



## IDENTIFICAÇÃO DE GENES BACTERIANOS PRODUTORES DE FENAZINAS EM SOLOS SUPLEMENTADOS COM ADUBO ORGÂNICO

### *IDENTIFICATION OF BACTERIAL GENES PHENAZINE PRODUCER IN SOIL SAMPLES ADDED WITH COMPOST*

Sonia Villamizar Cancelado <sup>(1)</sup>

Daniel Guariz Pinheiro <sup>(2)</sup>

Juan Carlos Caicedo Cepeda <sup>(3)</sup>

Lucia Maria Carareto Alves <sup>(4)</sup>

#### Resumo

A comunidade microbiana do solo é complexa, possivelmente é o nicho ecológico com maior biodiversidade procariótica, sendo uma extraordinária fonte de genes de interesse biotecnológico e farmacêutico. O processo de compostagem permite a estabilização e saneamento de resíduos orgânicos e o composto gerado fornece uma alta disponibilidade nutricional, favorecendo assim a presença de espécies bacterianas catadoras oportunistas como as Pseudomonadales. Estas bactérias produzem e excretam no ambiente fenazinas como estratégia para garantir a sua adaptação, defesa e competitividade. As fenazinas têm despertado um grande interesse na pesquisa mundial por suas potenciais aplicações biotecnológicas na indústria agrícola, como biocontroladores de fitopatógenos procariotos e eucariotos, indutores de resistência sistêmica e promotores de crescimento em plantas. Métodos independentes de cultivo e análises de bioinformática acoplados às técnicas dependentes de cultivo, permitiram o isolamento e identificação de bactérias produtoras de fenazinas do complexo *Pseudomonas fluorescens*, em amostras de solo da horta da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, suplementado durante cinco anos com composto orgânico. A caracterização dos isolados dos genes produtores de fenazinas do operon *phz* está em andamento. A estrutura química das fenazinas será determinada por técnicas cromatográficas e seu potencial biocontrolador será avaliado *in vitro*. O conhecimento de novos nichos ecológicos, que promovam a presença e o estabelecimento de bactérias produtoras de fenazinas, torna-se uma ferramenta promissora para o melhoramento e promoção da saúde nas cultivares de importância econômica.

**Palavras chaves:** Composto. Metagenômica. *Pseudomonas*

#### Abstract

*Soil microbial community is complex and could be the ecological niche with the largest prokaryotic biodiversity. Besides It is an extraordinary source of genes with biotechnological and pharmaceutical applications. The composting process enable stabilization and sanitation of organic waste, because It is a high source of nutrients which favors the presence of opportunistic scavengers bacterial species such as Pseudomonadales, which produce and excrete to environment secondary metabolites termed phenazines.*

(1) Doutoranda em Microbiologia Agropecuária pela UNESP, Campus de Jaboticabal-SP. E-mail: soniavc1601@gmail.com

(2) Professor Assistente Doutor UNESP, Campus de Jaboticabal-SP. E-mail: dgpinheiro@fcav.unesp.br

(3) Doutor em Microbiologia Agropecuária UNESP, Campus de Jaboticabal-SP. Docente Universidad de Santander UDES. Programa de Bacteriologia. Grupo Clíniudes Colombia. E-mail: caicedocepda@gmail.com

(4) Professora Doutora UNESP, Campus de Jaboticabal-SP. E-mail: lmalves@fcav.unesp.br

<sup>1</sup>Doutorando em Microbiologia pela UNESP -Rio Claro. Endereço eletrônico: [gabimquiterio@yahoo.com.br](mailto:gabimquiterio@yahoo.com.br).

<sup>2</sup>Doutorando em Microbiologia pela UNESP -Rio Claro Endereço eletrônico: [jaquemcruz@yahoo.com.br](mailto:jaquemcruz@yahoo.com.br)



*These molecules ensure their fitness, defense and competitiveness. The phenazines have been aroused great interest in global research, because their potential applications in agriculture industry as biocontrol agents of phytopathogens (prokaryotes and eukaryotes), systemic resistance inducers and plant growth promoters. Independent culture methods and bioinformatic analysis coupled to cultured methods, have enabled isolation and identification of phenazine producer bacteria, belonging to *Pseudomonas fluorescens* complex from soil samples of Foundation Zoological Park of São Paulo farm, added with organic compost during five years. Characterization of phenazine gene producers (i.e. operon *phz*) of bacterial isolates is ongoing, chemical structure of phenazine will be determined with chromatographic technics, and biocontrol potential of phenazine will be evaluated *in vitro*. Knowledge of new ecological niches that support the presence and establishment of phenazine producing bacteria, becomes a promissory tool for the improvement and health promotion in relevant economic cultivars.*

**Key words:** Compost. Methagenomics. *Pseudomonas*

## 1 Introdução

A comunidade microbiana do solo é altamente complexa, sendo possivelmente o nicho com o maior nível de diversidade procariótico, o que possibilita uma imensa fonte de genes de interesse biotecnológico e farmacêutico. Menos de 1% desta diversidade é cultivável por técnicas tradicionais. Este problema pode ser elucidado pela utilização de abordagens metagenômicas. (DELMONT et al., 2011; SCHLOSS e HANDELSMAN 2003).

A compostagem é um processo que permite a estabilização e saneamento de uma grande variedade de resíduos orgânicos, ocorrendo através da decomposição microbiana acelerada em condições aeróbias da matéria orgânica, gerando um produto final rico em nutrientes chamado de composto, que é usado como um condicionador do solo (EPSTEIN, 1997). A grande disponibilidade nutricional do composto favorece a presença de espécies bacterianas catadoras oportunistas, como as Pseudomonadales (CANCELADO et al., 2014). Estas bactérias usam como estratégia principal, para garantir a sua adaptação, defesa e competitividade, a produção e excreção no ambiente de metabólitos secundários pigmentados conhecidos como fenazinas, que têm a estrutura química aromática e contêm nitrogênio, caracterizam-se por ter uma alta atividade redox (MOORE et al., 2006). As fenazinas têm diversos efeitos antagonísticos diretos sobre os procariotos e efeitos diretos e indiretos incluindo a modificação de várias respostas celulares nos eucariotos e seus tecidos, pois servem como lançadeiras de elétrons que alternam aceptores terminais, modificando os estados redox celulares. Também atuam como sinalizadores celulares que regulam os padrões de expressão gênica e contribuem para a formação de biofilme (CAICEDO et al., 2015).

A utilização das fenazinas na indústria agrícola tem despertado grande interesse na pesquisa mundial em virtude de suas potenciais aplicações biotecnológicas, como



biocontroladores diretos de agentes fitopatogênicos procariotos e eucariotos e como indutores de resistência sistêmica em plantas. Outro efeito benéfico nas plantas é a promoção de crescimento pela disponibilização do ferro por ação de sua capacidade siderófora. (DEEPAK et al., 2016). Os objetivos deste estudo são: (i) isolar e caracterizar bactérias produtoras de fenazinas presentes em amostras de solo da Fazenda Zoológico São Paulo fertilizados com composto; (ii) caracterizar os genes produtores das fenazinas nos isolados bacterianos; (iii) determinar a natureza química das fenazinas produzidas e; (iv) avaliar o potencial biocontrolador das fenazinas produzidas pelos isolados bacterianos frente a agentes fitopatogênicos.

## 2 Material e métodos

Foram usadas para o estudo amostras de solo da horta pertencente à Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) suplementadas durante cinco anos com composto orgânico. O DNA metagenômico da microbiota do solo foi extraído utilizando o kit de isolamento PowerSoil DNA (Mobio, Califórnia, EUA) e posteriormente sequenciado no laboratório de Bioquímica de microrganismos e Plantas multiusuário da FCAV/UNESP, empregando o método de extremos emparelhados (paired-end) no equipamento de última geração HiscanSQ Illumina. As sequências foram trimadas usando os programas Scythe (BUFFALO, [s.d.]); Cutadapt (MARTIN, 2011) e PrinSeq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) obtendo-se valores Phred entre 28 e 40, no programa fastQC e, sugerindo uma confiabilidade de 99.9%. As análises das sequências para estabelecer a diversidade populacional e funcional, foram submetidas no portal MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology, <http://www.mcs.anl.gov/project/mg-rast-metagenomics-rast-server>). Para os perfis de abundância populacional foi usada como fonte de anotações a base de dados M5NR do portal MG-RAST, a qual computa os resultados frente a diversas bases de dados de referência. Os perfis funcionais foram estabelecidos empregando como fonte de dados o subsistema KEGG orthologs, deste mesmo portal.

Para o isolamento e caracterização de bactérias produtoras de fenazinas presentes nas amostras, foram utilizados os meios microbiológicos seletivos e diferenciais King's A e B (KING et al., 1954; MURRAY P. R., et al., 2003) modificados, enquanto que a caracterização bioquímica dos isolados bacterianos foi realizada com o Kit API 20NE (Biomeraux). A caracterização molecular foi feita usando a reação de PCR para amplificar os genes 16S rRNA. Para os genes produtores de fenazinas será feita a reação da PCR usando oligonucleotídeos específicos para a amplificação dos genes core do operon *phz*. A

determinação da natureza química das fenazinas produzidas será realizada empregando a técnica de cromatografia em camada fina e alta resolução (HPLC). O potencial como biocontrolador das fenazinas produzidas pelos isolados bacterianos será testado *in vitro* frente aos fitopatógenos fúngicos.

### 3 Resultados e discussão

No sequenciamento foram obtidas aproximadamente 31.778.845 de sequências de dados brutos de cada amostra, com tamanho médio de  $92 \pm 21$  pb. Após o pré-processamento obteve-se uma quantidade média de 24.266.999 sequências, com tamanho médio de  $95.5 \pm 12$  pb, e contendo em média 87% (21.112.289 sequências) de regiões codificadoras para proteínas (ORF). A classificação taxonômica constitui-se por 1.2% Eucariotos, 1.1% Arqueias e a predominância do domínio Bacteria com 97.5%, onde o filo com maior representatividade foi o Proteobactéria com 43%, no qual a classe Gammaproteobacteria ocupa 6.5%. Os 0.02% restantes receberam classificação taxonômica indeterminada. As análises funcionais mostraram que existem em média 2.458.104 de funções preditas (10,4% de proteínas preditas e 62,3% de proteínas anotadas), exibindo a distribuição funcional de aproximadamente 60.6% de metabolismo, 17.5% de processamento da informação genética, 15.6% de processamento de informação ambiental e 4.1% de processos celulares. (Figura1)

Figura 1- Categorias de distribuição

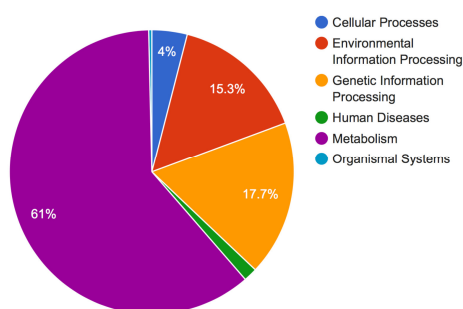
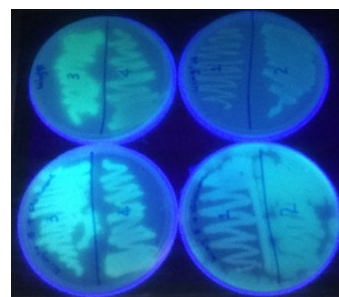


Figura 2- Isolados do complexo *P. fluorescens*



Fluorescência característica da produção de sideróforos

As análises de abundância funcional mostraram uma média de 489 sequências homólogas de proteínas envolvidas na biossíntese de fenazinas (identidade média de 85-95%), correspondendo na sua maioria a bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Bactérias pertencentes ao complexo *Pseudomonas fluorescens* isoladas dos meios microbiológicos exibiram morfologia macroscópica e fluorescência característica (Figura 2). A caracterização molecular está em andamento. O passo a seguir irá determinar a estrutura química e avaliar o potencial biocontrolador das fenazinas.



## 4 Conclusões

Os conhecimentos adquiridos referentes às fenazinas e suas bactérias produtoras indicam que é relevante o entendimento do papel destes compostos no meio ambiente para compreender que a sua atividade biológica depende em grande parte de suas propriedades eletroquímicas, e que a via para a biossíntese das fenazinas é conservada nos microrganismos produtores.

## 5 Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pelo apoio financeiro.

## 6 Referências

BUFFALO, V. Scythe - A Bayesian adapter trimmer. [s.l.: s.n.]. <<https://github.com/vsbuffalo/scythe>>

CANCELADO S.V.; CEPEDA J.C.C.; FERNANDEZ C.C.; VARANI A.M.; E CARARETO A. L.M. Microbiological quality assessment of a compost produced from animal waste and vegetables. **WIT Transactions on Ecology and The Environment**, vol 191, p.1469- 1479, 2014. doi:10.2495/SC141242 2014

CAICEDO J.C.; VILLAMIZAR C.S.; FERRO M.I.T.; KUPPER K.C. e FERRO J.A. Bacteria from the citrus phylloplane can disrupt cell–cell signalling in *Xanthomonas citri* and reduce citrus canker disease severity. **Plant Pathology** 2015. doi: 10.1111/ppa.12466

DEEPAK G. PANPATTE, YOGESHVARI K. JHALA, HARSHA N. SHELAT, AND RAJABABU V. Vyas *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity** Springer India 2016 ISBN 978-81-322-2647-5

DELMONT T.O.; ROBE P.; CECILLON S.; CLARK I.M., CONSTANCIAS F.; SIMONET P. , HIRSCH P.R. , e VOGEL T. M. Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 77, no. 4, p. 1315–1324, 2011

KING E. O.; WARD M. K. e RANEY D. E. J. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Lab and Clin. Med.**, 44:301-307, 1954

MOORE E. R.B.; TINDALL B.J.; MARTINS DOS SANTOS V.A.P.; PIEPER D.H.; JUAN-RAMOS L. e PALLERONI N.J. Nonmedical: *Pseudomonas* **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria** vol 6, p 646-704, 2006. doi: 10.1007/0-387-30746-x\_2

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2011



MURRAY P. R.; BARON E. J.; JORGENSEN J. H.; PFALLER M. A.; YOLKEN R. H.  
**Manual of Clinical Microbiology** , Ed. 8th, ASM, Washington, D.C., 2003

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 2011

SCHLOSS, P. D., AND HANDELSMAN. J. Biotechnological prospects from metagenomics.  
**Curr. Opin. Biotechnol.** 14:303-310, 2003. doi: 10.1016/S0958-1669(03)00067-3