

# Caracterização de bactérias antagonistas com alto potencial de inibição do crescimento de *Thielaviopsis paradoxa* quanto à presença de genes para síntese de policetídeos e peptídeos não-ribossomais

Yasmim Sotero Bomfim Fraga<sup>1</sup>, Deise Regina dos Santos<sup>2</sup>, Renata Rego<sup>3</sup>, Érika Cristina Teixeira dos Anjos Brandão<sup>4</sup>, Leandro Eugenio Cardamone Diniz<sup>5</sup>, Marcelo Ferreira Fernandes<sup>6</sup>

## Resumo

O solo é um ambiente estruturalmente complexo constituindo um importante reservatório da diversidade microbiana. Grande parte desta diversidade ainda permanece desconhecida, uma vez que a maioria dos micro-organismos não são recuperados e cultivados por técnicas convencionais. Bactérias do solo representam uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos, que têm sido associados às vias metabólicas da sintase policetídeo e da sintetase peptídeo não-ribossomal. O objetivo deste estudo foi identificar, por meio de sequenciamento do gene 16S DNAr, 84 isolados de uma coleção de bactérias com potencial de inibição de fungos fitopatógenos e caracterizar os isolados com maiores potenciais de inibição de *T. paradoxa* quanto à presença de genes relacionados à síntese de policetídeos e de peptídeos não-ribossomais, compostos de elevada atividade biológica. A afiliação taxonômica dos isolados antagonistas foi realizada com base nas sequências parciais do gene RNAr 16S. O DNA extraído foi amplificado por PCR utilizando os *primers* 27F e 1488R (ADERIBIGBE et al., 2011). As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram comparadas às sequências de bactérias de cultura-tipo depositadas nas bases de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando

<sup>1</sup> Ciências Biológicas, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>2</sup> Ciências Biológicas, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE.

<sup>3</sup> Ciências Biológicas, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE. Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros,

<sup>4</sup> Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). Os isolados selecionados foram submetidos à pesquisa de genes PKS-1 e NRPS. Para isto, foi realizada a amplificação por PCR de sequências conservadas a partir da utilização de *primers* degenerados específicos descritos na literatura (PARSLEY et al., 2011; SACIDO; GENNILOUD, 2005). A pesquisa dos genes funcionais mostrou que o gene NRPS apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) em relação à inibição do crescimento do *Thielaviopsis paradoxa*, demonstrando a associação deste gene à atividade antagonista frente ao fitopatógeno. Bactérias obtidas de solos supressivos a fusariose coletados em Pernambuco, que apresentam potencial antagonista ao fungo fitopatogênico *Thielaviopsis paradoxa*, pertencem predominantemente à família Bacillaceae. Diversos estudos da literatura afirmam que *Bacillus* spp. predominam entre os gêneros bacterianos com potencial antagonista contra fitopatógenos diversos, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

**Palavras-chave:** síntase policetídeo, sintetase peptídeo não-ribossomal, gene 16S DNAr, gene RNAr 16S, *T. paradoxa*.

## Introdução

O solo é um ambiente estruturalmente complexo constituindo um importante reservatório da diversidade microbiana. Os diferentes perfis dos solos favorecem a formação de microambientes específicos regulados por condições físico-químicas, as quais influenciam diretamente na diversidade dos micro-organismos. Entretanto, grande parte desta diversidade ainda permanece desconhecida, uma vez que a maioria dos micro-organismos não são recuperados e cultivados por técnicas convencionais. Bactérias do solo representam uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos. Segundo Subramani e Aalbersberg (2013) a combinação entre diferentes pré-tratamentos e meios seletivos tem permitido o isolamento de bactérias raras de habitats naturais e, possivelmente de novas fontes de compostos bioativos.

O gênero *Bacillus* é amplamente distribuído no solo, a sua versatilidade metabólica permite a síntese de uma ampla variedade de compostos bioativos estruturalmente complexos, a exemplo dos antimicrobianos. Particularmente, as vias metabólicas da síntase policetídeo e da sintetase peptídeo não-ribossomal têm sido associadas à biossíntese desses compostos (DUNLAP

et al., 2013; HAMDACHE et al., 2011). A detecção de genes que codificam para essas vias tem constituído uma ferramenta adicional para a identificação de isolados que sintetizam esses compostos. O isolamento de bactérias de cultivo raro e comum a partir desses solos pode constituir em uma estratégia de seleção de novos antagonistas potenciais. O uso desses micro-organismos pode representar uma alternativa de controle, sobretudo em decorrência da necessidade de novos cultivares resistentes e da observada redução da eficácia de muitos defensivos agrícolas, bem como dos problemas de ordem ambiental associados ao uso indiscriminado e prolongado destes.

O objetivo deste estudo foi identificar, por meio de sequenciamento do gene 16S DNAr, 84 isolados de uma coleção de bactérias com potencial de inibição de fungos fitopatógenos e caracterizar os dez isolados com maiores potenciais de inibição de *T. paradoxa* quanto à presença de genes relacionados à síntese de policetídeos e de peptídeos não-ribossomais, compostos de elevada atividade biológica.

## Material e Métodos

Uma coleção de 200 isolados bacterianos foi obtida no Laboratório de Microbiologia do Solo a partir de amostras de três solos de Pernambuco reconhecidamente supressivos a fusariose. Estes solos foram providos pelo Dr. Sami Michereff da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Destes 200 isolados, 84 apresentaram atividade inibitória in vitro contra *T. paradoxa* e, ou, *Plenodomus destruens*, o fungo agente causal do mal-do-pé da batata doce, utilizando-se testes de antibiose em placas. Estes 84 isolados constituem a coleção de bactérias antagonistas avaliada neste estudo. Dentre estes, 31 apresentaram extratos extracelulares com inibição >70% do crescimento de *Thielaviopsis paradoxa*. A avaliação da presença dos genes de substâncias de alta atividade biológica, como policetídeos e peptídeos não-ribossomais foi realizada para estes isolados.

A afiliação taxonômica dos isolados antagonistas foi realizada com base nas sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas conforme descrição a seguir. Para a extração do DNA genômico, alíquotas de 100  $\mu$ L dos isolados em estoque foram inoculados em erlenmeyers contendo 20 mL do meio YMA com incubação sob agitação orbital (120 rpm/28°C). As amostras foram

centrifugadas (4000 rpm/4°C/3min), sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* obtido ressuspendido em 200  $\mu$ L de tampão GTE gelado. Posteriormente, foram adicionados 400 $\mu$ L da solução de NaOH (0,2N) 1% SDS com incubação à temperatura ambiente por 5min. Em seguida, foi acrescida uma alíquota de 300 $\mu$ L de acetato de potássio seguido de centrifugação (13000rpm/4°C/15min). Uma alíquota de 750 $\mu$ L do sobrenadante obtido na etapa anterior foi adicionada a 450  $\mu$ L de isopropanol gelado, com centrifugação (13000 rpm/4°C/15 min) a fim de se obter um *pellet*. O *pellet* obtido foi lavado com 1mL de etanol a 70% gelado, sendo posteriormente centrifugado (13000 rpm/4°C/1min). Os DNAs genômicos obtidos foram armazenados em 40  $\mu$ L de tampão TE (pH 8,0) sob temperatura de -20°C. Estes foram quantificados em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c).

O DNA extraído foi amplificado por PCR utilizando os *primers* 27F e 1488R (ADERIBIGBE et al., 2011). As reações para PCR foram preparadas para um volume final de 25  $\mu$ L contendo: 15,5  $\mu$ L de água ultrapura (Milli-Q); 2,5  $\mu$ L de Buffer; 1,25  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>; 0,5  $\mu$ L de dNTP; 1,0  $\mu$ L de cada *primer*; 0,25  $\mu$ L de Taq polimerase (Neotaq); 3,0 $\mu$ L do DNA extraído. A reação da PCR foi realizada em um termociclador Axygen, com a amplificação nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 50°C por 1min, extensão a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 10min. Os produtos resultantes da PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio. Os produtos da PCR foram purificados com o kit GE Healthcare Life Systems, sendo enviados para o sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco, Instituto de Biociências, USP. As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram comparadas às sequências de bactérias de cultura-tipo depositadas nas bases de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997).

Os isolados selecionados foram submetidos à pesquisa de genes PKS-1 e NRPS. Para isto, foi realizada a amplificação por PCR de sequências conservadas a partir da utilização de *primers* degenerados específicos descritos na literatura (PARSLEY et al., 2011; SACIDO; GENNILOUD, 2005), (Tabela 1). As reações da PCR foram preparadas para um volume final de 25 $\mu$ L contendo:

2,5  $\mu\text{L}$  de DMSO 10% (dimetilsulfóxido); 11,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q); 2,5  $\mu\text{L}$  de Buffer; 1,2 5 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP; 1,0  $\mu\text{L}$  de cada *primer*; 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase (Neotaq); 4,0  $\mu\text{L}$  do DNA extraído. As reações da PCR foram realizadas em um termociclador Axygen nas seguintes condições: para o par A3F/A7R: 5 min a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 2 min a 59°C, 4 min a 72°C, com uma extensão final por 10 min a 72°C. Desnaturação por 2 min a 95°C, seguido de 14 ciclos (95°C por 30 seg, anelamento a 63°C (-1°C por ciclo) por 30 seg, e 72°C por 1 min), mais 30 ciclos de amplificação (95°C por 30 seg, 50°C por 30 seg e 72°C por 1 min), com extensão final por 5 min a 72°C para o par 5 LL/4UU (PARSLEY et al., 2011; SACIDO; GENNILOUD, 2005). Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) sendo corado com brometo de etídio, a fim de confirmar a amplificação das regiões gênicas de interesse.

**Tabela 1.** *Primers* selecionados para a amplificação de fragmentos dos genes NRPS e PKS-I.

Gene	<i>Primer</i>	Sequência 5'3'	Fragmento (pb)
NRPS	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	700
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGTA	
PKS-I	5LL	GGRTCNCICIARYTGIGTICIGTICCTGIGC	750
	4UU	MGIGARGCIYTICARATGGAYCCICARCARMG	

**Fontes:** Sacido e Genniloud (2005); Parsley et al. (2011).

## Resultados e Discussão

Os 84 isolados antagonistas selecionados na etapa preliminar do teste qualitativo de dupla camada foram afiliados à família *Bacillaceae* (86%), *Sthaphylococcaceae* (6%), *Paenibacillaceae* (1%) e *Moraxellaceae* (1%). Para os 31 isolados antagonistas a *T. paradoxa* com maior atividade observou-se que estes eram predominantemente afiliados a família *Bacillaceae*, com exceção do isolado DT-192, que foi afiliado a família *Sthaphylococcaceae* (Tabela 2). Ao se levar em consideração o critério de seleção do estudo no que se refere à atividade antagônica dos isolados, os resultados obtidos foram similares aos de Todorova e Kozhuharova (2010) que ao utilizarem um solo sob cultivo (terra preta) sem pré-tratamento de desinfestação, observaram uma predominância de *Bacillus* spp. entre os antagonistas com um percentual de 81,8% do total.

Embora a família *Bacillaceae* seja amplamente distribuída nos solos, em geral a sua dominância não é encontrada em estudos de isolamentos. Alguns fatores podem ser atribuídos a essa predominância, a exemplo da formação de endósporos que pode ter favorecido o isolamento destes micro-organismos em detrimento de outros durante a etapa de utilização dos pré-tratamentos de desinfestação do solo, no qual se utilizou cloramina-T e fenol. Estudos têm demonstrado uma correlação significativa entre a supressividade do solo e a predominância de populações antagonistas específicas (ALVARADO et al., 2007; POSTMA et al., 2008). Segundo Weller et al. (2002), *Bacillus* spp. predominam entre os gêneros bacterianos com potencial antagonista contra fitopatógenos diversos, o que também pode justificar os resultados obtidos no estudo.

Embora os métodos utilizados visassem o isolamento de bactérias de cultivo raro, foi possível observar uma dominância de bactérias pertencentes a famílias já extensivamente descritas na literatura. Vale ressaltar a alta similaridade de alguns dos isolados obtidos no estudo com a espécie *Bacillus toyonensis* (DT-137), recentemente descrita por Jiménez et al. (2013), a qual esta intimamente associada ao grupo do *Bacillus cereus*. O isolamento de bactérias de raro cultivo pode representar à acessibilidade a novas fontes de compostos bioativos que podem ser eficazes para o controle de fitopatógenos.

**Tabela 2.** Afiliação taxonômica dos isolados antagonistas provenientes de solos supressivos obtida por análises comparativas de sequências do gene RNAr 16S.

Isolado	Sequência com máxima similaridade*	Similaridade (%)	Família afiliada
DT-3	<i>Bacillus tequilenses</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-5	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-8	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	98%	<b><i>Paenibacillaceae</i></b>
DT-9	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-12	<i>Bacillus tequilenses</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-40	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-76	<i>Bacillus cereus</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-98	<i>Bacillus tequilenses</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-106	<i>Bacillus cereus</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-110	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-115	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
DT-120	<i>Bacillus cereus</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-136	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-137	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	97%	<i>Bacillaceae</i>
DT-202	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>
DT-214	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	<i>Bacillaceae</i>

\*Similaridade com sequências do banco de dados do NCBI.

Ao analisar a relação entre presença dos genes NRPS, PKS ou do híbrido NRPS-PKS nos isolados com efeito inibitório sobre o crescimento relativo do fitopatógeno *Thielaviopsis paradoxa* foi possível observar que a presença dos genes PKS ou do híbrido NRPS-PKS não apresentou efeito significativo sobre o crescimento de nenhum dos três patógenos (Tabela 3). O gene NRPS apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) em relação à inibição do crescimento do *Thielaviopsis paradoxa*, demonstrando a associação deste gene à atividade antagonônica frente ao fitopatógeno (Tabela 3). Segundo Hamdache et al. (2013) a síntese de antibióticos por *Bacillus* spp. está intimamente associada a via da sintetase peptídeo não-ribossomal.

**Tabela 3.** Efeitos da presença de regiões homólogas aos genes PKS e NRPS nos genomas de bactérias antagonistas sobre o crescimento relativo dos patógenos *Thielaviopsis paradoxa*, de acordo com análises de contrastes de médias.

Efeitos comparados (Contraste)	Isolados antagonistas	Média (Erro Padrão) do crescimento relativo T. paradoxa
<b>Presença de PKS</b>	Com PKS	45,2 (4,82)
$[\mu_{\text{com PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, com NRPS}}]/2 - [\mu_{\text{sem PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{sem PKS, com NRPS}}]/2$	Sem PKS P	59,0 (5,31) Ns
<b>Presença de NRPS</b>	Com NRPS	42,4 (4,72)
$[\mu_{\text{sem PKS, com NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, com NRPS}}]/2 - [\mu_{\text{sem PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, sem NRPS}}]/2$	Sem NRPS P	64,5 (5,47) < 0,05
<b>Efeito aditivo dos dois genes, comparativamente aos efeitos simples</b>	Com PKS e NRPS	43,9 (5,12)
$[\mu_{\text{com PKS, com NRPS}}] - [\mu_{\text{com PKS, sem NRPS}} + \mu_{\text{com PKS, com NRPS}}]/2$	Com PKS ou NRPS P	45,6 (19,02) Ns



## Conclusões

Bactérias obtidas de solos supressivos a fusariose coletados em Pernambuco, que apresentam potencial antagonista ao fungo fitopatogênico *Thielaviopsis paradoxa*, pertencem predominantemente à família Bacillaceae.

A via biossintética do PKS bem como o efeito aditivo NRPS-PKS não apresentou efeito significativo em relação à inibição do crescimento relativo do *Thielaviopsis paradoxa*. Somente a presença do gene NRPS se associou ao efeito inibitório do crescimento relativo do *Thielaviopsis paradoxa*.

## Agradecimentos

À Fapitec pela concessão da Bolsa de Iniciação científica.

## Referências

- ADERIBIGBE, E. Y.; VISESSANGUAN, W.; SUMPAPAPOL. P.; KONGTONG, K.; Sourcing starter cultures for *Parkia biglobosa* fermentation I: Phylogenetic grouping of *Bacillus* species from commercial 'iru' samples. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 2, p. 121-127, 2011.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVARADO, I. C. M.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, A. M. F.; NASCIMENTO, C. W. A. Caracterização de Solos de Pernambuco quanto à Supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 222-228, 2007.
- DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; SCHISLER, D. A. Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: a biocontrol antagonist of Fusarium head blight. **Biological Control**, v. 64, p. 166-175, 2013.

HAMDACHE, A.; AZARKEN, R.; LAMARTI, A.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, p. 685-716, 2013.

HAMDACHE, A.; LAMARTI, A.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 893-899, 2011.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KAMPFER, P.; KOLSTO, A.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J. F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 383-391, 2013.

PARSLEY, L. C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A. M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R. M.; LOPANIK, N. B.; LILES, R. M. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 78, p. 176-187, 2011.

POSTMA, J.; SCHILDER, M. T.; BLOEM, J.; LEEUWEN-HAAGSMA, W. K. V. Soil suppressiveness and functional diversity of the soil microflora in organic farming systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2394-2406, 2008.

SACIDO, A. A.; GENILLOUD, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 10-24, 2005.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare *Actinomycetes*: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 9291-9321, 2013.

TODOROVA, S.; KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1207-1216, 2010.

WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARDENER, B. B. M.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 309-348, 2002.