

Caracterização molecular de bactérias solubilizadoras de fosfato

Júlia Bárbara Leles dos Santos¹; Ubiraci Gomes de Paula Lana²; Christiane Abreu de Oliveira Paiva²; Eliane Aparecida Gomes²

¹ Bolsista PIBIC/FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida; ² Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Introdução

O fósforo (P) está presente nos mais diversos organismos vivos, principalmente na composição das membranas celulares, ácidos nucléicos, moléculas de ATP e NADPH, sendo considerado um importante elemento para o desenvolvimento dos seres vivos (SIQUEIRA et al., 2004).

O P é um dos nutrientes mais limitantes no desenvolvimento das plantas, afetando drasticamente o rendimento de grãos. O P adicionado no solo na forma de fertilizante reage com argila, ferro e componentes de alumínio no solo, tornando-se menos disponível para as plantas (NOVAIS; SMITH, 1999). Devido aos processos de fixação, este nutriente apresenta baixa mobilidade na maioria dos solos, ficando próximo do local de origem, dificultando a sua absorção pelas plantas (SILVA, 2014). Uma forma de disponibilizar o P para a planta consiste na utilização microrganismos endofíticos e da rizosfera das plantas que apresentam a capacidade de solubilização de P (OLIVEIRA et al., 2011).

Atualmente, a Embrapa Milho e Sorgo possui um banco de microrganismos funcionais, incluindo cepas endofíticas e presentes na rizosfera de milho eficientes na solubilização de P. Dessa forma, a caracterização molecular e filogenética de bactérias nativas de solos brasileiros torna-se importante para a recomendação de estirpes que poderão ser utilizadas como inoculantes nos sistemas de produção agrícola.

O objetivo deste trabalho foi identificar dez estirpes de bactérias eficientes na solubilização de P por sequenciamento do gene 16S rDNA e avaliar a diversidade genética dessas cepas pela técnica de BOX-PCR.

Material e Métodos

Cepas e condições de cultura

As cepas bacterianas rizosféricas B30K, B32, B70, B116, B119 e endofíticas 1920, 1923, 1940, 2084 e 2088 foram obtidas do banco de microrganismos funcionais

da Embrapa Milho e Sorgo previamente selecionadas com base na alta eficiência de solubilização de P. Estas cepas foram inoculadas em 5 mL de meio LB a partir de colônias isoladas e cultivadas a 28 °C por 48 h com agitação de 150 rpm. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante descartado e adicionado 1 mL de NaCl 0,8% (m/v). As amostras foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado em 567 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0).

Extração de DNA

Para isolamento do DNA genômico das bactérias foram adicionados 30 µL de SDS 10% (m/v) e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL ao precipitado obtido na etapa anterior. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C por uma hora. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de solução de CTAB/NaCl (CTAB 100 mg/mL e NaCl 0,7 M), sendo as amostras agitadas e incubadas a 65 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio/octanol (24:1), as amostras foram homogeneizadas por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol 99% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% (v/v). Os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi retirado em centrífuga a vácuo por 5 minutos. Ao final, o precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10 mM; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg/µL RNase A).

Amplificação e clonagem do gene 16S rRNA

Para identificação molecular das cepas, o gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os primers 8F e 1492R (GALKIEWICZ; KELLOGG, 2008). A reação de PCR foi constituída por 30 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer, 2 µL de tampão de reação 10 X (Invitrogen, EUA), 3 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) em 20 µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min, e alongação final de 72 °C por 5 min. Em seguida, 5 µL do produto da reação de PCR foram misturados com GelRed (Biotium, Leuven, Bélgica) e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) a 100 V.

Para clonagem, 3 µL do produto da reação foram misturados com 1 µL de vetor pGEM-TEasy (Promega, EUA), 5 µL de tampão de ligação (Promega, EUA) e 1 µL de

T4 DNA ligase (10 U/ μ L). A reação foi incubada a 4 °C por 16 h. Cinco μ L da reação de ligação foram utilizados na transformação de *E. coli* DH5 α por choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os clones contendo o inserto de interesse foram confirmados a partir de PCR de colônias de acordo com as condições de amplificação anteriormente descritas. A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) a partir das colônias crescidas em meio de cultura LB com ampicilina (100 μ g/mL) a 37 °C por 16 h.

Sequenciamento do gene 16S rRNA

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se 3,0 μ L do DNA plasmidial contendo o inserto da região 16S rDNA (entre 50 a 100 ng), 0,5 μ L Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, EUA), 1,75 μ L do tampão 5X (Applied Biosystems, EUA), 1 μ L de primer (10 μ M) e 3,75 μ L de água ultrapura. As reações foram incubadas em termociclador a 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes. Nessa etapa, foram utilizados os primers M13 (Promega, EUA) e específicos para o gene 16S rDNA: 8F, 515F, 902R, 1492R (GALKIEWICZ; KELLOGG, 2008). Em seguida, 5 μ L de EDTA 125 mM e 60 μ L de etanol absoluto foram adicionados, as amostras foram incubadas por 20 min no escuro e centrifugadas por 45 min a 4.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 60 μ L de etanol 70% (v/v), sendo os microtubos centrifugados a 4.000 rpm por 10 min, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10 μ L de formamida (Applied Biosystems), desnaturadas a 95 °C por 5 min e injetadas no equipamento ABI3500XL (Applied Biosystems, EUA). As sequências foram analisadas com o software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) e comparadas com o banco de dados público *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta BlastN (ALTSCHUL et al., 1997).

BOX PCR

Para a análise de diversidade genética das cepas eficientes na solubilização de P, as reações de PCR foram constituídas num volume de 20 μ L com 50 ng de DNA genômico, 2 μ L de tampão 10X (Kapa Biosystems, EUA), MgCl₂ 2 mM, 0,125 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Kapa Biosystems, EUA) e 0,5 μ M do primer BOX1R (VERSALOVIC et al., 1994). As condições de amplificação foram 95 °C por 3

min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 3 min, elongação final de 72 °C por 10 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) por 1 h a 100 V, o gel foi corado com GelRed (Biotium, Leuven, Bélgica) e fotografado no equipamento L-Pix Imagem (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Análise estatística

Os perfis de DNA obtidos por BOX-PCR foram analisados pelo software Bionumerics 6.1 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Bélgica), com UPGMA, coeficiente de Jaccard e tolerância de 1%.

Resultados e Discussão

Neste trabalho, primers para amplificação do gene 16S rDNA foram utilizados na identificação molecular de bactérias. Fragmentos de aproximadamente 1.400 pares de base foram amplificados e sequenciados em todas as 10 cepas eficientes na solubilização de P. A comparação com sequências depositadas no Genbank permitiu a identificação dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Ochrobactrum* (Tabela 1).

Os resultados apresentados pela análise dos perfis de DNA por BOX-PCR confirmam as evidências obtidas com o sequenciamento de DNA. O dendrograma mostrou a formação de três grupos: grupo I foi formado pela cepa B32 (*Bacillus*), o grupo II pelas cepas 1923, 1920, 2084 e B116, todas identificadas como *Bacillus* e o agrupamento III pelas cepas B119, B30K, 2088, 1940 e B70, pertencentes a diferentes espécies. As cepas 1920 e 2084, identificadas como *Bacillus subtilis*, apresentaram perfis semelhantes de acordo com a análise por BOX-PCR (Figura 1). Dois dos seis isolados de *Bacillus* avaliados neste trabalho não puderam ter sua identificação resolvida ao nível de espécie e permaneceram em grupos distintos no dendrograma. Embora a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA seja muito útil em trabalhos de classificação bacteriana, para vários gêneros incluindo *Bacillus*, ela apresenta baixo poder discriminatório até espécie (JANDA; ABBOTT, 2007). Utilizando-se também a análise de 16S rDNA, cinco ou seis grupos filogeneticamente distintos no gênero *Bacillus* têm sido relatados (ASH et al., 1991; NIELSEN et al., 1994). Assim, os dois isolados que não se agruparam com as espécies de *B. cereus* e *subtilis* por meio da análise por BOX-PCR podem pertencer a outras espécies do mesmo gênero.

TABELA 1. Identificação molecular das bactérias solubilizadoras de P.

Cepa	16S rDNA (pb)*	Espécie	E-value	Identidade (%)	GeneBank
B30K	1499	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	99	AB695353.1
B32	1512	<i>Bacillus</i> sp.	0	99	JX566648.1
B70	1477	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	95	FJ227280.2
B116	1487	<i>B. cereus</i>	0	99	AB480773.1
B119	1498	<i>P. aeruginosa</i>	0	99	DQ115539.1
1920	1454	<i>B. subtilis</i>	0	99	JN366718.1
1923	1510	<i>B. subtilis</i>	0	98	DQ993674.1
1940	1519	<i>Bacillus</i> sp.	0	99	JX566650.1
2084	1516	<i>B. subtilis</i>	0	99	JN587510.1
2088	1524	<i>Ochrobactrum pituitosum</i>	0	98	NR_115043.1

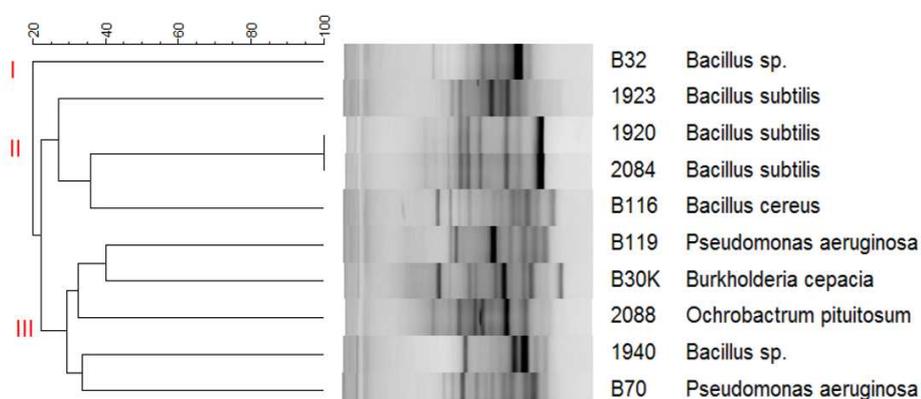


Figura 1. Dendrograma baseado no *fingerprinting* obtido por meio da metodologia de BOX-PCR.

Diversos trabalhos têm mostrado o aumento do crescimento de plantas e absorção de P do solo a partir da utilização de microrganismos com capacidade de solubilizar o fósforo sob condições de casa de vegetação ou campo (HAMEEDA et al., 2008; RICHARDSON; SIMPSON, 2011). Entre a grande diversidade de bactérias com efeitos positivos, incluem-se espécies dos gêneros *Pseudomonas* (KAUR; REDDY, 2015) e *Bacillus* (HAMEEDA et al., 2008). A maioria desses microrganismos promoveu efeitos significativamente positivos sobre o rendimento de grãos, peso seco total e conteúdo de P em plantas de milho.

Os microrganismos identificados e avaliados nesse trabalho têm potencial para o desenvolvimento de biofertilizantes de baixo custo de forma a possibilitar uma diminuição da utilização de fosfatos solúveis, além de permitir a manutenção da produtividade das culturas de uma forma mais econômica e ambientalmente sustentável.

Conclusão

As bactérias solubilizadoras de P analisadas nesse trabalho apresentaram alta diversidade genética, sendo que a maior parte delas foi classificada como *Bacillus*.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fapemig e Embrapa.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

ASH, C.; FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 13, p. 202-206, 1991.

GALKIEWICZ, J. P.; KELLOGG, C. A. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 7828-7831, 2008.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, p. 234-242, 2008.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 2761-2764, 2007.

KAUR, G.; REDDY, M. S. Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. **Pedosphere**, v. 25, p. 428-437, 2015.

NIELSEN, P.; RAINEY, F. A.; OUTTRUP, H.; PRIEST, F. G.; FRITZE, D. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 117, p. 61-65, 1994.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 399 p.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; MUZZI, M. R. S.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, p. 989-996, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, I. H. S. da. **Utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato para aumento da disponibilidade de fósforo no solo**. 2014. Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Ecossistemas) - Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIM, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. (Ed.). **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 117-149.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J. de; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, p. 25-40, 1994.