

# ANÁLISE DE GENOMAS DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

Samuel Felipe Azevedo Galvão<sup>1</sup>

Flávia Ferreira Mendes Guimarães<sup>2</sup>

Eliane Aparecida Gomes<sup>3</sup>

Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>4</sup>

**RESUMO** - O uso de fertilizantes químicos na agricultura, além de gerar altos custos para grandes e pequenos produtores pode causar impactos negativos ao meio ambiente se mal utilizados. Uma alternativa para reduzir o uso dos fertilizantes químicos é utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs). Para tanto, se faz necessário identificar quais cepas dessas rizobactérias possuem genes que auxiliam na promoção de crescimento das plantas. Uma importante ferramenta para identificação dessas cepas é análise de genomas através da bioinformática. Por isso, o objetivo desse trabalho foi identificar a presença de genes relacionados à promoção de crescimento em plantas em diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*. Os genes alvos do trabalho foram os ligados a produção de ácidos orgânicos, absorção de ferro, solubilização de fósforo, produção de antibióticos, entre outros. A partir das análises realizadas foi possível identificar 753 genes distribuídos nas 25 cepas e um maior número de genes relacionados à produção de ácidos orgânicos. Foi possível identificar cepas de *Bacillus thuringiensis* com potencial para serem utilizadas como bioinoculantes. Contudo, as cepas identificadas nesse trabalho deverão ser avaliadas *in vivo* para confirmar sua eficiência como bioinoculantes.

**Palavras-chave:** *Bacillus*. Bioinformática. Biofertilizantes.

**ABSTRACT** - The use of chemical fertilizers in agriculture, besides generating high costs for large and small producers can cause negative impacts on the environment if misused. An alternative to reduce the use of chemical fertilizers is to use plant growth promoting rhizobacteria (RPCPs). Therefore, it is necessary to identify which strains of these rhizobacteria have genes that help promote plant growth. An important tool for identifying these strains is genome analysis through bioinformatics. Therefore, the objective of this work was to identify the presence of genes related to growth promotion in plants in different strains of *Bacillus thuringiensis*. The target genes of this work were those linked to organic acid production, iron absorption, phosphorus solubilization, antibiotic production, among others. From the analyzes performed it was possible to identify 753 genes distributed in 25 strains and a larger number of genes related to the production of organic acids. It was possible to identify strains of *Bacillus thuringiensis* with potential to be used as bioinoculants. However, the strains identified in this study should be evaluated *in vivo* to confirm their efficiency as bioinoculants.

**Key-words:** *Bacillus*. Bioinformatics. Biofertilizers.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios enfrentados pelos produtores no Brasil é o custo da produção dos alimentos e produtos de origem agrícola, sendo o uso de fertilizantes químicos para a

---

<sup>1</sup> Estudante de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida e Bolsista - Embrapa, Sete Lagoas, MG.

<sup>2</sup> Professora/Orientadora - Faculdade Ciências da Vida, Av. Prefeito Alberto Moura, 12632, Bairro das Indústrias, Sete Lagoas, MG.

<sup>3</sup> Pesquisadora/Coorientadora - Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG.

<sup>4</sup> Analista/Coorientador - Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG.

correção do solo um dos fatores mais custosos para o produtor. A necessidade do uso de grandes quantidades desses fertilizantes e seu alto custo implicam diretamente no custo final dos produtos de origem agrícola, causando grandes gastos para os produtores além de altos preços para o consumidor final (BOSOKI *et al.*, 2018).

O uso dos fertilizantes químicos pode gerar também, desequilíbrios ambientais devido ao excesso de nutrientes aplicados ao solo associado à baixa capacidade das plantas de absorver esses nutrientes, como o fósforo, nitrogênio e potássio, que são a base dos fertilizantes NPK. Esses fertilizantes são usados de maneira majoritária na agricultura, e quando usados de maneira indiscriminada ocasionam uma desestabilização dos ecossistemas e levando a uma alteração da microbiota existente no solo (DIAZ *et al.*, 2018), além de causar eutrofização em rios e lagos.

Uma alternativa para reduzir o uso dos fertilizantes químicos e diminuir assim o custo da produção e o impacto causado ao meio ambiente é a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs), as quais vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas por ser beneficiadoras da promoção de crescimento em diversas culturas (DIAZ *et al.*, 2018). As RPCPs podem atuar tanto no controle biológico de fitopatógenos, sintetizar fitormônios, melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas e são capazes também de induzir mudanças fisiológicas melhorando a floração, germinação e estabelecimento das plantas (FREITAS *et al.*, 2004).

Bactérias do gênero *Bacillus* que incluem mais de 60 espécies, vem se destacando em meio às pesquisas por serem bactérias formadoras de esporos resistentes a diversos fatores nocivos como temperatura elevada, radiação e desidratação. Adicionalmente, as bactérias do grupo *Bacillus* são facilmente isoladas em solos, o que contribui para que elas sejam promissoras na produção de biofertilizantes (DIAZ *et al.*, 2018).

Uma importante ferramenta para identificação de cepas bacterianas que podem atuar de maneira direta na promoção de crescimento em plantas de interesse comercial é a bioinformática. Através de análises dos genomas dessas bactérias é possível identificar a presença de genes responsáveis por produzir compostos que podem auxiliar na promoção de crescimento, como genes ligados a produção ácidos orgânicos, a produção de antibióticos, entre outros fatores (VIKRAM *et al.*, 2016).

Programas de uso gratuito, como o BLAST (NCBI, USA) podem auxiliar na pesquisa por cepas capazes de atuar na promoção de crescimento. A partir do genoma sequenciado da bactéria de interesse é possível buscar em diversos bancos de dados, como o NCBI ou Uniprot, as sequências de genes ou proteínas ligados à promoção de crescimento, como por

exemplo, genes responsáveis pela produção de antibióticos. A partir da sequência do gene de interesse podem ser feitas análises de BLAST com finalidade de mostrar se esse gene está ou não presente na cepa estudada através de diversos parâmetros, como sua identidade, seu e-value, entre outros. A partir dessa análise pode se partir para os testes *in vivo*, avaliando o quão eficiente é a cepa para a promoção de crescimento (RANJAN *et al.*, 2015).

Diante do exposto, esse trabalho se justifica pela importância da identificação de cepas capazes de atuar na promoção de crescimento em plantas, e que possam suportar o processo de produção e utilização dos biofertilizantes, auxiliando ambientalmente e economicamente os grandes e pequenos produtores. A utilização das bactérias promotoras de crescimento pode tornar possível absorção dos nutrientes naturalmente presentes no solo pelas plantas, além de aumentar sua produção e diminuir o uso de fertilizantes químicos, os quais oneram os custos finais de produção e podem causar desequilíbrios ambientais se forem utilizados incorretamente.

Diante do exposto esse trabalho procurou responder a seguinte questão: Como identificar cepas de *Bacillus* com potencial para serem utilizadas como bioinoculantes na promoção de crescimento em plantas? Para tanto foi levantada a hipótese de que microrganismos do gênero *Bacillus* possuem genes relacionados à promoção de crescimento em plantas, os quais podem ser identificados pelo uso de ferramentas de bioinformática.

Para testar essa hipótese, esse trabalho foi realizado com objetivo de identificar a presença de genes relacionados à promoção de crescimento em plantas em diferentes cepas de *Bacillus*. Através da utilização do programa Blast® (NCBI, USA) 2.8.0+ foram analisados 25 cepas de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o programa foi criado um banco de dados contendo os principais genes citados na literatura relacionados a promoção de crescimento em plantas e analisado cada genoma individualmente procurando a presença de tais genes, os resultados dessas análises foram filtrados e analisados no Microsoft Excel 2019.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 USO DE FERTILIZANTES QUÍMICOS NA AGRICULTURA**

Pela sua geografia, o Brasil apresenta predominantemente solos de origem tropical, que por definição são de cor avermelhada, profundamente intemperizados e de baixa fertilidade natural, que se desenvolvem sob florestas tropicais úmidas e bastante difundidas

(ALMEIDA *et al.*, 2019). Entretanto, os solos tropicais são muito heterogêneos devido as condições ambientais de onde se originam, fato esse que lhes conferem diferentes potenciais e limitações para o manejo agropecuário (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Devido à essas características do solo brasileiro, o uso de fertilizantes associados a diversas medidas, como a correção de acidez do solo, proporciona uma maior produção agrícola. Todavia, essas medidas devem ser adotadas respeitando as normas técnicas recomendadas (CRUZ *et al.*, 2017).

Os principais nutrientes que são incorporados nos fertilizantes são o nitrogênio (N), o fósforo (P) e o potássio (K), de maneira que os fertilizantes que usam estes nutrientes são chamados NPK (REETZ, 2017). O uso de fertilizantes no Brasil subiu 87% entre os anos de 2000 e 2015. Entretanto, a demanda brasileira de fertilizantes ainda é superior a sua produção nacional, a qual não vem acompanhando através dos anos o aumento da demanda dos fertilizantes pelo setor agrícola (CRUZ *et al.*, 2017).

O mercado brasileiro possui uma estrutura muito concentrada, principalmente no segmento de extração de matérias primas para a produção desses fertilizantes, onde o segmento é controlado por grandes grupos internacionais. O Brasil responde apenas por 2% da produção e 6% do consumo mundial de fertilizantes, tendo um perfil importador. Cerca de 70% das matérias primas para a produção de fertilizantes em território nacional vem de mercado externo (RIBEIRO, 2017).

## 2.2 O USO DE MICRORGANISMOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

Há um grande interesse no uso de rizobactérias que podem atuar como promotoras de crescimento em plantas (RPCP), pois elas podem se tornar alternativas ao uso de fertilizantes químicos, promovendo um grande aumento na produção agrícola (AKINRINLOLA *et al.*, 2018). Essas bactérias são uma gama de microrganismos que colonizam a superfície radicular e podem influenciar no crescimento das plantas. Atualmente a maioria das rizobactérias utilizadas na promoção de crescimento são cepas de *Bacillus* devido a sua capacidade de formar endósporos resistentes ao calor e a dessecação, o que facilita a sua sobrevivência durante a produção e armazenamento (SHAO *et al.*, 2014).

As bactérias promotoras de crescimento podem atuar de maneira direta ou indireta na promoção de crescimento em plantas. De maneira direta atuam por mecanismos de fixação de

nitrogênio, solubilização de fósforo ou mobilização de ferro, podem ainda produzir compostos como ácido indol-acético, citocinina e giberelina. A atuação indireta ocorre quando são responsáveis por suprimir o crescimento ou a atuação de fitopatógenos através de produção de antibióticos e enzimas líticas, competição por nutrientes, ou resistência sistêmica induzida contra patógenos (AKINRINLOLA *et al.*, 2018).

Estudos realizados com cepas BAC03 de *Bacillus velezensis* demonstraram resultados positivos para o crescimento de rabanetes, onde houve um desenvolvimento mais rápido do sistema radicular além das cepas de BAC03 fornecerem nutrientes e exsudatos para as plantas (MENG *et al.*, 2017). O crescimento e disponibilidade de nutrientes em plantas de alface cultivados em sistemas hidropônicos foram avaliados por CEROZI *et al.* (2016) e demonstram que quando tratadas com um mix de bactérias do gênero *Bacillus* acumularam mais massa seca, fósforo e clorofila quando comparadas às plantas controle que não receberam tal tratamento, além de se recuperarem melhor de sinais de clorose severa apresentados em todos os tratamentos realizados durante o estudo.

### 2.3 O GÊNERO *BACILLUS*

As bactérias formadoras do gênero *Bacillus* são em sua maioria gram-positivas, esse grupo é formado por diversas bactérias de grande importância ambiental e em sua maioria não patogênicas. Seu habitat natural é o solo, mas podem ser encontradas também em água, folhas e grãos. A principal característica desse gênero de bactérias é sua capacidade de esporulação, sendo assim quando o ambiente se torna desfavorável, são capazes de produzir esporos que apresentam atividades metabólicas basais e são altamente resistentes, permanecendo em dormência até que as condições ambientais se tornem favoráveis novamente (RABINOVITCH *et al.*, 2016).

Uma das espécies mais estudadas e utilizadas do gênero é o *Bacillus thuringiensis* (BT) que vem sendo utilizado amplamente na agricultura via controle biológico. O BT foi descrito pela primeira vez em 1911 quando foi isolado na Alemanha a partir de traças da farinha por Berliner. Mas já em 1902, no Japão, o pesquisador Ishiwata havia isolado a partir de *Bombyx mori* L. (Bicho-Da-Seda), uma bactéria que posteriormente foi identificada como uma subespécie de *B. thuringiensis* (GALZER *et al.*, 2016).

## 2.4 PRINCIPAIS COMPOSTOS ENVOLVIDOS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

Um dos diversos compostos produzidos por microrganismos rizosféricos que podem auxiliar no desenvolvimento vegetal é o ácido 3-indol acético (AIA) que vem sendo amplamente estudado por desempenhar a função de regulação do crescimento vegetal. O AIA produzido por bactérias promotoras de crescimento pode aumentar tanto o número de pelos radiculares quanto o seu comprimento, aumentando então a área de atuação da raiz e consequentemente tendo uma melhor absorção de nutrientes e água, conferindo uma melhor resistência a solos mais áridos (FLORENTINO *et al.*, 2017).

Outra enzima produzida por RPCP's de fundamental importância para o crescimento das plantas é a ACC Desaminase (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) responsável por clivar o precursor dos etilenos em plantas ACC, em amônia e  $\alpha$ -cetobutirato. Ao diminuir os níveis de ACC nas plantas os microrganismos precursores da ACC Desaminase diminuem os níveis de etileno nas plantas, etileno esse que em altas concentrações inibe o crescimento das plantas podendo levar a sua morte (GLICK, 2014).

As fosfatases produzidas pelas RPCP's são também de grande interesse pois são capazes de promover um melhor aproveitamento do fósforo já presente no solo transformando esse fósforo insolúvel em solúvel e o deixando disponível para as plantas. Bactérias solubilizadoras de fósforo podem também auxiliar as plantas em seu crescimento através da fixação biológica de nitrogênio, da produção de fito-hormônios, e aumentando a disponibilidade de alguns oligoelementos, como zinco e ferro (ALORI *et al.*, 2017).

## 2.5 BIOINOCULANTES E FERTILIZANTES QUÍMICOS

Com uma grande participação no produto interno bruto brasileiro (PIB), o mercado do agronegócio é responsável pela geração de milhares de empregos, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento econômico do país (CRUZ *et al.*, 2017). Com a constante expansão desse mercado, é cada vez mais necessário o uso de fertilizantes químicos, o que onera o custo de produção dos alimentos, principalmente para os pequenos produtores, para a agricultura familiar e de subsistência (ARRUDA *et al.*, 2011)

Os fertilizantes NPK representam custos elevados ao produtor, pois ele terá de fazer a compra de várias toneladas do fertilizante para suprir as necessidades de sua lavoura. Pois é

necessária a aplicação de grandes quantidades destes fertilizantes para suprir a necessidades da maioria das culturas agrícolas, variando de centenas de quilos a toneladas por hectare dependendo da cultura. Ocasionalmente altos gastos para o produtor com a compra desses fertilizantes (ARRUDA *et al.*, 2011).

Já bioinoculantes compostos de rizobactérias podem tratar cerca de 4.000 Kg de sementes ou aproximadamente 50 hectares com apenas 4 litros do produto, ocasionando um custo benefício muito melhor quando comparados a fertilizantes NPK. Mesmo sendo escassos no Brasil e com origem majoritariamente de importação são opções economicamente e ambientalmente viáveis quando comparados a fertilizantes de origem química, além de serem mais amigáveis ao meio ambiente desde que utilizados de maneira correta, pois utilizam microrganismos naturalmente presentes no solo, que tornam disponíveis nutrientes já presentes no solo para as plantas. Devido a esses fatores se vê necessário pesquisas para a produção nacional destes bioinoculantes (HUNGRIA 2011).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi dividido em três etapas, sendo a primeira uma revisão artigos científicos e periódicos nos principais mecanismos de busca acadêmica para a coleta de informações sobre os genes relacionados a promoção de crescimento em plantas, em seguida foi feita a instalação do programa Blast® em Windows e criado o banco de dados. A filtragem e análise dos dados foram feitas no programa Microsoft Excel 2019.

#### **3.1 SELEÇÃO DOS GENES E GENOMAS A SEREM ESTUDADOS**

Através da revisão de artigos científicos nas principais plataformas de busca acadêmicas disponíveis, foi feita uma busca por genes relacionados a promoção de crescimento em plantas presentes em bactérias do gênero *Bacillus*, dando enfoque em genes relacionados a produção de ácidos orgânicos, absorção de fósforo, fito hormônios, Compostos orgânicos voláteis (VOCs) e produção de metabólitos secundários, genes estes possivelmente relacionados à promoção de crescimento.

As sequências dos genes foram buscadas no site National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando os termos de busca: nome do gene juntamente com o termo *Bacillus*. Todos os resultados encontrados para bactérias do gênero *Bacillus* foram selecionados e salvos a sequência fasta de cada gene em um arquivo do Microsoft Word 2019. Posteriormente o arquivo Word foi convertido para o formato .fasta para ser incluído no programa Blast® e realizar as análises. As sequências de DNA dos genes foram traduzidas para proteínas com o auxílio do programa Bioedit e salvas em formato .fasta.

Foram utilizados genomas de 25 cepas de *Bacillus thuringiensis* que já se encontravam sequenciados e disponíveis para uso no banco de dados de microrganismos funcionais da Embrapa milho e sorgo de Sete lagoas.

### 3.2 INSTALAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO BLAST EM WINDOWS

Através do site do desenvolvedor do programa ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastDocs&DOC\\_TYPE=Download](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download)) foi feito o download da versão 2.8.0+ do programa Blast+ para Windows x64, a instalação foi feita no sistema operacional Windows 10 x64 seguindo as instruções do manual de instalação presente no site do desenvolvedor do programa.

Para a criação do banco de dados todos os arquivos de genomas e genes foram copiados para a pasta blastdb dentro da raiz do programa. Para a criação do banco foi seguido o manual de utilização do programa disponível no site do desenvolvedor. Após ser criado o banco de dados foi dado início as análises onde foram considerados os seguintes parâmetros: as análises foram realizadas seguindo a ordem arquivo dos genes x arquivo de genomas. Para a análise foram adotados os parâmetros evaluate 1e-10, valor padrão do programa. Foi adicionado o comando <-best\_hit\_overhang 0.1> para que fossem mostrados apenas os melhores resultados (o valor 0.1 é padrão do programa). Os demais parâmetros não foram alterados e seguidos de acordo com o descrito no manual de usuário do programa. A saída dos dados foi definida para o formato -outfmt 6, formato .txt tabulado para que posteriormente fosse aberto no Microsoft Excel 2019.

### 3.3 FILTRAGEM E ANÁLISE DOS DADOS



Após ser realizada a análise de todos os genomas foi gerado pelo programa Blast uma tabela para cada genoma contendo as principais informações necessárias, cada tabela foi analisada de maneira individual no programa Microsoft Excel 2019. Foram adotados os seguintes parâmetros para a filtragem dos dados: Identidade superior a 50%; e, tamanho mínimo de 200aa. Posteriormente, foram classificados de acordo com sua função e selecionados os melhores resultados. Foi criado então uma tabela matriz contendo todos os genes encontrados relacionando os genomas com cada gene encontrado e sua respectiva função.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 NÚMEROS TOTAIS DE GENES ENCONTRADOS.**

O número total de genes por cepa de *Bacillus*, bem como a distribuição dos genes por função, estão representados na tabela 1. Foram encontrados um total de 753 genes distribuídos em 25 cepas de bacillus, as quais apresentaram números totais de genes bem próximos entre elas. Foi possível verificar também que o número de genes iguais ou muito próximos por função foram semelhantes (TABELA 1).

Dentre as cepas estudadas podemos destacar a cepa 2 e 6 que obtiveram o maior número de genes encontrados, sendo um total de 35 genes. Apesar do número total de genes serem idênticos nas duas cepas, cabe ressaltar que com relação ao número de genes por função as duas cepas se diferenciaram. A cepa 2 se sobressaiu em relação a cepa 6 nas categorias de absorção de ferro e na produção de compostos orgânicos voláteis. Já a cepa 6 se sobressaiu em categorias como a produção de ácidos orgânicos e metabolismo de fósforo. Nas demais categorias as duas cepas se mantiveram iguais em relação ao número de genes encontrados por função (TABELA 1).

As cepas 11 e 21 apresentaram menor número de genes totais com 26 e 25 genes totais, respectivamente. As cepas 11 e 21 foram as duas únicas cepas analisadas que não apresentaram genes para a produção de fito hormônios. Quando analisadas outras categorias de genes as duas cepas se diferenciam nas categorias de produção de antibióticos, em que a cepa 11 apresentou 1 gene relacionado a função, enquanto a cepa 21 não apresentou genes para essa função. Já na categoria de produção de ácidos orgânicos a cepa 11 apresentou 7

genes enquanto a cepa 21 apresentou 6 genes. Na categoria de produção de compostos orgânicos voláteis a cepa 21 apresentou 3 genes enquanto a cepa 11 apresentou 2 genes. Nas demais categorias as duas cepas apresentaram número de genes totais iguais entre si (TABELA 1).

**TABELA 1.** Número total de genes encontrados em 25 cepas de *Bacillus thuringiensis* e distribuição em classes de acordo com a função do gene.

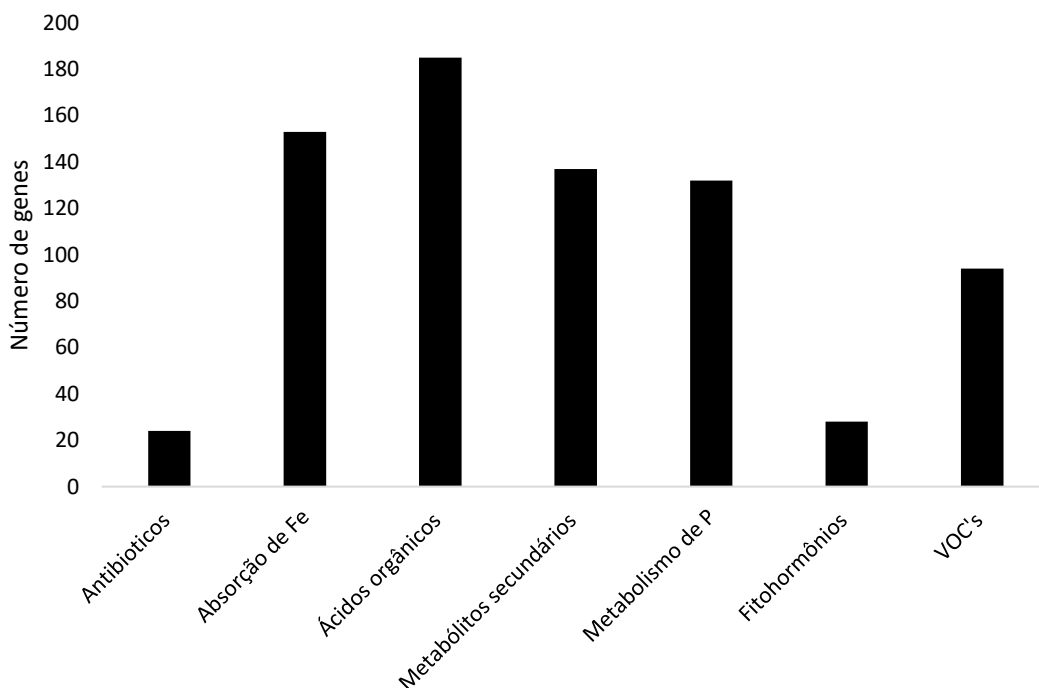
CEPA	Antib <sup>*</sup>	Absorção de Fe	Ácidos orgânicos	Metabolismo secundário	Metabolismo de P	Fito <sup>+</sup>	VOC <sup>#</sup>	Total
1	1	7	8	5	6	2	5	34
2	1	9	8	5	5	2	5	35
3	1	5	6	8	5	1	6	32
4	1	6	7	6	6	2	4	32
5	1	6	8	5	6	2	5	33
6	1	6	9	5	8	2	4	35
7	1	6	5	5	6	1	3	27
8	1	6	8	7	5	1	3	31
9	1	6	8	6	5	1	4	31
10	1	6	8	6	5	1	4	31
11	1	6	7	5	5	0	2	26
12	1	6	7	6	5	1	3	29
13	1	6	6	4	6	1	4	28
14	0	6	7	5	4	1	4	27
15	1	6	8	6	5	1	3	30
16	1	6	7	6	5	1	4	30
17	1	6	6	6	5	1	3	28
18	1	6	8	6	5	1	4	31
19	1	6	8	5	5	1	4	30
20	1	6	8	5	5	1	4	30
21	0	6	6	5	5	0	3	25
22	1	6	9	5	5	1	3	30
23	1	6	8	4	5	1	3	28
24	1	6	8	5	5	1	3	29
25	2	6	7	6	5	1	4	31

\* Genes relacionados à produção de antibióticos; <sup>+</sup> Genes relacionados à produção de fitohormônio; <sup>#</sup> genes relacionados à produção de compostos orgânicos voláteis.

**Fonte:** Próprio autor.

Com relação ao número de genes por categoria procurada foi possível verificar que a categoria de produção de ácidos orgânicos apresentou o maior número de genes, seguido da categoria de absorção de ferro, produção de metabólitos secundários e metabolismo de fósforo (FIGURA 1). Quando analisado por categoria, foi possível notar que a categoria com um maior número de genes encontrados foi a de produção de ácidos orgânicos com um total de 185 genes distribuídos entre as 25 cepas, seguida pelas categorias de absorção de ferro,

produção de metabolitos secundários e absorção de P com 148, 137 e 132 genes, respectivamente. Já as categorias de produção de antibióticos e fito-hormônios foram as que obtiveram os menores números de genes, sendo 24 e 28 genes, respectivamente (FIGURA 1).



**Figura 1.** Distribuição em classes dos genes encontrados em 25 cepas de *Bacillus thuringiensis*.

**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.2 GENES ENCONTRADOS E SUAS FUNÇÕES

Foi possível observar a presença de genes relevantes para a promoção de crescimento em plantas nas cepas estudadas, como demonstrado na tabela 2. Foram encontrados genes que podem agir tanto de forma direta ou indireta no crescimento das plantas.

Foi possível destacar genes importantes como *Fhub* ligado a absorção de ferro, gene esse que produz a proteína iron(3+)-hydroxamate responsável por lixiviar metais pesados promovendo uma biorremediação do solo e um melhor crescimento e desenvolvimento das plantas em solos contaminados por metais pesados (GROBELAK *et al.*, 2017). Outro gene observado foi o *DJ95\_RS13585* responsável pela produção da proteína oxalate decarboxylase um ácido orgânico responsável por catalisar a reação que transforma o ácido oxálico (toxina alimentar com efeitos negativos para a nutrição humana) em ácido fórmico e dióxido de

carbono (CHAKRABORTY *et al.*, 2013). Outro ácido orgânico observado foi a proteína isochorismate synthase produzida pelo gene *BG05\_RS20090* que participa da via de formação do ácido salicílico, que atua na mediação da defesa das plantas como patógenos, se acumulando nas folhas infectadas em resposta ao ataque de patógenos (WILDERMUTH *et al.*, 2001).

**TABELA 2.** Principais genes encontrados em diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* e suas respectivas funções.

Classe	Gene	Nº cepas com o gene	Função do gene
<b>Produção de antibióticos</b>	AQ980_RS17130	23	Thioesterase
	BPMYX0001_RS29720	1	Non-ribosomal peptide synthetase
<b>Absorção de Ferro</b>	fhuC	23	Iron compound ABC transporter ATP-binding
	entC	25	Isochorismate synthase
	fhuD	25	Iron ABC transporter substrate-binding
	YBT1518_RS07460	25	Esterase
	fhuB	25	iron(3+)-hydroxamate
	BC1326	25	Phosphonoacetaldehyde hydrolase
	<b>Produção de ácidos orgânicos</b>	mleN	22
BC1709		22	Malate-2H <sup>+</sup> /lactate-Na <sup>+</sup> antiporter
BC5057		24	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase
BCER98_RS18985		3	L-lactate permease
BG05_RS20090		16	Isochorismate synthase
AQ980_RS27060		25	L-lactate permease
S101359_RS15745		25	Two-component system response regulator dcur
1 BGLY_RS19700		17	Cupin domain-containing protein
BPMYX0001_RS27760		3	L-lactate permease
BC5228		15	L-lactate permease
DJ95_RS13585		2	Oxalate decarboxylase
BG05_RS28115		4	L-lactate permease
nhaC2		1	Malate-2H <sup>+</sup> /lactate-Na <sup>+</sup> antiporter
<b>Metabólitos secundários</b>	hutI	19	Imidazolone-5-propionate
	BG05_RS07665	3	O-succinylbenzoate-coa ligase
	BG05_RS13650	8	Imidazolonepropionase
	AQ980_RS09180	24	Glyoxal reductase
	AQ980_RS05460	23	2-succinylbenzoate-coa ligase
	BAMF_RS39605	3	Imidazolonepropionase
	BG04_RS16750	2	Glyoxal reductase
	menE	2	O-succinylbenzoic acid-coa ligase
	BAMF_RS35785	2	Isochorismate synthase
	BG05_RS06625	13	Aldo/keto reductase

	UP17_RS22185	1	2-succinylbenzoate-coa ligase
	BF29_RS01390	2	Hemolysin D
	BCER98_RS11760	8	Midazolonepropionase
	BA_5108	13	2-succinylbenzoate-coa ligase
	BAMF_RS34905	1	2-succinylbenzoate-coa ligase
	BPMYX0001_RS09205	1	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component
	BAMF_RS34150	1	Glyoxal reductase
	BC4851	2	2-succinylbenzoate-coa ligase
<b>Metabolismo de P</b>	ppaC	24	Inorganic pyrophosphatase
	pstC	23	Phosphate ABC transporter permease subunit
	phoH	25	Phoh family protein
	pstA	24	Phosphate ABC transporter membrane subunit
	AQ980_RS22790	25	Phosphonoacetaldehyde hydrolase
	UP12_RS16915	2	Acetolactate decarboxylase
<b>Produção de Fito-hormônio</b>	BC2433	23	Indole-3-pyruvate decarboxylase
	BA_2486	2	Indole-3-pyruvate decarboxylase
<b>VOCs</b>	BG05_RS10510	22	Superoxide dismutase
	BG04_RS15425	1	Alpha-acetolactate decarboxylase
	AQ980_RS25445	24	Alpha-acetolactate decarboxylase
	BC0884	5	Alpha-acetolactate decarboxylase
	BG05_RS26765	1	Alpha-acetolactate decarboxylase
	BF29_RS07220	13	Alpha-acetolactate decarboxylase

**Fonte:** Próprio autor.

Foi possível também observar genes importantes como os responsáveis pela produção das fósfatases, pois o fósforo é o segundo nutriente mais importante para as plantas, apesar de ser abundante no solo, está na maioria das vezes em sua forma insolúvel e indisponível para as plantas. Com a liberação das fosfatases ele se torna solúvel e pode ser absorvido e utilizado pelas plantas, sendo possível a redução da adição desse nutriente de forma artificial no solo (OTEINO *et al.*, 2013). Outro gene importante observado foi o *BC2433*, responsável, pela produção do fito-hormônio indole-3-pyruvate decarboxylase, o principal intermediário para a formação do ácido indol acético (AIA), um fito-hormônio responsável pelo alongamento e diferenciação celular e divisão das células vegetais (ALBERTINI, 2017).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização das análises de bioinformática foi possível observar que as todas as 25 cepas de *Bacillus* estudadas apresentaram genes associados à promoção de crescimento em plantas, e, portanto, todas elas possuem potencial para serem utilizadas como bioinoculantes. Genes produtores de proteínas ligadas a funções como absorção de ferro, metabolismo de fósforo, entre outros encontrados nas cepas estudadas podem ser de grande ajuda no desenvolvimento de culturas de grande impacto econômico barateando o seu custo de produção e promovendo um melhor aproveitamento de nutrientes já presentes no solo, sendo também de grande importância ambiental prevenindo um desequilíbrio do ecossistema com a adição de nutrientes.

Espera-se que bactérias promotoras de crescimento em plantas possam ser amplamente utilizadas em programas de melhoramento vegetal, ocasionando um melhor desenvolvimento das principais culturas agrícolas e promovendo conseqüentemente uma alta na produção de alimentos e uma queda no custo de produção para grandes e pequenos produtores, além de reduzir impactos ambientais causados pelo uso de fertilizantes de origem química. Ainda e preciso avaliar o comportamento das cepas estudadas com testes realizados *in vivo* para comprovar sua eficiência na expressão desses genes presentes e na produção das proteínas de interesse para a promoção de crescimento. Pois apenas a confirmação da presença do gene pelas análises de bioinformática não é suficiente para afirmar com certeza a eficiência da cepa como bioinoculante, sendo necessário testes laboratoriais e em casas de cultivo para a confirmação da eficiência das cepas estudadas.

## **REFERÊNCIAS**

ALBERTINI, J. **Produção de ácido indol acético in vitro por *Torulaspora globosa*** / JéssicaAlbertini. -- 2017. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras 55 f. : 30.

ALMEIDA, E.P.C; ZARONI, M.J; SANTOS, H.G: **Solos Tropicais**. ageitec Agencia Embrapa de informação tecnológica. disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos\\_tropicais/arvore/CONTAG01\\_1\\_2212200611535.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/solos_tropicais/arvore/CONTAG01_1_2212200611535.html) acessado em: 28/03/19

ALORI E.T; GLICK B.R; BABALOLA O.O: **Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture**. Front. Microbiol. 8:971. doi: 10.3389/fmicb.2017.00971, 2017.

- AKINRINLOLA, R. J; YUEN. G. Y; DRIJBER, R. A; ADESEMOYE A. O: **Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits.** Hindawi International Journal of Microbiology Volume, Article ID 5686874, 2018.
- ARRUDA, O. G. *et al.* **Comparação de custos de implantação de eucalipto com resíduo celulósico em substituição ao fertilizante mineral.** Rev. Ceres, Viçosa, v. 58, n.5, p. 576-583, set/out, 2011.
- BOSOKI, R; *et al.* **Otimização econômica na seleção de fertilizantes em propriedades rurais.** Gl. Sci Technol, Rio Verde, v.10, n.02, p.1-12, mai/ago. 2017.
- CEROZI, B. S; FITZSIMMONS, K: **Use of Bacillus spp. to enhance phosphorus availability and serve as a plant growth promoter in aquaponics systems.** Department of Soil Water and Environmental Science, The University of Arizona, P.O. Box 210038, Tucson, AZ 85721-0038, United States. Scientia Horticulturae 211, 277–282, 2016.
- CHAKRABORTY, N; GHOSH, S; NARULA, K; TAYAL, R; DATTA, A; CHAKRABORTY, S; GHOSH. R; **Reduction of Oxalate Levels in Tomato Fruit and Consequent Metabolic Remodeling Following Overexpression of a Fungal Oxalate Decarboxylase.** National Institute of Plant Genome Research, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi 110067, India. May 2013. DOI:<https://doi.org/10.1104/pp.112.2091977>.
- CRUZ, A. M; PEREIRA, F. S; FIGUEIREDO. V. S: **Fertilizantes organominerais de resíduos do agronegócio: avaliação do potencial econômico brasileiro.** Indústria química | BNDES Setorial 45, p. 137-187, 2017.
- DIAZ, P. A. E; **Bacillus spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão.** Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2018vii, 46p.
- FLORENTINO, L; SILVA, A; LANDGRAF, P., & SOUZA, F.:**Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (Lactuca sativa L.).** Revista Colombiana De Ciências Hortícolas, 11(1), 89-96, 2017.
- FREITAS, S, S; VILDOSO C.I.A; **Rizobactérias e promoção do Crescimento de plantas cítricas - R. Bras. Ci. Solo,** 28:987-994, 2004.
- GALZER, E. C. W; FILHO, W. S. A: **Utilização do Bacillus thuringiensis no controle biológico de pragas.** Laboratório de Entomologia, Universidade de Caxias do Sul/CARVI, Revista interdisciplinar de ciência aplicada, Vol. 1, No 1, 2016.

GLICK, B. R: **Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world.** Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1a. *Microbiological Research* 169, 30– 39, 2014.

GROBELAK, A; HILLER, J; (2017) **Bacterial siderophores promote plant growth: Screening of catechol and hydroxamate siderophores, *International Journal of Phytoremediation*, 19:9, 825-833, DOI: 10.1080/15226514.2017.1290581** 2017.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325).

MENG, Q; JIANG, H.E; HAO, J.J: **Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth.** School of Food and Agriculture, University of Maine, Orono, ME 04469, USA. *Biological Control* 98, 18–26, 2016.

OTEINO, N; RICHARD D. LALLY, R. D; KIWANUKA, S; LLOYD, A; RYAN, D; KIERAN J, G; DAVID N, D; **Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates.** Department of Science and Health, EnviroCore. The Dargan Research Centre, Institute of Technology Carlow, Carlow, Ireland.

RABINOVITCH, L; VIVONI, A. M: ***Bacillus e Bacillus cereus* com suas facetas como bactérias esporuladas Gram-positivas.** *Ciências farmacêuticas* Mai/Jun 2016.

RANJAN, R; *et al.* **Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 (2016) 967e977.

REETZ, H. F: **Fertilizantes e seu uso eficiente Harold F. Reetz, Jr; Tradução: Alfredo Scheid Lopes.** – São Paulo: ANDA, 178 p.: il.; PDF, 2017.

RIBEIRO, J. V; LEITE, M. M. B: **Solução logística para importação de fertilizantes Estudo de caso para o Mato Grosso.** Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Departamento de Economia, Administração e Sociologia Grupo de Pesquisa e Extensão em Logística Agroindustrial (ESALQ-LOG), 2017.

SHAO, J; ZHANG N. X; SHEN, Q; ZHANG, R: **Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9.** *Biol Fertil Soils* 51:321–330 DOI 10.1007/s00374-014-0978-8, 2015.

VIKRAM, A; NAM, S; SODING, J; LUPAS, A. N: **The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis.** W410–W415 *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, Web Server issue Published online 29 April 2016 doi: 10.1093/nar/gkw348.



WILDERMUTH, M.C; DEWDNEY J; WU G; AUSUBEL F.M: **Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence.** Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. Nature 2002 May 30;417(6888):571.