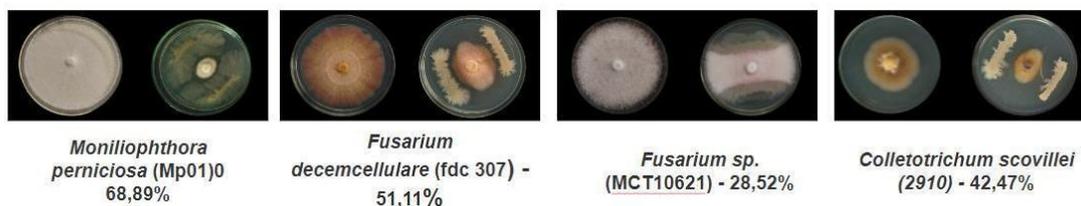


Figura 7 - Teste de co-cultivo MAD202 x Fitopatógenos

Conclusões

O presente trabalho identificou que o isolado *Bacillus* sp MAD 202 é *B. thuringiensis*. A análise genômica revela potencial para resistência e destoxificação do metal pesado cádmio, como também apontam clusters voltados para a produção de sideróforos, enquanto a análise de antagonismo mostrou atividades antifúngicas de *B. thuringiensis* contra *Moniliophthora perniciosa* (Mp01), *Fusarium decemcellulare* (fdc 307) e *Colletotrichum scovillei* (2910).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo suporte financeiro e concessão de Bolsas de estudo obtido a partir do programa Biodiversa (Edital Nº 007/2021). Ao Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES-Procad AmazonMicro, CAPES-Amazônia Legal e a EMBRAPA Amazônia Ocidental pelo apoio a pesquisa.

Referências

Anith, K.N.; Nysanth, N.S.; Natarajan, C. 2021. Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 73(2): 229-236.

Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; Dejongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A. et al 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9(1): 8.

Balbinot, E. 2021. *Workflow científico de anotação genômica funcional e curadoria manual de genomas*. (Repositorio.ucs.br). Acesso em 20 de janeiro de 2023

Barbosa, M.V.; Freire, F.J.; Kuklinsky-Sobral, J.; Silva, M.O.; Costa, D.P. 2009. *Produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar*. Recife, Brasil. Anais congresso Universidade Federal Rural De Pernambuco 9. Universidade Federal Rural De Pernambuco UFRPE.

Beltrán-Pineda, M.E.; Gómez-Rodríguez, A.M. 2016 .Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 12(2): 172-197.

Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N; Lee, S.Y. et al. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* 47(1): 81-87.

Ehling-Schulz, M.; Lereclus, D.; Koehler, T.M. 2019. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum* 7(3): 6.

Eric, S.D.; Nicholas, T.K.D.D.; Theophilus, K.A. 2014. Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA). *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis* 6(1): 1-6.

Fernandes, T.A.; Oliveira, M.C.; Batista, F.C.; Ribeiro, V.P.; Gomes, E.A.; Valicente, F.H.; Oliveira-Paiva, C.A. 2019. Potencial de isolados de *Bacillus thuringiensis* para controle de fungos fitopatogênicos e promoção de crescimento vegetal. Embrapa. (<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1117372/potencial-de-isolados-de-bacillus-thuringiensis-para-controle-de-fungos-fitopatogonicos-e-promocao-de-crescimento-vegetal>). Acesso em 13 de fevereiro de 2023.

Gonçalves Filho, M.A. 2015. Influência do ph da água na gênese de lesões do trato digestório por intoxicação com cádmio em ratos. (<http://bdtd.unoeste.br:8080/tede/handle/tede/723>). Acesso em 13 de fevereiro de 2023.

Lanna Filho, R., Ferro, H. M., & Pinho, R. S. C. de. 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas* 4(2).

Giri, A.; Patel, R.K.; Mahapatra, S.S.; Mishra, P.C. 2013. Biosorption of arsenic (III) from aqueous solution by living cells of *Bacillus cereus*. *Environmental Science and Pollution Research* 20:1281-1291.

Marciel, J.B.S. 2019. Identificação e caracterização de bactérias com potencial para controle biológico. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação. Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil, 35p. (<http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/handle/riuea/3631>).

Meier-Kolthoff, J.P.; Göker, M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications* 10(1).

Meneguzzi, A.; Navroski, M.C.; Lovatel, Q.C.; Marco, F.T.; Pereira, M.O.; Tonetti, E.L. 2015. Ácido indolacético influencia no enraizamento de estacas de *Pittosporum tobira*. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 14(1): 24-28.

PERIAGO, P.M.; Van Schaik, W.; Abiee, T.; Wouters, J.A. 2002. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 68(7): 3486-3495.

Velloso, C.C.V. 2019. Caracterização de cepas de *Bacillus* e avaliação do seu potencial de promoção de crescimento em genótipos de milho. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal De São João Del-rei(UFSJ), Brasil, 143p. (https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/BRCRIS_68cc54a027e68e2383002b7e875ccb65).