



Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido

**ANÁLISE GENÔMICA E INTERAÇÃO *Bacillus cereus*
COM BANANEIRA**

DÉBORA FRANCINE GOMES SILVA PEREIRA

2021

DÉBORA FRANCINE GOMES SILVA PEREIRA

ANÁLISE GENÔMICA E INTERAÇÃO *Bacillus cereus* COM BANANEIRA

Tese apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Orientadora
Professora Doutora Sílvia Nietzsche

Janaúba
2021

Ficha Catalográfica

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Pereira, Débora Francine Gomes Silva

P436a Análise genômica e interação *Bacillus cereus* com bananeira [manuscrito] / Débora Francine Gomes Silva Pereira – 2021.

53 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2021.

Orientadora: Prof^ª. D. Sc. Sílvia Nietzsche.

1. Bactérias. 2. Bananeira. 3. Crescimento (Plantas). I. Nietzsche, Sílvia. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 634.772

Catálogo: Joyce Aparecida Rodrigues de Castro Bibliotecária CRB6/2445

DÉBORA FRANCINE GOMES SILVA PEREIRA

ANÁLISE GENÔMICA E INTERAÇÃO *Bacillus cereus* COM BANANEIRA

Tese apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 27 de Agosto de 2021.



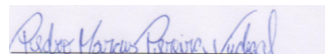
Profa. Dra. Silvia Nietsche
Universidade Federal de Minas Gerais
(Orientadora)



Profa. Dra. Regina C.F. Ribeiro
Universidade Estadual de Montes Claros
(Conselheira)



Profa. Dra. Clívia C. F. Possobom
Universidade Federal de Minas Gerais
(Conselheira)



Prof. Dr. Pedro Marcus Pereira Vidigal
Universidade Federal de Viçosa
(Conselheiro)



Prof. Dr. Mauricio Dutra Costa
Universidade Federal de Viçosa
(Conselheiro)

**Janaúba
2021**

A Deus, à minha família e aos amigos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

À Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida;

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro à pesquisa;

À minha orientadora professora Sílvia e à coorientadora professora Adelica, por todo o apoio, pela paciência, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados;

À professora Olívia, por ter aberto as portas do laboratório de Anatomia Vegetal, compartilhado tempo, conhecimento e ensinamentos;

Ao professor Marlon, pelo apoio na condução do projeto;

A Pedro e a Samuel, por terem aceitado contribuir com a pesquisa e terem participado em todas as etapas do trabalho de forma efetiva.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, pelos conhecimentos transmitidos;

A toda minha família, base das minhas conquistas, em especial, aos meus pais, que várias vezes abriram mão dos seus sonhos para realizarem os meus.

Ao meu esposo, Silvano, e ao meu filho, Davi, que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e nunca me deixaram desistir;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Fitopatologia da UNIMONTES que tornaram a caminhada mais fácil e mais leve;

Gratidão a todos!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	7
GENERAL ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
ARTIGO 1: GENÔMICA ESTRUTURAL DA BACTÉRIA PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS <i>BACILLUS CEREUS</i>	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.2 MATERIAIS E MÉTODO.....	19
1.3 RESULTADOS.....	20
1.4 DISCUSSÃO.....	29
1.5 CONCLUSÃO.....	32
1.6 AGRADECIMENTOS.....	32
1.7 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	33
1.8 REFERÊNCIAS.....	33
ARTIGO 2: FORMAÇÃO DE BIOFILMES E COLONIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE RAÍZES DE BANANEIRA PELA BACTÉRIA PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS EB- 40 (<i>BACILLUS CEREUS</i>).....	37
2.1 INTRODUÇÃO.....	39
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.3 RESULTADOS.....	42
2.4 DISCUSSÃO.....	46
2.5 CONCLUSÃO.....	49
2.6 AGRADECIMENTOS.....	49
2.7 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	49
2.8 REFERÊNCIAS.....	49
3 CONCLUSÃO GERAL.....	53

RESUMO GERAL

Análise genômica e interação *Bacillus cereus* com bananeira

O isolado bacteriano EB-40 tem sido utilizado de forma eficiente na promoção do crescimento de plantas com ênfase na cultura da banana. A sua aplicação induz o alongamento de plantas, aumenta o número de folhas e a produção de cachos. Entretanto, para a produção de um bioinoculante comercial necessita-se de maiores informações sobre os mecanismos de promoção do crescimento vegetal e colonização das raízes de plantas. Para tal, foram realizados dois estudos. No estudo 1, foi realizado o sequenciamento completo do genoma do isolado EB-40 e a identificação de genes associados à promoção do crescimento vegetal. O genoma completo foi sequenciado usando estratégia híbrida com a combinação de *short reads*, sequenciadas usando o *Illumina NextSeq 550*, e *long reads*, sequenciadas usando o Pacbio RSII. A sequência do genoma montado foi comparada com as sequências dos genomas de diferentes bactérias do gênero *Bacillus* disponíveis no banco de dados NCBI *Microbial Genomes*. A similaridade genômica também foi calculada usando a técnica dDDH (*digital DNA-to-DNA hybridization*). Foi realizada também a caracterização bioquímica verificando-se a produção de ácido-3-indol acético, produção de biofilmes e redução do nitrato. O genoma circular completo foi sequenciado com um total de 5.374.645 pb, conteúdo de G+C 35,25% e 5.437 genes foram anotados, incluindo 5.288 CDS (*Coding DNA Sequences*), 42 rRNA, 106 tRNA e 1 tmRNA. Também foram identificados e sequenciados dois plasmídeos completos. O plasmídeo 1 com 215.918 pb, conteúdo G+C 32,61% e 175 CDS. O plasmídeo 2 com 7631 pb, conteúdo G+C 33,85% e 8 CDS. O sequenciamento revelou o total de 5.288 sequências de DNA codificadoras (CDS). Foram atribuídas funções a 2.943 proteínas oriundas da anotação do genoma, as quais foram categorizadas nos grupos funcionais do banco de dados COG. Para 329 proteínas foi atribuída função desconhecida e para 319 previsão de função. Foram identificados genes associados à produção de ácido indol-3-acético, mineralização de fosfato, produção de compostos voláteis e sideróforos. A partir dos resultados alcançados com o sequenciamento completo do genoma do isolado EB-40, foi possível identificar alguns mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal, a exemplo da disponibilização de nutrientes e a produção de fitormônios. Os dados obtidos no presente trabalho permitiram o entendimento das bases genômicas e biológicas dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal exibidos pelo isolado EB-40 (*Bacillus cereus*). Além disso, a sequência de dados obtidos poderá ser usada futuramente para manipulação dos mecanismos de interação planta-microrganismo e produção de bioestimulantes. No estudo 2, avaliou-se a capacidade do isolado de produzir biofilmes, e estruturas indispensáveis à colonização das raízes. A colonização bem sucedida das raízes é fundamental para o estabelecimento do microrganismo no campo. Objetivou-se com o trabalho documentar a produção de biofilmes em *B. cereus* (EB-40) e a capacidade de colonização *in vitro* de raízes de mudas micropropagadas de bananeira “Prata Anã. Para a identificação da produção de biofilmes e sua caracterização, foram coletadas amostras de células bacterianas cultivadas em meio TSA e células bacterianas presentes nas raízes de explantes de bananeira. Os explantes de bananeira foram cultivados em meio de cultura MS sólido e líquido. Foram obtidas imagens de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os biofilmes formados em meio TSA eram compostos por células bacterianas e polímeros capazes de promover a coesão e integridade das células. *B. cereus* foi identificado somente nas raízes cultivadas em meio líquido. A estirpe foi observada nas seções inferiores e posteriores da raiz junto à epiderme, aos ápices e pelos radiculares, formando denso aglomerado de células. A organização de células bacterianas na raiz era mais coesa quando comparado àquele construído em TSA. Os resultados obtidos possibilitaram a caracterização

do biofilme de *Bacillus cereus* e a verificação do seu padrão de colonização nas raízes.

Palavras-Chave: bactéria endofítica, colonização, microscopia, sequenciamento

GENERAL ABSTRACT

Genomic analysis and interaction *Bacillus cereus* with banana

The bacterial isolate EB-40 has been used efficiently in the promotion of plant growth with emphasis on the banana crop. Its application induces the elongation of plants, increases the number of leaves and the production of bunches. However, for the production of a commercial bioinoculant, more information is needed on the mechanisms for promoting plant growth and colonization of plant roots. To this end, two studies were carried out. In study 1, the complete genome sequencing of the EB-40 isolate and the identification of genes associated with the promotion of plant growth were performed. The entire genome was sequenced using a hybrid strategy with a combination of short reads, sequenced using the Illumina NextSeq 550, and long reads, sequenced using the Pacbio RSII. The assembled genome sequence was compared with the genome sequences of different bacteria of the genus *Bacillus* available in the NCBI Microbial Genomes database. Genomic similarity was also calculated using the dDDH (digital DNA-to-DNA hybridization) technique. Biochemical characterization was also performed, verifying the production of 3-indoleacetic acid, biofilm production and nitrate reduction. The complete circular genome was sequenced with a total of 5,374,645 bp, G+C content 35.25% and 5,437 genes were annotated, including 5,288 CDS (Coding DNA Sequences), 42 rRNA, 106 tRNA and 1 tmRNA. Two complete plasmids were also identified and sequenced. Plasmid 1 with 215,918 bp, G+C content 32.61% and 175 CDS. Plasmid 2 with 7631 bp, G+C content 33.85% and 8 CDS. Sequencing revealed a total of 5,288 coding DNA sequences (CDS). Functions were assigned to 2,943 proteins derived from genome annotation, which were categorized in the functional groups of the COG database. Unknown function was assigned to 329 proteins and function prediction to 319. Genes associated with the production of indole-3-acetic acid, phosphate mineralization, production of volatile compounds and siderophores were identified. plant growth, such as the availability of nutrients and the production of phytohormones. The data obtained in the present work allowed the understanding of the genomic and biological basis of the mechanisms of plant growth promotion exhibited by the EB-40 isolate (*Bacillus cereus*). In addition, the sequence of data obtained can be used in the future to manipulate the mechanisms of plant-microorganism interaction and production of biostimulants. In study 2, the isolate's ability to produce biofilms, which are essential structures for root colonization, was evaluated. Successful root colonization is critical for the establishment of the microorganism in the field. The objective of this work was to document the production of biofilms in *B. cereus* (EB-40) and the capacity of in vitro colonization of roots of micropropagated seedlings of banana "Prata Anã". For the identification of biofilm production and its characterization, samples of bacterial cells cultivated in TSA medium and bacterial cells present in the roots of banana explants were collected. Banana explants were grown in solid and liquid MS culture medium. Light microscopy and scanning electron microscopy images were obtained. The biofilms formed in TSA medium were composed of bacterial cells and polymers capable of promoting cell cohesion and integrity. *B. cereus* was identified only in roots grown in liquid medium. The strain was observed in the lower and posterior sections of the root near the epidermis, apices and root hairs, forming a dense cluster of cells. The organization of bacterial cells in the root was more cohesive when compared to that built in TSA. The results obtained allowed the characterization of the *Bacillus cereus* biofilm and the verification of its colonization pattern in the roots.

Keywords: endophytic bacteria, colonization, microscopy, sequencing

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade agrícola enfrentará muitos desafios nos próximos anos, dentre eles, a necessidade de se aumentar a produção e a produtividade das culturas para atender a demanda mundial por alimentos (DOLEY; TERKAR; BORDE, 2020). As projeções indicam que, até 2050, a população global será 50% maior do que a atual, e a demanda por grãos duplicará (PRADHAN et al., 2015). Entretanto, com a crescente urbanização, a área disponível para agricultura será reduzida e, neste cenário, a produtividade dos cultivos deverá ser otimizada (ALEXANDER et al., 2017).

A revolução verde no início dos anos 70 moldou a forma de produção agrícola atual, baseada na monocultura com intenso uso de maquinário, combustíveis fósseis, água, pesticidas sintéticos e fertilizantes (MCKENZIE e WILLIAMS, 2015). Essa estratégia triplicou a produção de grãos, ocasionando redução dos preços dos alimentos e da matéria-prima (PINGALI, 2012). Em contrapartida, o uso de fertilizantes nitrogenados aumentou em 500 %, e o de pesticidas, em 850% (LIU et al., 2015). O uso contínuo e indiscriminado de produtos químicos causou impactos negativos no meio ambiente, no solo, na saúde humana e animal (NAIK et al., 2019).

A pesquisa em todo o mundo está direcionada a buscar meios alternativos de produção ecologicamente corretos que permitam o bom desenvolvimento das plantas e controle das principais pragas e doenças (RAMAKRISHNA, 2019). Nesse sentido, uma das alternativas mais exploradas é o uso de associações planta-microrganismos (NAQQASH et al., 2016). Os microrganismos benéficos podem promover o crescimento das plantas através de efeitos biofertilizantes (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, biodisponibilização de enxofre), bioestimulantes (produção de fitormônios) e de biocontrole (proteção contra microrganismos fitopatogênicos) (HASSANI et al., 2018).

Os bioinoculantes podem ser definidos como produtos contendo microrganismos conhecidos, isolados ou em consórcio, capazes de promover o crescimento vegetal. São adicionados diretamente no solo ou na semente (OWEN et al., 2015). As bactérias promotoras de crescimento de plantas (ou BPCPs) pertencem a um grupo de microrganismos benéficos e heterogêneos que podem ser encontrados na rizosfera, na superfície da raiz ou estar a ela associados, sendo capazes de potencializar o crescimento das plantas e de protegê-las de doenças e estresses abióticos. Algumas das bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia* foram registradas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (GLICK, 1995).

Dentre as várias espécies de BPCPs, destacam-se as espécies do gênero *Bacillus* (KANG et al., 2015). O gênero *Bacillus* foi estabelecido em 1872 por Cohn, e abrange mais de 200 espécies descritas e subespécies pertencentes ao filo Firmicutes. Com base nas características morfológicas, as bactérias desse gênero são descritas como bastonetes, gram-positivos, aeróbios ou facultativamente anaeróbios e catalase-positivos (LUDWING; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009). Os bacilos estão amplamente distribuídos na natureza, ocupando diversos nichos, sendo utilizadas na preparação de produtos medicinais, industriais e agrícolas (RADHAKRISHNAN et al., 2017).

Bacillus spp. produzem uma variedade de compostos envolvidos no biocontrole de patógenos de plantas e na promoção do crescimento vegetal, o que os torna candidatos potenciais para a maioria das aplicações agrícolas e biotecnológicas (MILJAKOVIĆ et al., 2020). São capazes de exibir atividade antagônica pela excreção de metabólitos extracelulares, como antibióticos, hidrolases de parede celular e sideróforos, e melhorar a resposta da planta ao ataque do patógeno, desencadeando a resistência sistêmica induzida (ISR). Além de serem agentes de biocontrole, promovem o crescimento das plantas por meio da fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo ou aquisição de ferro e produção de fitormônios (KUAN et al., 2016).

Os efeitos benéficos do *Bacillus* spp. no crescimento e rendimento das plantas foram demonstrados em várias culturas agrícolas, incluindo trigo, milho, soja, girassol, feijão comum, tomate, pimenta, batata, pepino, banana e muitos outros (ALOO et al., 2019). A BPCP EB-40 (*Bacillus cereus*) linhagem GQ340516.1, foi isolada de tecidos internos de raízes de bananeira (SOUZA et al., 2013), e é positiva para o mecanismo de produção de AIA *in vitro* (ANDRADE et al., 2014). Essa bactéria apresentou efeitos benéficos na bananeira quando foi inoculada em mudas cultivadas em casa de vegetação (SOUZA et al., 2017) e quando aplicada no campo. A EB-40 também aumentou o número de folhas e a produção de cachos na bananeira (SILVA, 2020).

Considerando o seu grande potencial, estudos devem ser conduzidos para caracterizar os seus mecanismos de ação e sua forma de colonização a fim de desenvolver um inoculante em escala comercial. Embora os mecanismos moleculares do reconhecimento, colonização e troca de nutrientes entre plantas e bactérias estejam bem descritos em rizóbios, ainda estão longe de ser totalmente conhecidos em BPCPs (MEENA et al., 2017). Os avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de DNA estão viabilizando, pela redução de custo, o sequenciamento de genomas completos de microrganismos como as BPCPs, a caracterização do conteúdo total de genes, estrutura do genoma e estudos *in silico* de fisiologia, ecologia e

evolução (KHAN et al., 2017; MA et al., 2018).

Por meio do uso de ferramentas de bioinformática, é possível realizar a anotação do genoma, a construção de vias metabólicas e análises comparativas do genoma para a elucidação dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas (BERENDSEN et al., 2015). Os projetos de sequenciamento de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal possibilitam avanços na compreensão desses sistemas (DONOSO et al., 2017).

Outro aspecto a ser elucidado na compreensão dos microrganismos engloba as etapas da colonização bactéria-planta. Para estabelecer a colonização bacteriana ocorre a interação planta - microrganismo seja por ligação não específica (fixação superficial) ou por uma ancoragem firme. A aderência bacteriana (fixação) à raiz depende de uma série de fatores da superfície celular, tais como pili, flagelos e polissacarídeos extracelulares (EPS), seguido pela formação de biofilme (BOGINO et al., 2013).

O biofilme não apenas fortalece a interação entre plantas e BPCPs ao formar poros e redes que facilitam tanto o fluxo de nutrientes e oxigênio, quanto à comunicação intercelular (*quorum sensing*), mas também fornece ao sistema radicular da planta uma barreira protetora contra o ataque de organismos patogênicos (DENG et al., 2015; VLAMAKIS et al., 2013).

Dessa forma, objetivou-se com o presente estudo realizar a montagem do genoma completo do isolado EB-40 e verificar se esse microrganismo é capaz de produzir biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, P.; BROWN, C.; ARNETH, A.; DIAS, C.; FINNIGAN, J.; MORAN, D.; ROUNSEVELL, M.D.A. Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use? **Global Food Security**, v.15, p. 22-32, 2017.

ALOO, B.N.; MAKUMBA, B.A.; MBEGA, E.R. The potential of bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v. 219, p. 26-39, 2019.

ANDRADE, L.F.; DE SOUZA, G.L.; NIETSCH, S.; XAVIER, A.A.; COSTA, M.R.; CARDOSO, A. M.; PEREIRA, M.C.; PEREIRA, D.F.G.S. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v.52, p.27-34, 2014.

BERENDSEN, R. L.; VAN VERK, M. C.; STRINGLIS, I. A.; ZAMIOUDIS, C.; TOMMASSEN, J.; PIETERSE, C. M.; BAKKER, P. A. Unearthing the genomes of plant beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. **BMC Genomics**, v.16, p.530-539, 2015.

BOGINO, P. C.; OLIVA, M. D.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. The role of bacterial

biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.15838-15859, 2013.

DENG, J.; ORNER, E. P.; CHAU, J. F.; ANDERSON, E. M.; KADILAK, A. L.; RUBINSTEIN, G. M.; BOUCHILLON, G.M.; GOODWIN, R.A.; GAGE, D.J.; SHOR, L.M. Synergistic effects of soil microstructure and bacterial EPS on drying rate in emulated soil micromodels. **Soil Biology and Biochemistry**, v.83,p.116-124, 2015.

DOLEY, K; TERKAR, A.; BORDE, M.Applications of Microorganisms in Agriculture.In. ARORA, P. K.**Microbial Technology for Health and Environment**. Singapore: Springer, 2020. v.22, 410p.

DONOSO, R.; NOVOA, P. L.; ZUNIGA, A.; TIMMERMANN, T.; GAJARDO, G. R.; GONZALEZ, B. Biochemical and genetic bases of indole-3-acetic acid (auxin phytohormone) degradation by the plant-growth-promoting rhizobacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.83, p. e01991-01916, 2017

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria.**Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p.109-117, 1995.

KANG, S. M.; RADHAKRISHNAN, R.; LEE, K. E.; YOU, Y. H.; KO, J. H.; KIM, J. H.; LEE, I. J. Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon.**Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science**, v.65, p.637-647, 2015.

HASSANI, M.A.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, v.58, p.1-17, 2018.

KHAN, A. R.; PARK, G. S.; ASAF, S.; HONG, S. J.; JUNG, B. K. ; SHIN, J. H. Complete genome analysis of *Serratiamarcescens* RSC-14: A plant growthpromoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **Plos One**, v.12, p.1-17, 2017.

KUAN, R.; OTHMAN, K.A.; RAHIM, Z.H.; SHAMSUDDIN.Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions.**PLoS One**, v.11, p.1-19, 2016.

LIU, Y.; X. PAN; J. LI. A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.35, p.83-93, 2015.

LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Taxonomic outline of the phylum Firmicutes. In: VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWING, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Singapore: Springer, 2009. v.3, 1450p.

MA, J.; WANG, C.; WANG, H.; LIU, K.; ZHANG, T.; YAO, L.; ZHAO, Z.; DU, B.; DING, Y. Analysis of the complete genome sequence of *Bacillus atrophaeus* GQJK17 reveals its biocontrol characteristics as a plant growth-promoting rhizobacterium.**BioMed Research International**, v. 2018, p.1-9, 2018.

MCKENZIE, F. C.; WILLIAMS, J. Sustainable food production: constraints, challenges and

choices by 2050. **Food Security**, v.7, p. 221- 233, 2015.

MEENA, K. K.; SORTY, A. M.; BITLA, U. M.; CHOUDHARY, K.; GUPTA, P.; PAREEK, A.; SINGH, D. P.; PRABHA, P.; SAHU, P. K.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. B.; KRISHANANI, K. K.; MINHAS, P. S. Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. **Frontiers in Plant Science**, v.12, p.1-8, 2017.

MILJAKOVIĆ D.; MARINKOVIĆ J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v.8, p.1-19, 2020.

NAIK, K.; MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.21, p.1-30, 2019.

NAQQASH, S. T.; HAMEED, A.; IMRAM, M.K.; HANIF, A.; MAJEED, J.D. Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1-12, 2016.

OWEN, D.; WILLIAMS, A.P.; GRIFFITH, G.W.; WITHERS, P.J. A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, v.86, p.41-54, 2015.

PINGALI, P. L. Green revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 12302-12308, 2012.

PRADHAN, P.; FISCHER, G.; VELTHUIZEN, H. V.; REUSSER, D. E.; KROPP, J. P. Closing yield gaps: How sustainable can we be? **Plos One**, v.10, P. 1-18, 2015.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. *Bacillus*: A Biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology**.v.8, p.1-14, 2017.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v.138, p.10-18, 2019.

SILVA, P. D. dos S. Adensamento e uso de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento e aumento da produtividade da bananeira 'Prata Anã, clone Catarina'. 2020. Cap. 2. p. 36-64. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

SOUZA, S. A.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHKE, S. Diversidade bacteriana endofítica em raízes de bananeira 'Prata Anã' (*Musa* spp.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, p. 252-264, 2013.

SOUZA, G. L. O. D.; SILVA, D. F.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; PEREIRA, M. C. T. Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, p.1-10, 2017.

VLAMAKIS, H., CHAI, Y.; BEAUREGARD, P.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Sticking

together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **NatureReviewsMicrobiology**, v. 11, p. 157-68, 2013.

ARTIGO 1: Genômica estrutural da bactéria promotora do crescimento de plantas

Bacillus cereus

Este artigo está formatado nas normas da Revista Genetics and Molecular Research: GMR,

ISSN:1676-5680

Genômica estrutural da bactéria promotora do crescimento de plantas *Bacillus cereus*

Genômica estrutural de *Bacillus cereus*

D.F.G.S. PEREIRA¹

¹Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, Brasil.

Autor correspondente: D. F.G.S. PEREIRA

E-mail: deborafrancinep@yahoo.com.br

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1021-1656>

RESUMO. Bactérias podem estabelecer associações ecológicas com muitos organismos, como fungos, animais e plantas. Em bananeira ‘Prata Anã’ a estirpe bacteriana *Bacillus* sp. (EB-40) foi caracterizada como um endófito capaz de colonizar os espaços inter- e intracelulares de raízes, fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, sintetizar ácido indol-3-acético *in vitro* e promover incrementos no desenvolvimento de mudas micropropagadas de bananeira. Embora tenha sido testado em diversos estudos, o isolado EB-40 ainda não teve seus mecanismos de ação elucidados a partir da perspectiva genômica. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho, realizar o sequenciamento completo do genoma de *Bacillus* sp. (EB-40) para classificá-lo em nível de espécie e decifrar a base genômica dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Para isso, os dados resultantes do sequenciamento em plataforma *Illumina NextSeq 550* de *short read* e em plataforma *Pacbio RSII* de *long reads* de cultura de *Bacillus* sp. (número de acesso GQ340516.1) foram analisados, pré-processados e montados, levando em conta a estratégia híbrida e a abundância e da proporção de conteúdo GC. A sequência do genoma montado foi comparada com as sequências dos genomas de diferentes bactérias do gênero *Bacillus* disponíveis no banco de dados NCBI *Microbial Genomes* e a similaridade genômica também foi calculada usando a técnica dDDH (*digital DNA-to-DNA hybridization*). A caracterização metabólica e bioquímica do *Bacillus* sp. foi avaliada a partir da produção de ácido 3-indol-acético (AIA), produção de biofilmes *in vitro* e redução do nitrato. Os resultados do sequenciamento completo do genoma de *Bacillus* sp. (EB-40) permitiram identificar a espécie, com um valor de dDDH de 90%, como *Bacillus cereus*. Os dados revelaram que a estirpe possui genes associados à produção de fosfatases, auxinas, compostos voláteis e sideróforos. O isolado EB-40 (*Bacillus* sp.) foi identificado em nível de espécie como *Bacillus cereus*. Possui genoma circular com um tamanho 5,37 Mb e dois plasmídeos circulares.

Palavras-chave: endofíticos, Pacbio, Illumina, bioestimulante, rizobactéria

1.1 INTRODUÇÃO

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) pertencem a um grupo de microrganismos benéficos e heterogêneos que podem ser encontrados na rizosfera, na superfície da raiz ou a ela associada, e são capazes de potencializar o crescimento das plantas e protegê-las de doenças e estresses abióticos (Glick, 2012). Aumentam a produtividade das plantas por meio de diversos mecanismos como a promoção do crescimento, fixação de nitrogênio, uso eficiente de nutrientes pela planta, modulação hormonal e inibição do crescimento de microrganismos fitopatogênicos (Timmusk et al., 2017; Gouda et al., 2018).

Dentre as várias BPCPs, destacam-se algumas espécies do gênero *Bacillus* (Kanget et al., 2015). Elas têm sido consideradas boas opções para a formulação de produtos comerciais por sua resistência a condições de estresse devido à formação de esporos, amplo espectro de metabólitos, rápido crescimento em meio líquido e capacidade de colonizar superfícies de plantas (Aloo et al., 2018).

A estirpe bacteriana *Bacillus* sp. (EB-40) foi isolada por Souza et al. (2013) de raízes da bananeira e estudada ao longo de uma década. A estirpe foi capaz de colonizar os espaços inter e intracelulares de raízes de banana (Rocha et al., 2019), fixar nitrogênio, solubilizar fosfato (Souza et al., 2017) e promover incrementos no comprimento, diâmetro do pseudocaulo, massa fresca e massa seca nas mudas micropropagadas de bananeira ‘Prata Anã’ durante o período de aclimação (Souza et al., 2016). Além disso, quando usada em combinação com outras bactérias, aumentou em 174% o peso seco da raiz e proporcionou maior acúmulo de macronutrientes na parte aérea de mudas de bananeira micropropagadas no período de aclimação (Souza et al., 2017). Essas habilidades tornam esse isolado um forte candidato para a formulação de bioinsumos e desta maneira, no ano de 2020 foi depositado na Universidade Federal de Minas Gerais *Know-How* com objetivo de proteção de formulação desenvolvida pelos pesquisadores a partir do isolado EB-40.

Embora tenha sido testado em diversos estudos, o isolado EB-40 ainda não teve seus mecanismos de ação elucidados a partir da perspectiva genômica. Os estudos de genomas são importantes para estabelecer a segurança e a eficiência do microrganismo na microbiologia industrial (Sulthana et al., 2019) e investigar a genética de cepas usadas na fermentação de meios líquidos e sua relação com a produtividade de metabólitos (Deng et al. 2019; Kamada et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo realizar o sequenciamento completo do genoma de *Bacillus* sp. (EB-40) para classificá-lo em nível de espécie e decifrar a base

genômica dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

1.2 MATERIAIS E MÉTODO

Microrganismo e condições de cultivo

A bactéria foi isolada de raízes de bananeira (*Musa* spp.) e vêm sendo mantida em água mineral a temperatura ambiente na coleção de bactérias endofíticas da Universidade Estadual de Montes Claros, Brasil. O microrganismo foi identificado pela análise do sequenciamento do gene 16s rRNA como *Bacillus* sp. (número de acesso GQ340516.1) e caracterizado como uma bactéria gram-positiva (Souza et al., 2013).

Extração do DNA genômico

Para a extração do material genômico foram utilizadas células obtidas a partir do cultivo do microrganismo em meio de cultura Luria-Bertani (LB) 2% Sigma, com agitação em 200 rpm, sendo o tempo de cultivo de 16 horas. Após o cultivo, foi realizada a extração do material genético com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). O DNA foi ressuspensionado em 50 µL em Tampão Tris HCl, pH 8 e armazenado a 4°C.

O DNA genômico da amostra foi quantificado utilizando o NanoDropOne (Thermo Fisher Scientific) e o fluorômetro Qubit 4 com o kit *DNA High Sensitivity* (Thermo Fisher), e armazenado a 4°C, até o momento da construção da biblioteca.

Sequenciamento e montagem do genoma de *Bacillus cereus*

O genoma completo de *Bacillus* sp. foi sequenciado usando estratégia híbrida com a combinação de *short reads* sequenciadas usando o Illumina NextSeq 550 e *long reads* sequenciadas usando o Pacbio RSII. A qualidade do sequenciamento das *short reads* foi avaliada usando os relatórios descritivos gerados pelo FASTAQC versão 0.1.16 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>). A *short reads* foram processadas para remover as sequências dos adaptadores usando a configuração *auto-detection* do Trim Galore versão 0.0.6 (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>). Em seguida, as *shortreads* foram trimadas e filtradas usando o Trimmomatic versão 0.39 (Bolger et al., 2014). As *longreads* foram filtradas pelo tamanho usando o SeqKit versão 0.13.0 (Shen et al. 2016), selecionando as sequências maiores que 1.000 nt. O genoma do *Bacillus* sp. foi montado usando estratégia híbrida e selecionando as configurações padrão do Unicycler versão 0.4.8 (Wick et al., 2017).

Anotação do genoma

A predição de genes foi executada usando o software Prokka versão 1.14.6 (Seemann, 2014) (parâmetros: *compliant*; *kingdom*: Bacteria; *gcode*: 11; *evaluate*: 1e-10). Os genes preditos foram funcionalmente anotados por meio de pesquisas de similaridade usando as ferramentas do software BLAST versão 2.10.1 (Altschule et al., 1990), selecionando como significativos os alinhamentos que apresentaram valores $E\text{-value} \leq 1e^{-10}$.

As sequências das proteínas codificadas pelas *Coding DNA Sequences* (CDS) preditas foram selecionadas e comparadas com as sequências das proteínas anotadas nos genomas das espécies do gênero *Bacillus* (*taxonomy ID 1386*) disponíveis no banco de dados *UniProtKnowledgebase* (UniProtKb) (<https://www.uniprot.org>) usando a ferramenta BLASTp. As sequências das proteínas também foram comparadas com os perfis do banco de dados *Clusters of Orthologous Groupsof Proteins* (COGs) (Tatusov et al., 2000) e funcionalmente classificadas usando a ferramenta *Reverse Position-Specific BLAST* (RPS-BLAST). A ferramenta *KEGG Automatic Annotation Server* (KAAS) (<https://www.genome.jp/kegg/kaas>) (Moriya et al., 2017) foi usada para atribuir grupos KO às proteínas anotadas, selecionando o método BBH (*bi-directionbest hit*) e os genomas de referência de *Bacillus cereus*, e a ferramenta *KEGG Mapper* (<https://www.genome.jp/kegg/mapper>) foi usada para identificar as vias metabólicas associadas às proteínas anotadas.

Similaridade genômica

A sequência do genoma montado foi comparada com as sequências dos genomas de diferentes bactérias do gênero *Bacillus* disponíveis no banco de dados NCBI *Microbial Genomes* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/microbes>). A similaridade genômica também foi calculada usando a técnica dDDH (*digital DNA-to-DNA hybridization*) (<https://ggdc.dsmz.de>) (Auch et al., 2010).

1.3 RESULTADOS

O sequenciamento do gene 16S rRNA realizado por Souza et al. (2013) para definir a taxonomia da cepa, demonstrou que o isolado EB-40 pertence ao gênero *Bacillus* com identidade de 97%. O sequenciamento completo do genoma de *Bacillus* sp. permitiu que a espécie fosse identificada como *Bacillus cereus*. O genoma circular completo foi sequenciado com o total de 5.374.645 pb, conteúdo de G+C 35,25% e 5.437 genes foram anotados, incluindo 5.288 CDS (*Coding DNA Sequences*), 42 rRNA, 106 tRNA e 1 tmRNA (Figura 1).

Também foram identificados e sequenciados dois plasmídeos completos. O plasmídeo 1 com 215.918 pb, conteúdo G+C 32,61% e 175 CDS (Figura 2). O plasmídeo 2 com 7631 pb, conteúdo G+C 33,85% e 8 CDS (Figura 3).

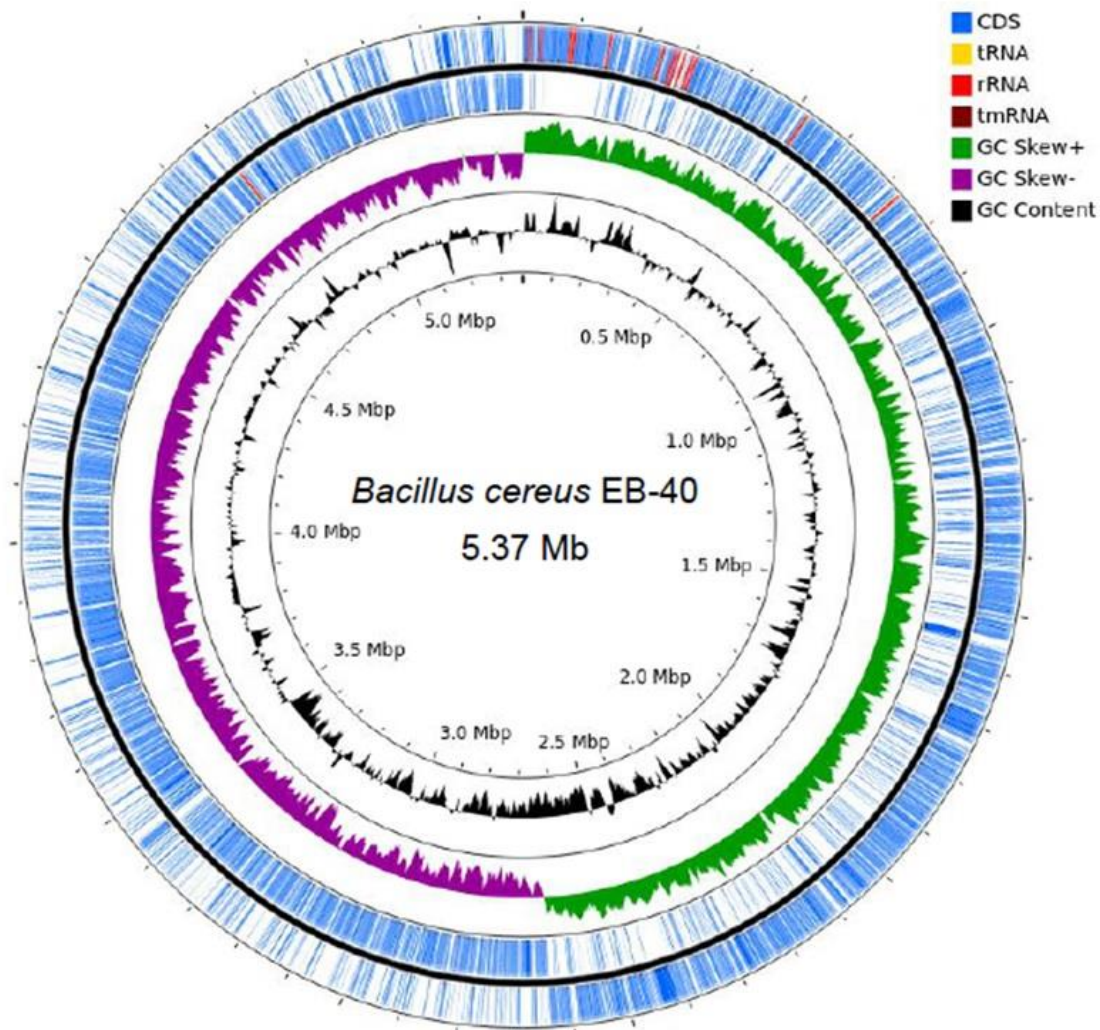


Figura 1. Visualização do genoma circular de *B. cereus*. Estão representadas no círculo, de fora para dentro, a posição dos genes na seguinte sequência: em azul genes codificadores de proteínas (CDS), genes de tRNA e rRNA padrões positivos (círculo 1) e padrões negativos (círculo 2), Círculo 3 (verde e roxo) e círculo 4 (preto) mostram o conteúdo de GC.

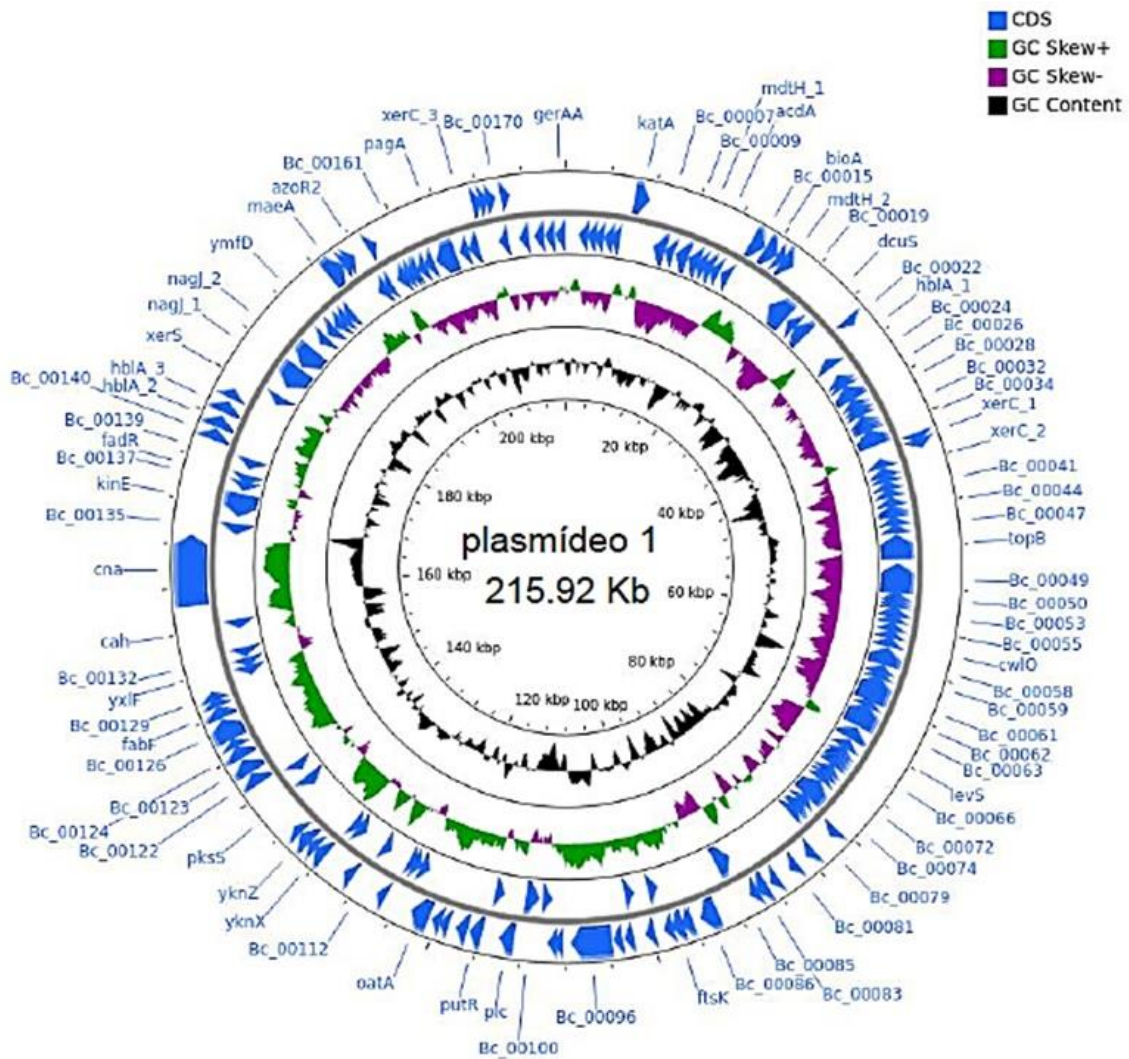


Figura 2. Visualização do plasmídeo circular 1. Estão representadas no círculo de fora para dentro a posição dos genes na seguinte sequência: em azul genes codificadores de proteínas (CDS), em verde conteúdo de guanina e citosina, em verde conteúdo de guanina e citosina e em preto guanina e citosina.

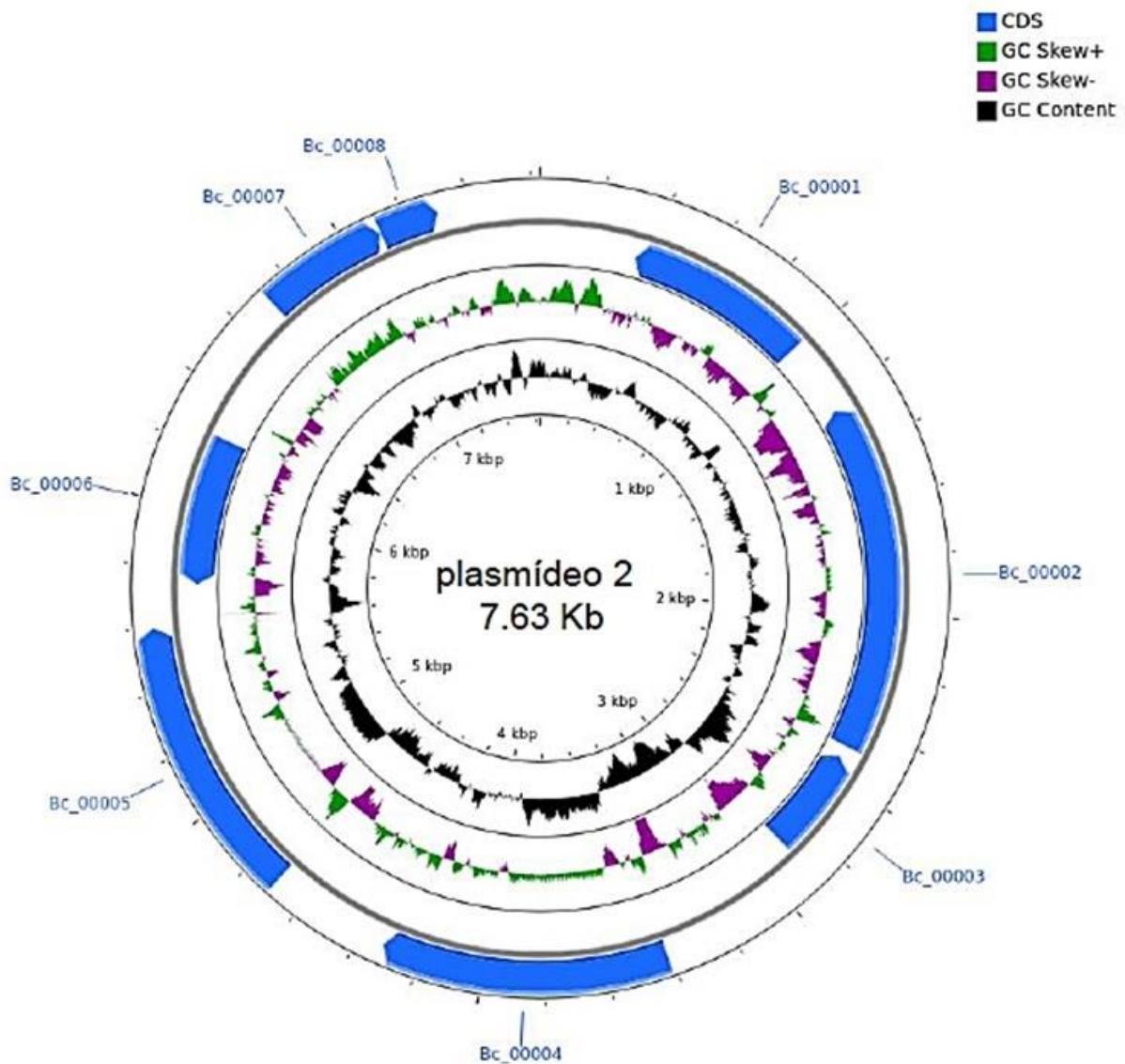


Figura 3. Visualização do plasmídeo circular 2.

A sequência do genoma de *B. cereus* foi comparada com outras sequências genômicas de referência de isolados do gênero *Bacillus*, calculando os valores de hibridização de DNA-DNA digital (dDDH). O isolado EB-40 apresentou um valor de dDDH de 90% com o isolado *Bacillus cereus* ATCC 14579 apresentado diferença de 0,04% no conteúdo de G+C (Tabela 2).

Anotação funcional do genoma do isolado de *Bacillus cereus*

O sequenciamento revelou o total de 5.288 sequências de DNA codificadoras (CDS). Foram atribuídas funções a 2.943 proteínas oriundas da anotação do genoma, as quais foram categorizados nos grupos funcionais do banco de dados COG. Para 329 proteínas, foi atribuída “função desconhecida” e para 319, “previsão de função” (Figura 4).

Tabela 1. Estatísticas descritivas da montagem e da predição de genes do genoma do isolado de *Bacillus cereus*.

ID	Forma	Tamanho (nt)	Conteúdo G+C	Cobertura	Reads mapeadas	Total de genes	CDS	rRNA	tRNA	tmRNA
Genoma	circular	5374645	0,3525	1144,76	41577435	5437	5288	42	106	1
Plasmídeo 1	circular	215918	0,3261	830,15	1101690	175	175	0	0	0
Plasmídeo 2	circular	7631	0,3385	12183,57	639862	8	8	0	0	0

nt: nucleotídeos

Tabela 2. Classificação taxonômica do genoma sequenciado usando *digital DNA-DNA hybridization* (dDDH).

Microrganismos relacionados	dDDH (d0, in %)	C.I. (d0, in %)	dDDH (d4, in %)	C.I. (d4, in %)	Dddh (d6, in %)	C.I. (d6, in %)	Diferença de Conteúdo G+C (in %)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	88,3	[84,8 - 91,0]	82,5	[79,6 - 85,0]	90,1	[87,4 - 92,3]	0,04
<i>Bacillusthuringiensis</i> ATCC 10792	74,3	[70,4 - 78,0]	70,9	[67,9 - 73,7]	76,3	[72,9 - 79,5]	0,43
<i>Bacillustropicus</i> N24	74,5	[70,5 - 78,1]	45,6	[43,0 - 48,1]	69,4	[66,0 - 72,7]	0,05
<i>Bacillusfungorum</i> 17-SMS-01	58,5	[54,9 - 62,0]	45,4	[42,9 - 48,0]	56,3	[53,2 - 59,5]	0,28
<i>Bacillustoyonensis</i> NCIMB 14858	73,9	[69,9 - 77,5]	45,3	[42,7 - 47,8]	68,8	[65,4 - 72,1]	0,31
<i>Bacillusparanthracis</i> MCCC 1A00395	69	[65,1 - 72,7]	45,1	[42,6 - 47,7]	64,9	[61,5 - 68,1]	0,06
<i>Bacilluspacificus</i> MCCC 1A06182	68	[64,1 - 71,7]	44,7	[42,1 - 47,2]	63,9	[60,6 - 67,1]	0,04
<i>Bacilluswiedmannii</i> FSL W8-0169	74,1	[70,1 - 77,7]	44	[41,5 - 46,6]	68,5	[65,1 - 71,7]	0,06
<i>Bacillusalbus</i> N35-10-2	70,2	[66,3 - 73,9]	44	[41,5 - 46,6]	65,4	[62,1 - 68,7]	0,31
<i>Bacillusluti</i> MCCC 1A00359	69,3	[65,4 - 72,9]	43,6	[41,0 - 46,1]	64,5	[61,1 - 67,7]	0,20
<i>Bacillusmobilis</i> MCCC 1A05942	64,6	[60,8 - 68,2]	43,2	[40,7 - 45,8]	60,6	[57,4 - 63,8]	0,03
<i>Bacillusproteolyticus</i> MCCC 1A00365	59,4	[55,8 - 62,9]	39,5	[37,0 - 42,1]	55,1	[52,0 - 58,2]	0,10
<i>Bacillusparamycoides</i> NH24A2	56,8	[53,2 - 60,3]	37,2	[34,8 - 39,8]	52,2	[49,1 - 55,3]	0,05

G: guanina, C: citosina.

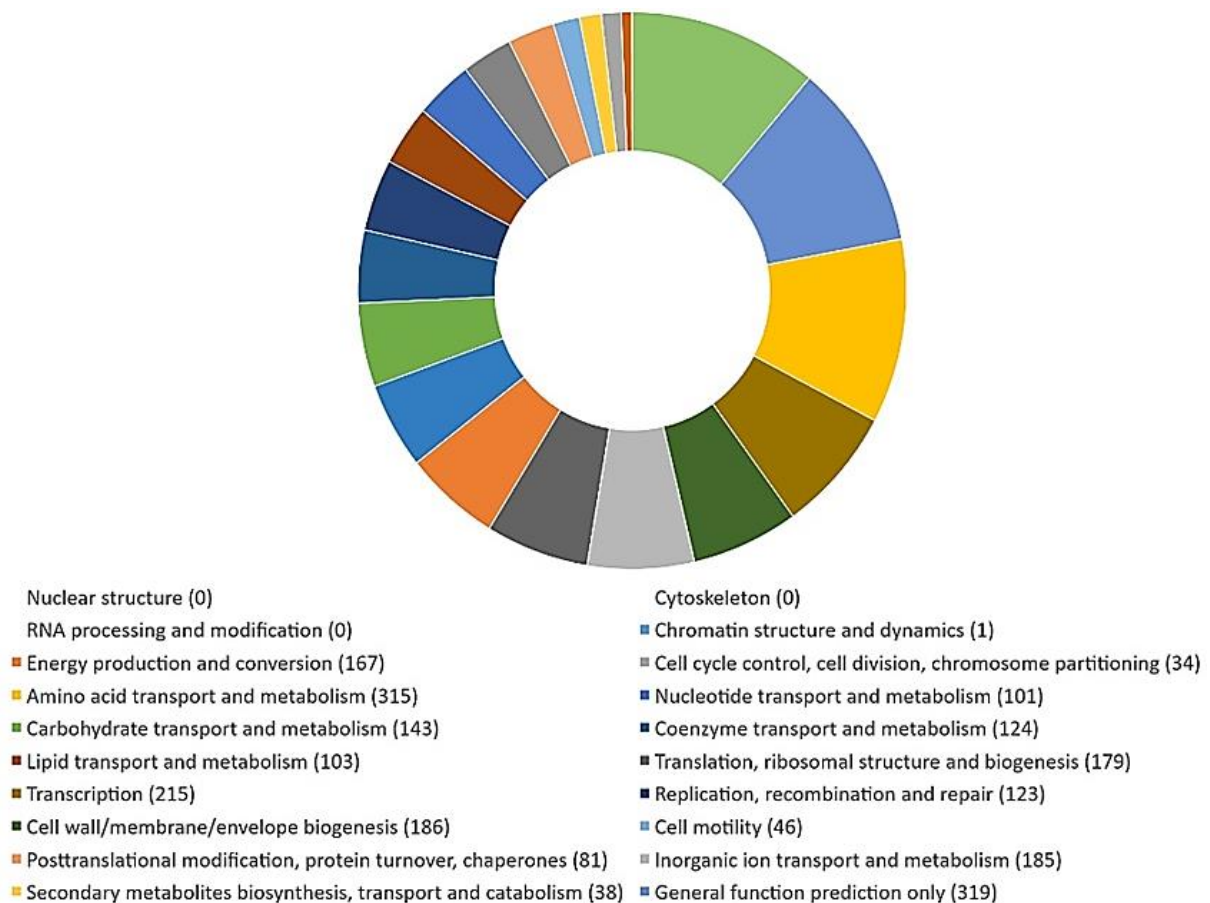


Figura 4. Gráfico da classificação das proteínas anotadas no genoma do isolado de *Bacillus cereus* nos grupos funcionais do banco de dados COG.

As categorias COG foram definidas da seguinte forma: estrutura e dinâmica da cromatina (1 proteína), produção e conversão de energia (167 proteínas), controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica (34 proteínas), transporte e metabolismo de aminoácidos (315 proteínas), transporte e metabolismo de nucleotídeos (112 proteínas), transporte e metabolismo de carboidratos (143 proteínas), transporte e metabolismo de coenzimas (124 proteínas), transporte e metabolismo de lipídeos (103 proteínas), transcrição (215 proteínas), replicação, recombinação e reparo (123 proteínas), biogênese de parede celular/membrana/envelope (186 proteínas), motilidade celular (46 proteínas), modificação pós-tradução, renovação de proteínas e chaperonas (81 proteínas), transporte e metabolismo de íons inorgânicos (185 proteínas), biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários (38 proteínas), mecanismos de transdução de sinal (148 proteínas), tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (18 proteínas) e mecanismo de defesa (88 proteínas).

Foram mapeadas 111 vias metabólicas nos mapas de referência do KEGG e incluídas, várias vias de metabolismo (como alanina, aspartato e glutamina, frutose, manose, galactose,

glutationa, metano, nitrogênio, piruvato, triptofano ou amido e sacarose), ciclo de TCA, biossíntese de ácidos graxos, vias de degradação de compostos nocivos (clorociclohexano, clorobenzeno, benzoato, nitrotolueno). Em geral, e conforme descrito anteriormente, as vias metabólicas identificadas mostraram que a maioria dos genes codificadores de proteínas estão envolvidos no transporte e metabolismo de aminoácidos, transcrição, biogênese de parede celular/membrana/ envelope, transporte e metabolismo de íons inorgânicos e tradução, estrutura ribossomal e biogênese

Identificação de genes e rotas metabólicas associadas a promoção de crescimento vegetal

No presente trabalho, o genoma de *B. cereus* também foi analisado para identificar genes e rotas referentes ao metabolismo de fósforo, ácido indol-3-acético, compostos voláteis(COVs) e produção de sideróforos.

A rota referente ao metabolismo central do carbono também foi construída a fim de determinar os ácidos orgânicos que contribuem para solubilização do fosfato inorgânico (Figura 5). Embora algumas espécies de *Bacillus* apresentem glicólise completa, o ciclo do citrato (ciclo do TCA) e a via da pentose fosfato (Jia et al., 2016), o mesmo não foi observado no presente trabalho. *B. cereus* possui enzimas envolvidas na mineralização do fosfato de mio-inositol (fitato).

Nesse trabalho foram identificadas as seguintes fosfatases de inositol: 1 mio-inositol-1,4-monofosfatase, fosfolipase C, 1-fosfatidilinositol fosfodiesterase, malonato-semialdeídodesidrogenase e cilo-inositol 2-desidrogenase (NADP⁺) capazes de catabolizar o fitato em formas assimiláveis pelas plantas (Figura 5).

Genes e rotas metabólicas relacionados a produção de AIA também foram verificados (Figura 6). Dentre os genes que codificam para o metabolismo do triptofano foram identificados no isolado *B. cereus*: trp A (*tryptophansynthase alpha chain*), trp B (*tryptophansynthase beta chain*), trp C (*indole-3-glycerol phosphatesynthase*), trp D (*anthranilatephosphoribosyltransferase2*), trp E (*anthranilatesynthasecomponent 1*) trp F e trp G (*anthranilatesynthasecomponent 2*). Embora a via independente do triptofano também pareça ocorrer em bactérias, nenhuma enzima específica nesta via foi caracterizada neste isolado (Figura 6).

Na construção da rota metabólica do triptofano foi observado que estão presentes enzimas relacionadas a via IAM como a amidase (3.1.5.4) e as vias TAM e TSO como a aldeído desidrogenase (1.2.1.3) (Figura 6).

Bacillus cereus ATCC 14579
Bce00562: Inositol phosphate metabolism

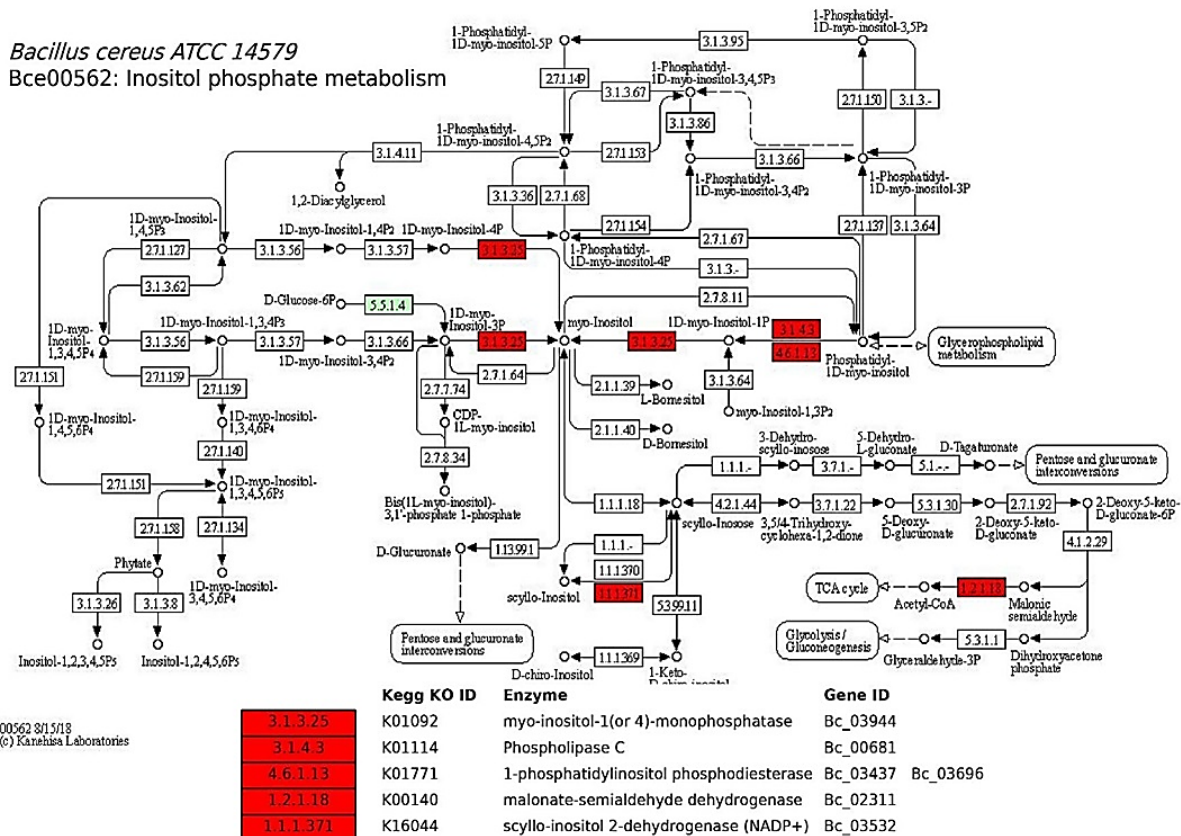


Figura 5. Mapa metabólico de referência do *Bacillus cereus* ATCC 14579 demonstrando, em vermelho, os genes que foram identificados no genoma sequenciado da espécie. As caixas verdes correspondem aos genes que fazem parte do mapa metabólico de referência e não foram identificados no genoma. As caixas brancas correspondem a outras reações descritas do metabolismo do composto em outros microrganismos.

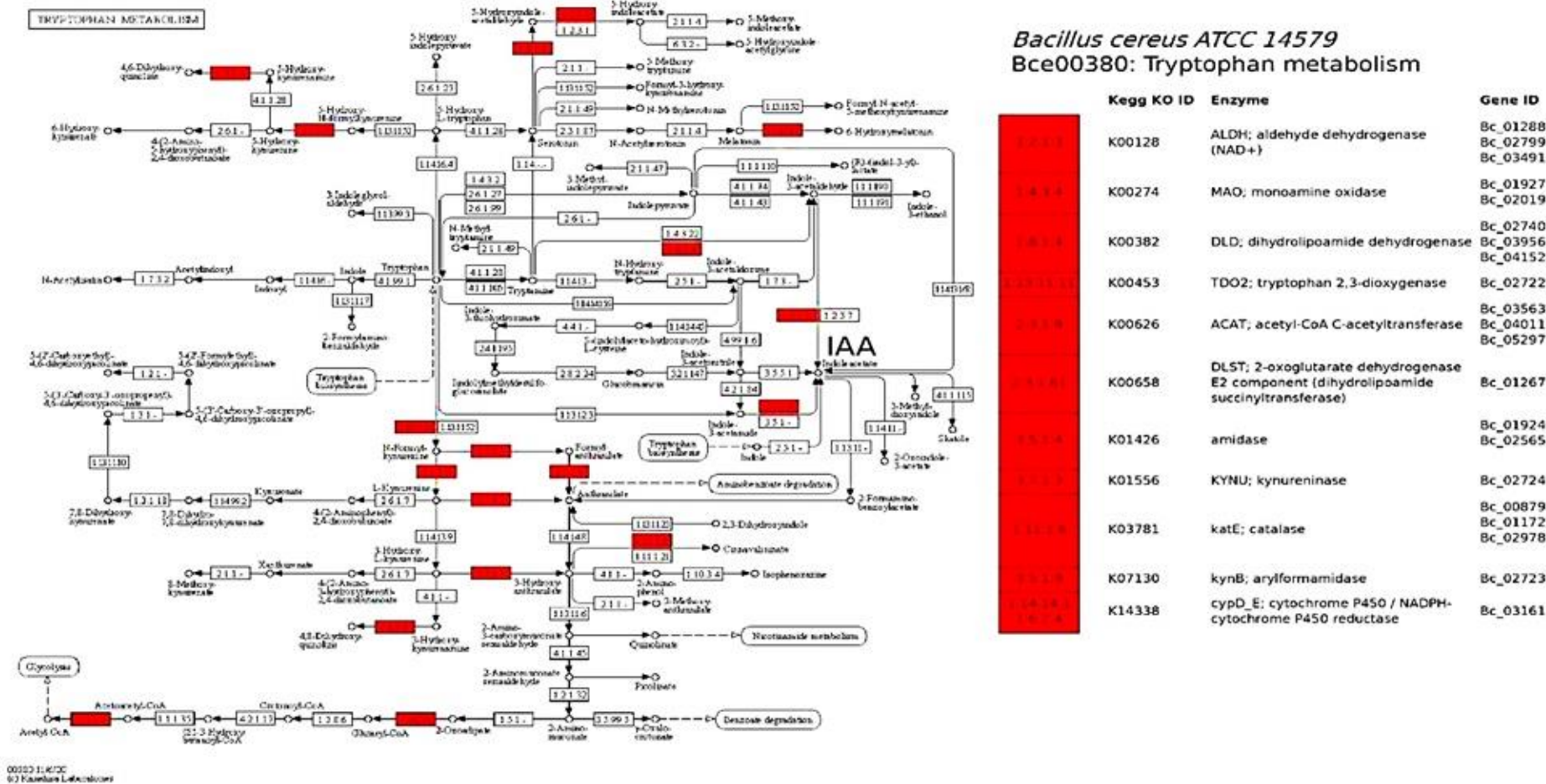


Figura 6. Mapa metabólico de referência do *Bacillus cereus* ATCC 14579 demonstrando, em vermelho, os genes que foram identificados no genoma sequenciado da espécie. As caixas verdes correspondem aos genes que fazem parte do mapa metabólico de referência e não foram identificados no genoma. As caixas brancas correspondem a outras reações descritas do metabolismo do composto em outros microrganismos.

Foram identificados genes associados a produção dos COVs acetoína e 2,3 butanodiol associados à promoção do crescimento da raiz e indução de resistência sistêmica (Tabela 3) e os genes *asbABCDEF* que codificam para a biossíntese da petrobactina (Tabela 4).

Tabela 3. Genes previstos no cromossomo de *Bacillus cereus* associados a produção de compostos voláteis.

Genes associados a produção de compostos voláteis	
<i>Locus</i>	Anotação
Bc_00899	Acetolactatesynthase
Bc_01398	Acetolactatesynthaselargesubunit
Bc_01399	Acetolactatesynthasesmallsubunit
Bc_01848	Acetolactatesynthaselargesubunit
Bc_00899	Acetolactatesynthase
Bc_00900	Alpha-acetolactatedecarboxylase
Bc_00679	(R,R)-butanedioldehydrogenase / meso-butaneidoldehydrogenase / diacetylreductase

Tabela 4. Proteínas do previstas a partir do genoma central do isolado de *Bacillus cereus* atribuídas a grupos KO (KEGG Orthology) usando o KEGG AutomaticAnnotation Server (KAAS) associadas a produção de sideróforos.

Biossíntese de petrobactina		
<i>Locus</i>	KEGG Orthology (KO)	Gene
Bc_01980	K24108	<i>asbA</i>
Bc_01981	K24109	<i>asbB</i>
Bc_01982	K24110	<i>asbC</i>
Bc_01983	K24112	<i>asbE</i>
Bc_01984	K15652	<i>asbF</i>

1.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram empregadas estratégias para elucidar alguns mecanismos presentes em *Bacillus* sp. A cepa já havia sido caracterizada como promotora de crescimento em banana (Souza et al., 2016; Souza et al., 2017), e, recentemente, foi demonstrada a sua capacidade de colonizar a região superficial e os espaços intracelulares de raízes de bananeira, sendo visualizada junto à parede e à membrana celular (Rocha et al., 2019).

O sequenciamento completo do genoma realizado no presente trabalho permitiu classificar a cepa em nível de espécie como *B. cereus*.

A espécie está dentro do grupo *B. cereus* que é composto por bactérias gram-positivas, em

forma de bastonete, formadoras de esporos aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas que estão amplamente distribuídas em ambientes naturais (Zhenget al., 2018). Diversos trabalhos têm evidenciado o papel de diversas espécies de *Bacillus cereus* como bactérias promotoras do crescimento de plantas (Niu et al., 2011; Zheng et al., 2018; Sebastian 2010).

O sequenciamento completo do genoma de *B. cereus* e a sua anotação permitiram estabelecer a posição taxonômica da cepa e verificar de forma detalhada a base molecular dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal. O número de genes de rRNA foi 42. Segundo Klappenbacht al. (2000) bactérias que possuem mais cópias de *operon* de rRNA podem lidar melhor com a flutuação de nutrientes do que as bactérias com menos cópias, que tendem a viver em ambientes onde os nutrientes são escassos.

A predição e a classificação das proteínas em grupos COG permitiu a identificação de 20 categorias de proteínas funcionais. As categorias mais abundantes estão relacionadas ao transporte e metabolismo de aminoácidos, transcrição, biogênese de parede celular/membrana/envelope, transporte e metabolismo de íons inorgânicos e tradução, estrutura ribossomal e biogênese. Segundo De Souza et al. (2019), as proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos são recorrentes entre grupos ortólogos de colonizadores de raízes.

Espécies endofíticas, a exemplo do isolado estudado, frequentemente exibem efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento da planta hospedeira e/ou resiliência ao estresse. Genes comumente associados aos efeitos benéficos das BPCPs na produtividade da planta codificam para proteínas envolvidas na aquisição de nutrientes, incluindo solubilização e mineralização de fosfatos, fixação e metabolismo de nitrogênio, bem como a produção de fitormônios, a emissão de orgânicos voláteis e compostos inorgânicos e proteínas envolvidas em características de colonização de raízes (Liu et al, 2017).

Em relação à solubilização de fosfato, nenhum gene *pqq* foi previsto para esta cepa bacteriana, o mesmo foi observado por Pinto et al. (2018) ao trabalhar com *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* isolado da cultura da videira. Muitos microrganismos do solo são capazes de solubilizar/mineralizar fosfato de baixa solubilidade do solo para liberar P-solúvel e torná-lo disponível para as plantas. Esses microrganismos melhoram o crescimento e o rendimento de várias culturas (Alori, et al., 2017). Foram previstas no presente trabalho fosfatases relacionadas ao metabolismo do fitato. Esses dados demonstram que a cepa pode ser eficiente na mineralização do fosfato orgânico. O fitato é uma das principais formas de fósforo orgânico do solo, constituindo até 50% de todo o P orgânico no solo, embora o fosfato de inositol possa ser visto como uma fonte rica de fósforo no solo, as

plantas são amplamente incapazes de utilizá-lo da rizosfera devido à baixa atividade de fitato-hidrólise (fitase) nas raízes das plantas (Richardson et al., 2001).

Segundo Idriset al. (2002), os microrganismos do solo que colonizam a rizosfera da planta e produzem fitase extracelular, como *Bacillus* e *Enterobacter* spp., poderiam atuar como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), disponibilizando fosfato de fitato para a planta. Kumarat al. (2013) demonstraram que bactérias produtoras de fitase pertencentes aos gêneros *Tetrathiodacter* e *Bacillus* promoveram o crescimento da mostarda indiana e aumentaram significativamente o teor de fósforo das plantas. A elucidação desse mecanismo sustenta os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* obtidos por Andrade et al. (2014) que demonstrou a solubilização de fosfato *in vitro* e Souza et al. (2017) que demonstrou nos seus experimentos em casa de vegetação o crescimento de mudas de banana inoculadas com esse isolado no período de aclimação.

A estirpe exibe produção de auxina em meio com e sem adição de triptofano. Há poucas informações referentes a via de produção de auxina independente do triptofano em bactérias (Luziatelli, 2020). Considerando as vias dependentes de triptofano *B. cereus* não possui a enzima IPDC que é codificada por *ipdC*. Esta via é a mais comum em bactérias produtoras de ácido-3-indolacético (Garcia et al., 2019).

Os microrganismos endofíticos podem sintetizar AIA usando diferentes rotas que são classificadas com base nos intermediários distintos envolvidos na biossíntese de AIA dependente de triptofano, cinco caminhos diferentes foram caracterizados em bactérias: o indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IPA), indol-3-acetonitrila (IAN), triptamina (TAM) e vias da oxidase de cadeia lateral do triptofano (TSO) (Duca et al., 2014; Carreño-Lopez et al., 2000). No presente trabalho, foram observadas enzimas associadas a via TAM, IAM e TSO. Embora algumas vias ocorram de forma incompleta os genomas de *Firmicutes* têm os sistemas sintéticos IAA dependentes de Trp mais simples e uma infinidade de bactérias poderia sintetizar IAA por meio de várias vias incompletas (Zhang et al., 2019).

A acetoína e o 2,3-butanodiol, são dois COVs produzidos por bactérias promotoras do crescimento de plantas, são sintetizados pela condensação de duas moléculas de piruvato em acetolactato. O acetolactato é produzido pela enzima acetolactatosintase, que é descarboxilado em acetoína pela enzima acetolactato descarboxilase e, finalmente, o 2,3-butanodiol é obtido a partir da redução da acetoína pela enzima acetoínaredutase (Gerhardt et al., 2009). O isolado EB-40 apresenta todos os genes descritos por Suarez et al. (2019) necessários para produção de acetoína e 2,3-butanodiol. Os compostos voláteis têm o potencial de controlar patógenos de plantas, estimular o crescimento das plantas e induzir resistência sistêmica a doenças

(Ryuet al.,2003).

Os sideróforos são sintetizados principalmente por peptídeos sintetases não ribossômicos, que são codificados por agrupamentos de genes. O agrupamento para a síntese de petrobactina é composto por *asbABCDEF* em *B. cereus*, o isolado EB-40 apresenta esse agrupamento.

As informações obtidas com a análise do genoma permitiram definir alguns mecanismos de ação que explicam parte dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* e relatados em trabalhos anteriores (Souza et al., 2016; Souza et al., 2017), demonstrando que *B. cereus* possui genes relacionados à mobilização de fosfato orgânico e à produção de auxinas. Além disso, a compreensão desses mecanismos fornece subsídios para que futuramente essa bactéria possa ser usada na produção de um novo bioestimulante livre de células.

Perspectivas futuras

A partir dos resultados alcançados com o sequenciamento completo do genoma do isolado EB-40, foi possível identificar alguns mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal como a disponibilização de nutrientes e a produção de fitormônios.

O sequenciamento e a anotação do genoma são os primeiros passos para a compreensão completa da base mecânica e genética das atividades microbianas que influenciam diretamente as respostas genéticas e fisiológicas benéficas das plantas. Em estudos futuros poderão ser desvendados outros mecanismos químicos e genéticos induzidos pelo isolado EB-40.

Esses mecanismos poderão ser “mimetizados” pela aplicação de produtos bacterianos biofabricados ou modificando a genética da planta para obter os mesmos resultados de forma heteróloga. Além disso, poderão ser conduzidos estudos transcriptômicos a fim de elucidar como os estímulos ambientais influenciam essa bactéria.

1.5 CONCLUSÃO

O isolado EB-40 (*Bacillus* sp.) foi identificado a nível de espécie como *Bacillus cereus*. Possui genoma circular com um tamanho 5,37 Mb e dois plasmídeos circulares. A estirpe possui genes associados a assimilação de amônio, redução do nitrato, produção de fosfatases e produção de auxinas. O isolado é capaz de reduzir nitrato, produzir auxinas e biofilmes *in vitro*.

1.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (Capes) e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (NUBIOMOL).

1.7 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

1.8 REFERÊNCIAS

- Aloo, B. N., Makumba, B. A., & Mbega, E. R. (2019). The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiological Research*, 219, 26–39.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, 971.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., Pereira, M. C. T., & Pereira, D. F. G. S. (2014). Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(1), 27–34.
- Araújo, W. L., Lima, A. O. de S., Azevedo, J. L., Marcon, J., Sobral, J. K., & Lacava, P. T. (2002). Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. *Piracicaba: Calq*, 1, 86p.
- Ashraf, A., Bano, A., & Ali, S. A. (2019). Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere soil of heat-stressed and unstressed wheat and their use as bio-inoculant. *Plant Biology*, 21(4), 762–769.
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in genomic sciences*, 2(1), 117–134.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- de Souza, R. S. C., Armanhi, J. S. L., Damasceno, N. de B., Imperial, J., & Arruda, P. (2019). Genome sequences of a plant beneficial synthetic bacterial community reveal genetic features for successful plant colonization. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1779.
- Deng, Y., Zhu, Y., Wang, P., Zhu, L., Zheng, J., Li, R., Ruan, L., Peng, D., & Sun, M. (2011). Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 2070-1.
- Dixon, R. (1998). The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in γ -proteobacteria. *Archives of Microbiology*, 169(5), 371–380.

- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *106*(1), 85–125.
- Espindula, E. (2019). Metodologias para análise de experimentos de Dual RNA-seq: aplicação da melhor estratégia no estudo das interações entre *Azospirillum brasilense* e milho durante a inibição da produção de Ácido Indol-3-Acético pela planta. Tese de doutorado. Universidades Federais do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. Disponível em [https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/212911].
- Fisher, S. H. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Molecular Microbiology*, *32*(2), 223–232.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, *42*(8), 872–874.
- Garrido-Oter, R., Nakano, R. T., Dombrowski, N., Ma, K.-W., Team, T. A., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2018). Modular traits of the Rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia. *Cell Host & Microbe*, *24*(1), 155–167.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, *190*(1), 63–68.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, *206*, 131–140.
- Heylen, K., & Keltjens, J. (2012). Redundancy and modularity in membrane-associated dissimilatory nitrate reduction in *Bacillus*. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 371.
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., & Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AY055219 to AY055226. *Microbiology*, *148*(7), 2097–2109.
- Jia, N., Ding, M.-Z., Gao, F., & Yuan, Y.-J. (2016). Comparative genomics analysis of the companion mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Bc601 and *Bacillus endophyticus* Hbe603 in bacterial consortium. *Scientific reports*, *6*(1), 1–8.
- Kamada, M., Hase, S., Fujii, K., Miyake, M., Sato, K., Kimura, K., & Sakakibara, Y. (2015). Whole-genome sequencing and comparative genome analysis of *Bacillus subtilis* strains isolated from non-salted fermented soybean foods. *PloS one*, *10*(10), e0141369.
- Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Lee, K.-E., You, Y.-H., Ko, J.-H., Kim, J.-H., & Lee, I.-J. (2015). Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, *65*(7), 637–647.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., & Schmidt, T. M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(4), 1328–1333.
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M. A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(8), 1361–1369.

- Liu, H., Carvalhais, L. C., Schenk, P. M., & Dennis, P. G. (2017). Effects of jasmonic acid signalling on the wheat microbiome differ between body sites. *Scientific reports*, 7(1), 1–8.
- Liu, S., Chen, Q., Ma, T., Wang, M., & Ni, J. (2018). Genomic insights into metabolic potentials of two simultaneous aerobic denitrification and phosphorus removal bacteria, *Achromobacter* sp. GAD3 and *Agrobacterium* sp. LAD9. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(4), fiy020.
- Luque-Almagro, V. M., Gates, A. J., Moreno-Vivián, C., Ferguson, S. J., Richardson, D. J., & Roldán, M. D. (2011). Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1838–1843.
- Luziatelli, F., Ficca, A. G., Bonini, P., Muleo, R., Gatti, L., Meneghini, M., Tronati, M., Melini, F., & Ruzzi, M. (2020). A genetic and metabolomic perspective on the production of indole-3-acetic acid by *Pantoea* agglomerans and use of their metabolites as biostimulants in plant nurseries. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1475.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., & Castillo, F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of bacteriology*, 181(21), 6573–6584.
- Moriya, Y., Itoh, M., Okuda, S., Yoshizawa, A. C., & Kanehisa, M. (2007). KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W182–W185.
- Niu, D.-D., Liu, H.-X., Jiang, C.-H., Wang, Y.-P., Wang, Q.-Y., Jin, H.-L., & Guo, J.-H. (2011). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 533–542.
- Pinto, C., Sousa, S., Froufe, H., Egas, C., Clément, C., Fontaine, F., & Gomes, A. C. (2018). Draft genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain Fito_F321, an endophyte microorganism from *Vitis vinifera* with biocontrol potential. *Standards in Genomic Sciences*, 13(1), 1–12.
- Richardson, A E, Hadobas, P. A., Hayes, J. E., O'hara, C. P., & Simpson, R. J. (2001). Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 229(1), 47–56.
- Richardson, Alan E, Hadobas, P. A., & Hayes, J. E. (2001). Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal*, 25(6), 641–649.
- Rocha, J. S., Nietsche, S., Pereira, M. C. T., MARIA O, M.-S., Santos, R. C., & XAVIER, A. A. (2019). Endophytic interaction of *Bacillus* sp. in micropropagated banana plantlets. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Santos, B. H. C. dos, Ribeiro, R. C. F., Xavier, A. A., Santos Neto, J. A. dos, & Mota, V. J. G. (2013). Controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de bananeira 'Prata-anã' por compostos orgânicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35, 650–656.
- Sarwar, M., & Kremer, R. J. (1995). Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*, 172(2), 261–269.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.
- Shao, J., Li, S., Zhang, N., Cui, X., Zhou, X., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2015). Analysis and

- cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–13.
- Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS One*, 11(10), e0163962.
- Souza, G. L. O. D., Silva, D. F. D. A., Nietsche, S., Xavier, A. A., & Pereira, M. C. T. (2017). Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39.
- Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Pereira, M. C. T., & Santos, M. A. (2016). Triple combinations with PGPB stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. *Applied Soil Ecology*, 103, 31–35.
- Souza, S. A., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A., Pereira, M. C. T., & Nietsche, S. (2013). Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 252–264.
- Sulthana, A., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2019). Genome sequencing and annotation of *Bacillus subtilis* UBBS-14 to ensure probiotic safety. *Journal of Genomics*, 7, 14.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 33–36.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A.-C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, 49.
- Tsugawa, H., Nakabayashi, R., Mori, T., Yamada, Y., Takahashi, M., Rai, A., Sugiyama, R., Yamamoto, H., Nakaya, T., & Yamazaki, M. (2019). A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. *Nature Methods*, 16(4), 295–298.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), e1005595.
- Yan, S., Wang, N., Chen, Z., Wang, Y., He, N., Peng, Y., Li, Q., & Deng, X. (2013). Genes encoding the production of extracellular polysaccharide bioflocculant are clustered on a 30-kb DNA segment in *Bacillus licheniformis*. *Functional & Integrative Genomics*, 13(4), 425–434.
- Zeng, Q., Xie, J., Li, Y., Gao, T., Xu, C., & Wang, Q. (2018). Comparative genomic and functional analyses of four sequenced *Bacillus cereus* genomes reveal conservation of genes relevant to plant-growth-promoting traits. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
- Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. *Molecules*, 24(7), 1411.
- Zumft, W. G. (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(1), 194–215.

ARTIGO 2: Formação de biofilmes e colonização *in vitro* de raízes de bananeira pela bactéria promotora do crescimento de plantas EB-40 (*Bacillus cereus*)

Este artigo está formatado nas normas da Revista Genetics and Molecular Research: GMR,

ISSN:1676-568

Formação de biofilmes e colonização *in vitro* de raízes de bananeira pela bactéria promotora do crescimento de plantas EB-40 (*Bacillus cereus*)

D.F.G.S. PEREIRA¹

¹Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, Brasil.

Autor correspondente: D. F.G.S. PEREIRA

E-mail:deborafrancinep@yahoo.com.br

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1021-1656>

RESUMO.O isolado EB-40 (*Bacillus cereus*) promove o crescimento de mudas de bananeira no período de aclimação, acúmulo de nutrientes e produção de fitormônios. Entretanto, informações sobre o processo de colonização da raiz e formação de biofilmes podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a produção de bioinsumos de aplicação agrícola. As informações sobre a extensão e as regiões da colonização tecidual assumem importância na elucidação dos papéis desse microrganismo em seus hospedeiros. Objetivou-se com o presente trabalho documentar a produção de biofilmes em *B. cereus* (EB-40) e a capacidade de colonização *in vitro* de raízes de mudas micropropagadas de bananeira “Prata Anã”. Para a identificação da produção de biofilmes e sua caracterização foram coletadas amostras de células bacterianas cultivadas em meio TSA e nas raízes de explantes de bananeira na fase de enraizamento cultivados em meio de cultura MS sólido e líquido. Foram obtidas imagens de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Realizou-se também a identificação de genes associados à produção de exopolissacarídeos (EPSs). Foi observada a formação de biofilmes em meio TSA. *B. cereus* foi identificado somente nas raízes cultivadas em meio líquido. A estirpe foi observada nas seções inferiores e posteriores da raiz junto a epiderme, ápices da raiz e pelos radiculares. O isolado EB-40 (*Bacillus cereus*) forma biofilmes em meio TSA, coloniza e produz biofilmes em raízes de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ em fase de enraizamento em meio MS líquido

Palavras-chave: endofíticos; MEV; exopolissacarídeos, *Musa* spp.

2.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) no campo tem sido dificultada pelas lacunas no conhecimento dos mecanismos que melhoram o crescimento, a saúde e a produtividade das plantas. Essas lacunas incluem a capacidade das BPCPs de colonizar a rizosfera das plantas e a habilidade das cepas bacterianas de se desenvolverem em diferentes condições ambientais (Santoyo et al., 2021).

Alguns mecanismos exibidos para colonizar a rizosfera incluem o reconhecimento de sinais químicos e nutrientes de exsudatos radiculares, atividades antioxidantes, produção de biofilme, motilidade bacteriana, bem como evasão e supressão eficientes do sistema de defesa da planta (Backer et al., 2018). Dentre esses mecanismos, os biofilmes têm sido estudados por diversos autores (Beauregard et al., 2013; Ansari et al., 2018; Haque et al., 2020).

O biofilme é definido como a estrutura organizada formada por uma comunidade bacteriana que está contida em matriz composta de exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, na qual as células se comunicam (Gao et al., 2015).

A formação do biofilme por microrganismos associados às plantas tem papel importante no estabelecimento do inoculante aplicado ao solo ou na colonização de raízes (Velmourouganeet al., 2017). Rizobactérias eficientes na formação dos biofilmes devem ser capazes de: fixar-se à superfície da raiz; sobreviver na rizosfera; fazer uso de nutrientes exsudados pela raiz da planta; proliferar e formar microcolônias; colonizar de forma eficiente o sistema radicular e competir com os microrganismos autóctones (Bloemberg e Lugtenberg, 2004).

Os benefícios propiciados pela formação dos biofilmes na planta incluem antagonismo de fitopatógenos por exclusão de nicho ocasionada pela competição por espaço e nutrientes, comunicação microbiana para cooperação/interferência, produção de antibióticos pelas células dos biofilmes, efeitos na fisiologia das plantas como indução das respostas de defesa e promoção do crescimento vegetal (Santoyo et al., 2021).

Como os biofilmes microbianos são predominantemente compostos de polissacarídeos, existe a possibilidade de aplicá-los visando a melhoria das propriedades físicas do solo, como agregação, redução da densidade aparente, aumento da retenção de água e nutrientes aplicados na rizosfera das culturas. Também tem sido proposta a aplicação de polissacarídeos microbianos obtidos de biofilmes (preparações brutas ou purificadas) via foliar ou por fertiirrigação para proteger as plantas de estresses bióticos e abióticos (Galelli et al., 2015).

O gênero bacteriano *Bacillus* compreende importantes estirpes associadas a plantas utilizadas para o controle de doenças e para a promoção do crescimento vegetal (Ongena e Jacques, 2008). Algumas espécies já têm sido descritas como formadoras de biofilmes em melão (Zerouhet et al., 2014), tabaco (Wu et al., 2015), arroz (Zhou et al., 2016), dentre outras.

O isolado EB-40 (*Bacillus cereus*) promove o crescimento de mudas de bananeira no período de aclimação (Souza et al., 2016), o acúmulo de nutrientes (Souza et al., 2016) e a produção de fitormônios (Andrade et al., 2014). Entretanto, informações sobre o processo de colonização da raiz e a formação de biofilmes são necessárias para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a produção de produtos biológicos de aplicação agrícola. As informações sobre a extensão e as regiões da colonização tecidual assumem importância na elucidação dos papéis desse organismo em seus hospedeiros (Gyaneshwari et al., 2001; Thomas et al., 2014; Rocha et al., 2019).

Nesse sentido, estudos que atestem a capacidade desse microrganismo de formar biofilmes são importantes considerando a relevância dessas estruturas na colonização e na formulação de biofertilizantes. Considerando os relevantes aspectos descritos acima, objetivou-se com o presente trabalho documentar a produção de biofilmes em *B. cereus* (EB-40) e a capacidade de colonização *in vitro* de raízes de mudas micropropagadas de bananeira.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do isolado bacteriano

Os ensaios foram realizados com o isolado bacteriano EB-40 (*B. cereus*), número de acesso no Genbank GQ340516.1, obtido da coleção de bactérias endofíticas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros. A bactéria foi isolada por Souza et al. (2013) dos tecidos internos de raízes de bananeira.

Avaliação da produção de biofilmes em raízes de explantes de bananeira na fase de enraizamento *in vitro*

Para a realização do ensaio, foram utilizados explantes de bananeira “Prata Anã” em fase de alongamento e enraizamento *in vitro*, cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). O isolado bacteriano *B. cereus* foi cultivado previamente em placa de Petri contendo 30 mL de meio TSA, durante 24 horas. Após este período, adicionou-se 5,0 mL de solução salina 0,85% à colônia bacteriana, obtendo-se uma suspensão bacteriana cuja DO foi ajustada para 1,0 a 540 nm. Adicionou-se

2,0 mL dessa suspensão aos explantes de bananeira cultivadas em meio MS sólido (com ágar 7 g.L⁻¹) e meio MS líquido (sem ágar).

Após 77 horas da inoculação, foram coletados ápices radiculares contendo a coifa, a zona de crescimento e a zona de ramificação. As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965), sob vácuo (560 mm Hg), durante 24 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em resina metacrilato (Leica Microsystems, Heildeberg, Alemanha). Secções transversais com 5µm de espessura foram obtidas utilizando-se um micrótomo rotativo (Atago, Tokyo, Japan), coradas com azul de toluidina e montadas em lâmina de vidro com resina acrílica (Itacril, Itaquaquetuba, Brasil). A documentação fotográfica foi realizada com auxílio de câmera digital acoplada a microscópio óptico AxioCam ICC3 (Zeiss, Jena, Alemanha).

Para a realização da microscopia de varredura, foram utilizadas as mudas produzidas em meio MS líquido (sem ágar). Foram selecionados fragmentos de raízes onde observou-se a presença dos biofilmes com o auxílio da lupa. O material vegetal foi preparado da seguinte forma: os fragmentos vegetais (ápices radiculares) foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratados em série etanólica, secos a ponto crítico com CO₂ (Bal-Tec-MD20, Leica) (Robards, 1991), montados em porta amostras com fita de carbono dupla-face, pulverizados com uma camada de ouro de 3nm de espessura e examinados em um microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200, FeiCo., Eindhoven, Holanda) a 12-20 kV.

Avaliação da produção de biofilmes em meio TSA (Tryptona, soja e ágar)

Para a avaliação da produção de biofilmes, foi retirada uma alíquota de 100 µL da solução estoque (bactéria e água) do isolado *B. cereus* e espalhada com o auxílio da alça de Drigalski, em placa de Petri contendo 30 mL de meio TSA. As placas de Petri foram armazenadas em estufa incubadora em temperatura de 26°C por um período de 48 horas. Após esse período, a temperatura foi ajustada para 37°C por quatro horas, com objetivo de simular estresse térmico visando a formação de biofilmes. Após esse período, as placas de Petri foram levadas a câmara de fluxo laminar em condições assépticas e fragmentos da colônia crescida em meio TSA foram obtidos para a realização das análises de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. As etapas de desidratação do material e realização da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas conforme o item anterior à avaliação da produção de biofilmes em raízes de explantes de bananeira na fase de enraizamento *in vitro*.

2.3 RESULTADOS

Formação de expolissacarídeos em meio TSA

Foi observado no presente trabalho que o isolado EB-40 formou biofilmes em meio TSA após condição de estresse térmico (Figura 1). As imagens obtidas por microscopia de luz mostraram extensa rede de células bacterianas ligadas (1A). Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar expolissacarídeos formados ao longo da placa (1B, 1C e 1D), com células bacterianas em formato de bastão envolvidas por fibras e substâncias poliméricas extracelulares.

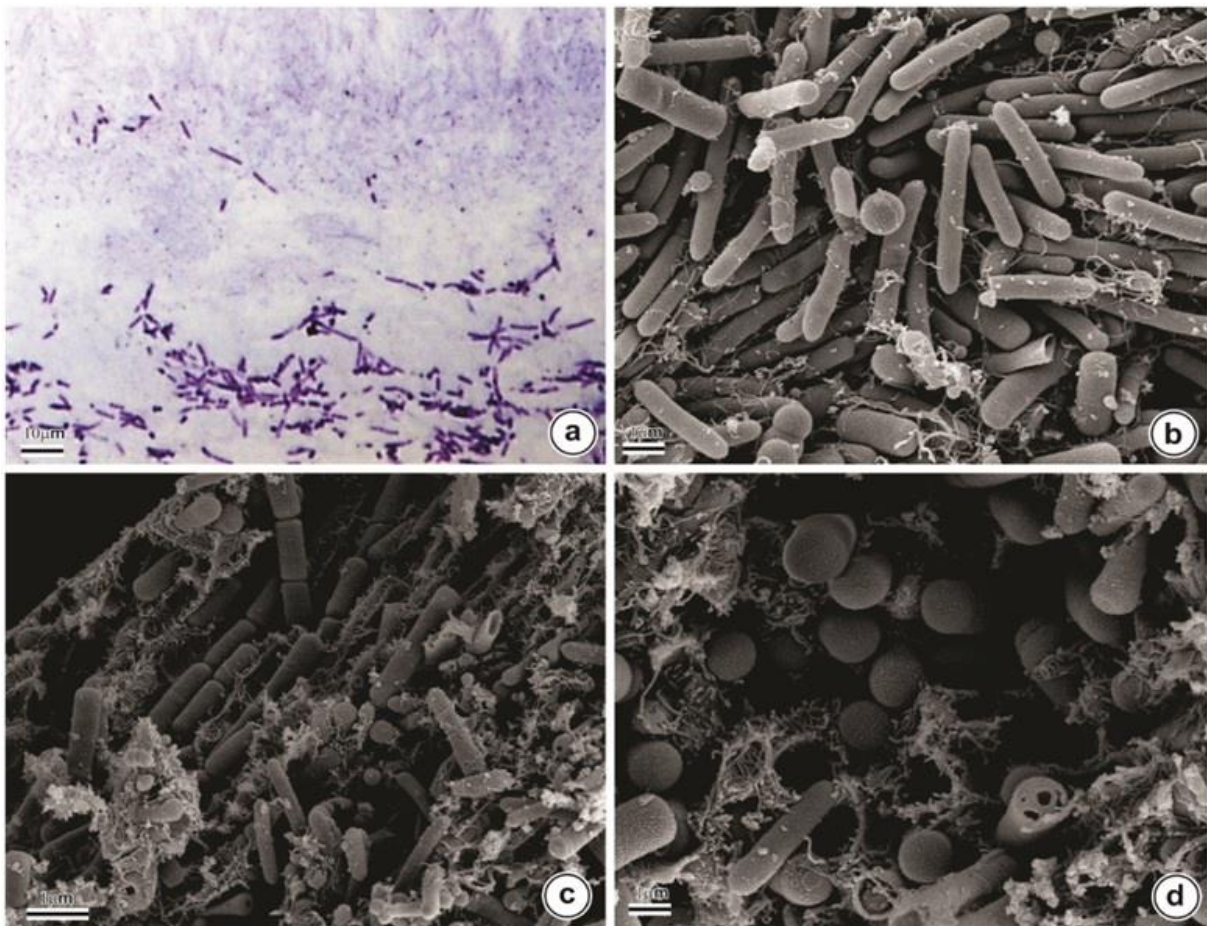


Figura 1. Formação de expolissacarídeos formados por *Bacillus cereus* (EB-40) em meio TSA. (a) Microscopia de luz. (b-d) Microscopia eletrônica de varredura. (a) Biofilme formado por *B. cereus*. (b) Formação de biofilme na periferia da placa. Presença de algumas fibras e mucilagem (c-d) Biofilme formado no centro da placa. Células envolvidas por filamentos finos em matriz extracelular.

Em determinadas regiões dos biofilmes as células bacterianas estavam inseridas em um emaranhado de filamentos finos (Figura 2). A rede de filamentos não permaneceu presa às células (2A e 2B) quando estas foram ocasionalmente removidas pelo processo de microscopia.

Na parte central do biofilme foram observadas células em formato de bastão, células cocóides, estruturas fibrilares e substâncias poliméricas extracelulares (2C). Verificou-se também a orientação das células em feixes (2D).

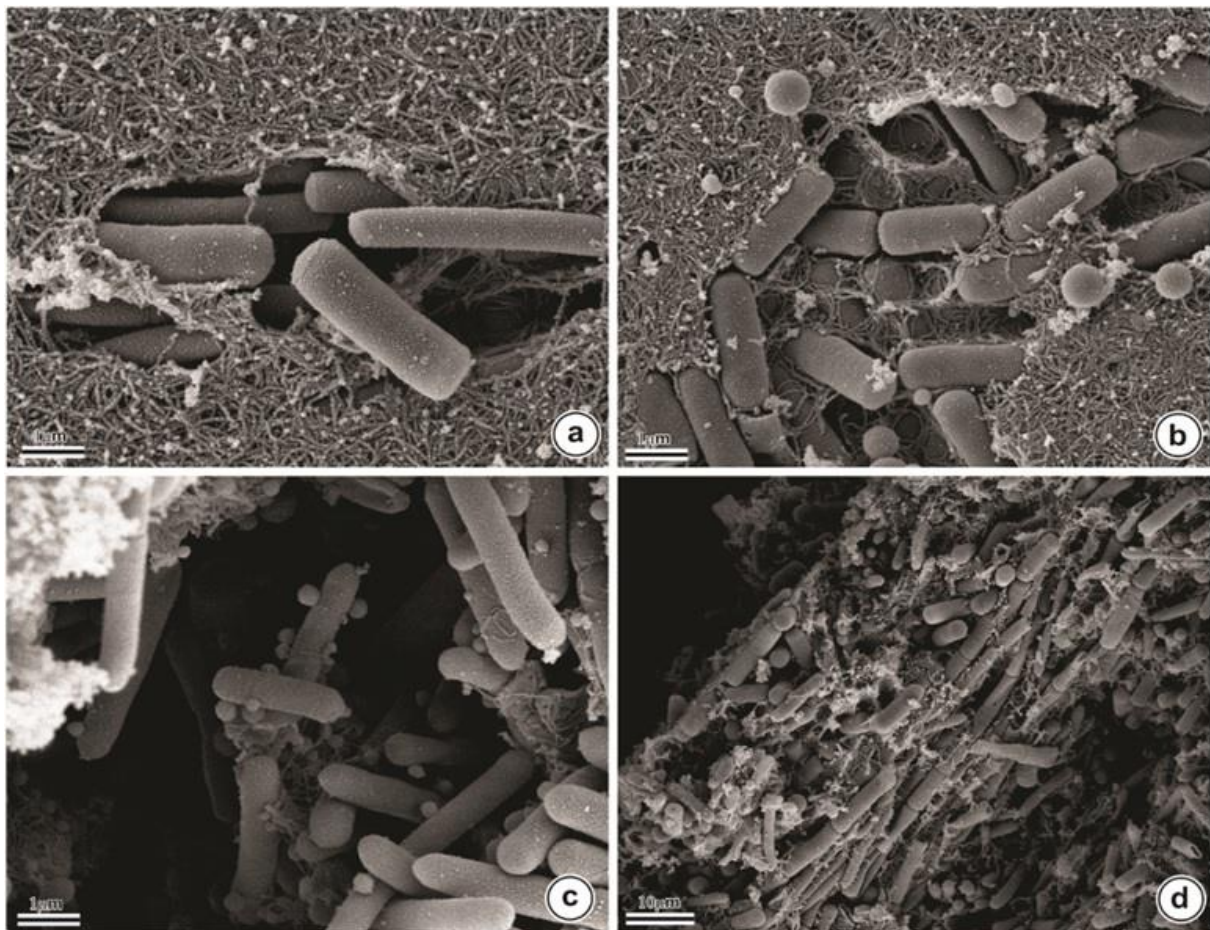


Figura 2. Biofilmes em diversas regiões da placa. (A) Visão superior da periferia de um biofilme de *Bacillus cereus* (EB-40) cultivado em meio TSA na placa de Petri, com bactérias dispostas em um plano e quase totalmente cobertas por uma matriz de filamentos. (B) As fibras assumiram estrutura semelhante a uma "cesta" ao redor das células. Notavelmente, essas cestas "moldadas sob medida" não permaneceram presas às células bacterianas, mas mantiveram sua estrutura mesmo quando as bactérias foram ocasionalmente liberadas desta matriz durante o procedimento de microscopia. (C) Visão da parte central do biofilme de *B. cereus* cultivado em meio TSA, em placa de Petri com células em forma de bastão e células cocóides. Presença de estruturas fibrilares na junção das células em forma de bastonete e substâncias exopoliméricas. (D) Biofilme de *B. cereus*, parte central representando a orientação das células em forma de bastonete.

Formação de biofilmes em meio TSA

No ensaio para produção de biofilmes na raiz não foi observada a presença de células bacterianas quando o isolado foi cultivado em meio de cultura MS, com adição de ágar, porém, quando o cultivo foi realizado em meio líquido, observou-se a colonização próxima à raiz (Figura 3). Foi verificada intensa aglomeração de células na região rizosférica (3D), principalmente junto aos pelos radiculares.

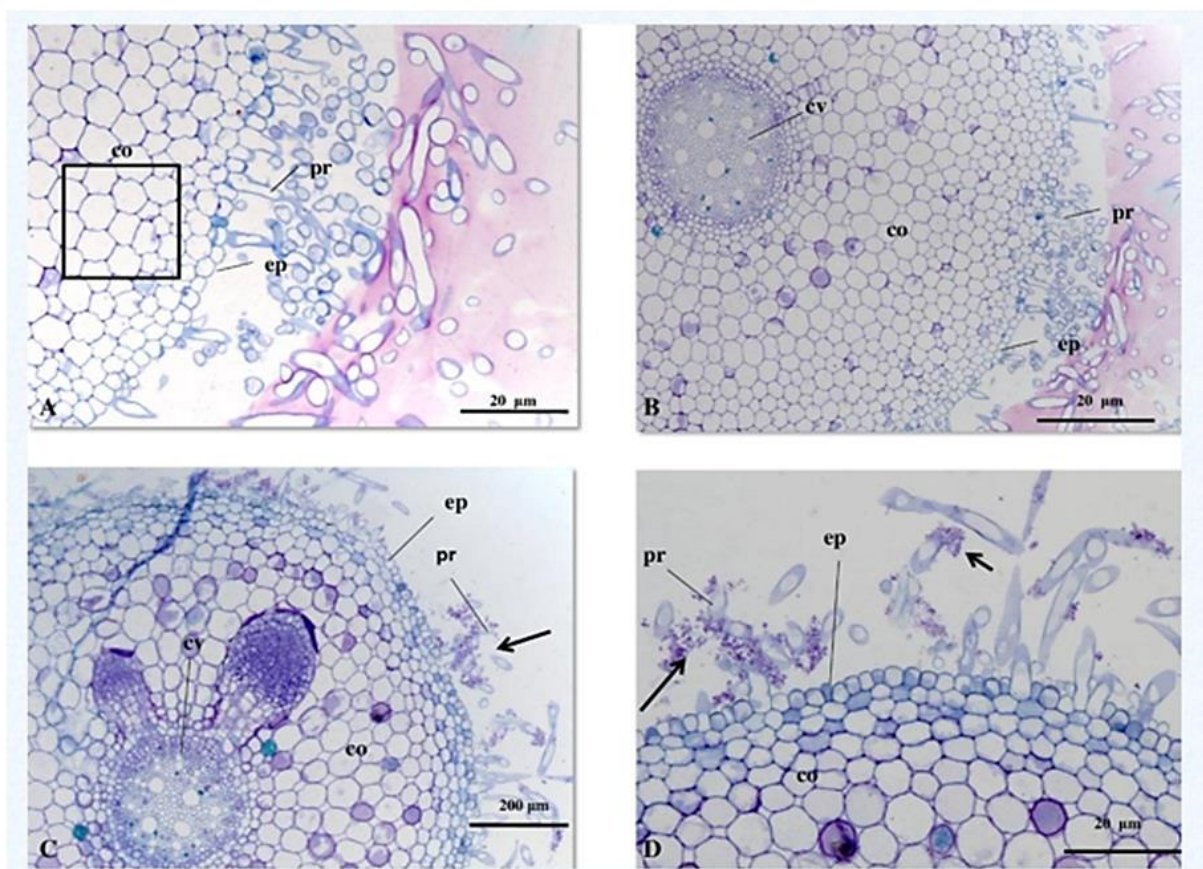


Figura 3. Interação entre o isolado bacteriano EB-40 (*Bacillus cereus*) e raízes de mudas micro propagadas de bananeira “Prata Anã” cultivada *in vitro*. Secções transversais. (A-B) Meio de cultivo com ágar, sem a presença de células bacterianas aderidas aos pelos radiculares. (C-D) Meio de cultivo sem ágar, com células bacterianas aderidas aos pelos radiculares. Legenda: co: Córtex; cv: Cilindro vascular; ep: Epiderme; pr: Pelo radicular; ad: Raiz adventícia.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização da colonização da raiz e a formação de biofilmes (Figura 4). Como foram amostrados diversos pontos da raiz. Foi possível visualizar diversos estágios da colonização. Foi observada a formação de biofilmes junto à raiz (4A, B), a aglomeração de células na rizosfera (4C), colonização dos pelos

radiculares (4D,4E) e a estrutura do biofilme formado (4F). Verificou-se que as células de *B. cereus* formam pequenos aglomerados (4E) inicialmente, e, após isso foiconstruído biofilme mais robusto (4F).

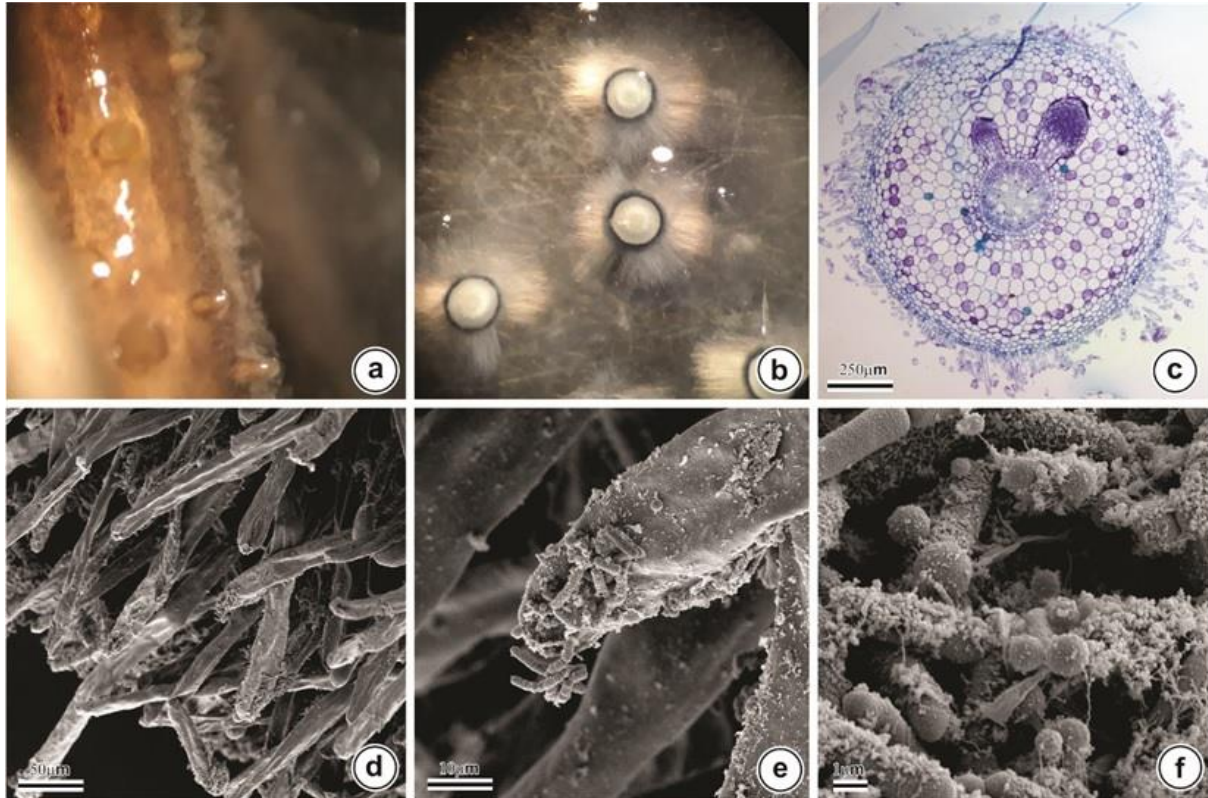


Figura 4. Formação de biofilme em raízes de mudas de bananeira *in vitro* inoculadas com *Bacillus cereus* (EB-40). (a) Biofilme bacteriano formado por *B. cereus* em raízes de mudas de banana micropropagadas. (b) Pelos radiculares após a inoculação com *B. cereus*. (c) Células bacterianas presentes na rizosfera de mudas micropropagadas de banana cultivadas *in vitro* em meio MS líquido. (d) Pelos radiculares colonizados por *B. cereus*(d, e). Biofilme formado na raiz (f).

Em diferentes estágios da colonização as células apresentaram morfologia diferente (Figura 5). Quando a célula foi fotografada no estado planctônico (5A) não foi observada nenhuma estrutura fibrilar ou matriz exopolimérica. Verificou-se a formação de microcolônias aderidas aos pelos radiculares (5B), expansão dessas microcolônias (5C) e o biofilme maduro formado na raiz (5D). O biofilme formado na raiz apresentava células densamente agrupadas, fibras e uma abundante matriz exopolimérica.

Clusters gênicos associados a produção de EPSs em EB-40

Foram identificados no genoma do isolado EB-40 dois clusters de genes associados a produção de exopolissacarídeos (EPSs) o Cluster EPS 1 e o Cluster EPS 2 (Figura 6).

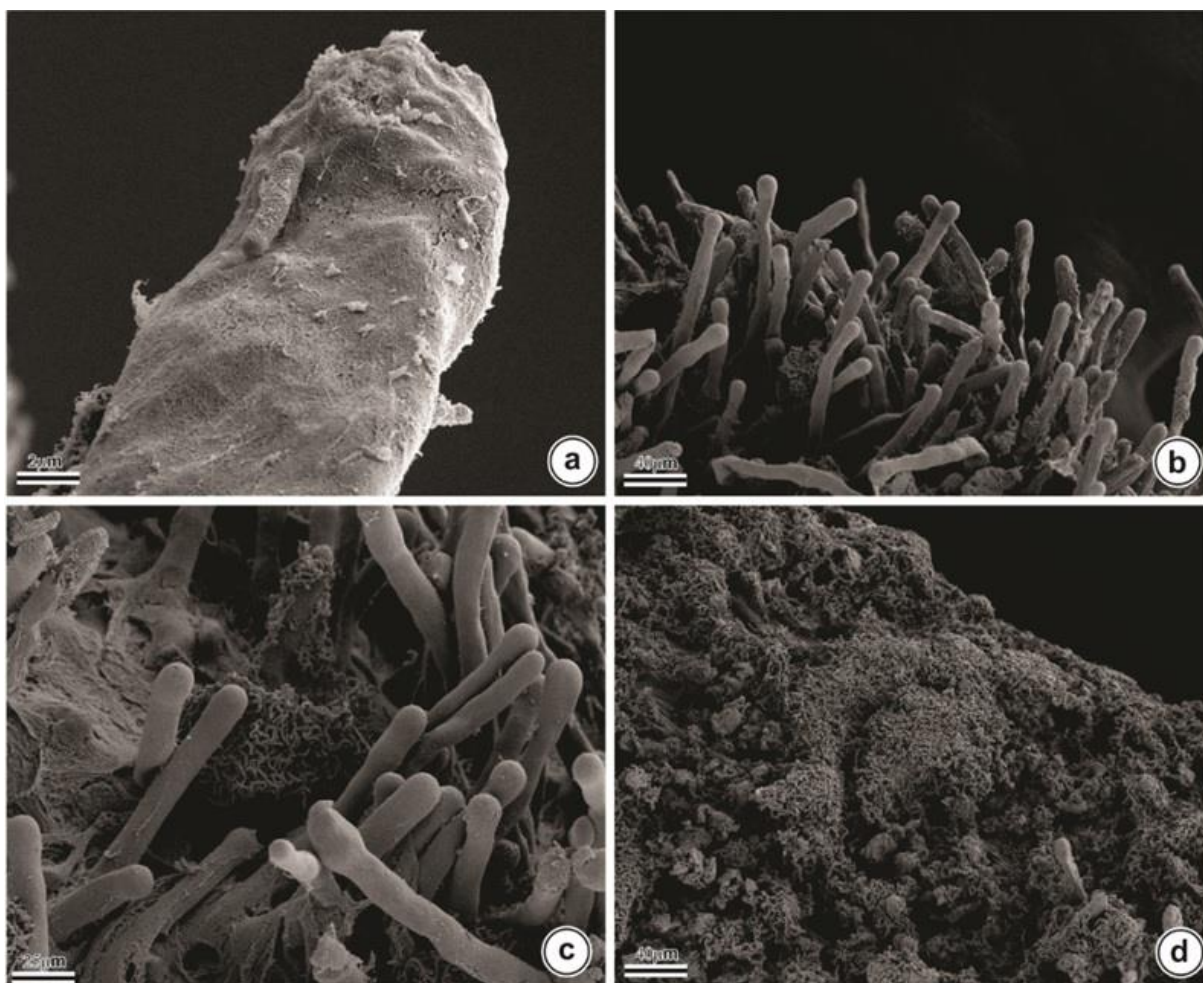


Figura 5. Colonização *in vitro* por *Bacillus cereus* das raízes de explantes de bananeira documentada por microscopia eletrônica de varredura. (A) Célula planctônica de *B. cereus* localizada no ápice de um pelo radicular de banana. (B) Formação de microcolonias de *B. cereus* nos pelos radiculares (C, D) Seção transversal da raiz totalmente coberta pelo biofilme produzido por *B. cereus*.

2.4 DISCUSSÃO

Mesmo que uma BPCP colonize com sucesso a superfície da raiz da planta e sua vizinhança inicialmente, sua durabilidade ao longo do tempo não é garantida. Nesse sentido, tanto para os estágios iniciais quanto para a persistência da interação bactéria-planta, a formação de biofilmes é considerada atributo bacteriano fundamental (Gómez et al., 2020).

Os resultados permitiram observar que o isolado EB-40 produziu biofilmes em meio TSA, colonizou a raiz e formou exopolissacarídeos no sistema *in vitro*. A estirpe construiu biofilmes

em meio TSA, considerado meio não indutor. Resultados semelhantes foram observados por Wahlen et al. (2018), os autores também verificaram a formação de biofilmes por *B. subtilis* em meio TSA.

Os biofilmes, de uma maneira geral, estão incorporados em matriz autoproduzida, cujos elementos estruturais são exopolissacarídeos, proteínas e DNA (Flemming e Wingender, 2010). Os biofilmes formados por microrganismos são mal compreendidos, pois existe grande variação na estrutura e na quantidade de substâncias da matriz entre as espécies (Limet et al., 2021). Por se tratar de uma espécie geneticamente diversa, a capacidade de formação de biofilme é altamente variável e influenciada pelo ambiente (Majed et al., 2016).

A matriz exopolimérica formada por EB-40 apresentava células bacilares, cocóides, estruturas fibrilares unindo as células e estruturas semelhantes à mucilagem (Fig2). Segundo Caro-Astorga et al. (2015), essa arquitetura proporciona a coesão e estabilidade das células, além de constituir proteção contra fatores externos como dessecação e antibióticos. A presença de células cocóides pode ter sido induzida pela condição ambiental. Segundo Van Teeseling et al. (2017), várias espécies sofrem mudanças morfológicas sob certas condições. Essas mudanças podem estar relacionadas à transição para um estado metabolicamente inativo ou a uma necessidade de aumentar a absorção de nutrientes ou escapar de ameaças.

A caracterização da matriz requer a identificação dos componentes, bem como a determinação da concentração relativa dos constituintes do EPS, incluindo suas propriedades físico-químicas e descrições de suas interações (Di Martino, 2018). Nesse sentido, devem ser feitos estudos adicionais como espectroscopia infravermelha, enzimas hidrolíticas, entre outros.

Segundo Gingichashvili et al. (2020), as bactérias no microambiente do biofilme, ao contrário de seu estado planctônico, beneficiam-se de maior resiliência, não apenas devido à difusão limitada de agentes antimicrobianos, mas também devido à complexa organização bacteriana dentro dos biofilmes.

Verificou-se que o isolado EB-40 não foi capaz de colonizar as raízes quando os explantes foram cultivados em meio MS sólido. No experimento realizado por Posada et al. (2018), *B. subtilis* foi capaz de colonizar *in vitro* as raízes de banana em meio MS sólido. Entretanto, os autores realizaram a inoculação antes da inserção do explante no meio de cultura. No presente trabalho a solução bacteriana foi adicionada sobre o meio MS sólido, contendo explantes de bananeira em processo de enraizamento, próxima a região das raízes e pseudocaule. A presença de ágar no meio MS pode ter dificultado a colonização do isolado nas raízes dos explantes e sendo assim, a pré-inoculação do explante com o isolado antes da inserção no meio de cultura deve ser considerada.

Quando o isolado foi inoculado em MS líquido, observou-se a presença das bactérias na raiz bem como a formação de biofilmes. Rocha et al. (2019) foram os primeiros a relataram a capacidade de formação de possível biofilme pelo isolado bacteriano EB-40 em explantes de bananeira *in vitro*. Os autores descreveram intensa aglomeração bacteriana na superfície da epiderme radicular, com abundante colonização epifítica no rizoplano. Segundo Fournier et al. (2008), as células bacterianas ficam mais concentradas nos pelos radiculares, o que coincide com a posição bastante próxima das células bacterianas observadas no presente trabalho (Figura 1D).

B. cereus foi identificado nas secções inferiores e posteriores da raiz junto à epiderme, ápices da raiz e pelos radiculares, o mesmo padrão foi observado por Fanet et al. (2012). O padrão de colonização exibido pelo isolado EB-40 assemelha-se com outras BPCPs (Kuet et al., 2018; Gamez et al., 2019) com colonização dos pelos radiculares, epiderme e expansão para o restante da raiz.

As imagens obtidas demonstraram que o biofilme formado na raiz era mais denso e compacto quando comparado ao biofilme formado em meio TSA. Zhou e Gao (2019) sugerem que os tecidos da raiz estão constantemente exsudando diferentes tipos de moléculas, como carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, bem como outros compostos absorvidos essenciais para o crescimento da raiz o que contribui para o desenvolvimento do biofilme.

Segundo Gamez et al. (2019) a capacidade de formar biofilmes está intimamente associada à capacidade de promoção do crescimento vegetal. A formação de biofilmes é importante para o estabelecimento do microrganismo na rizosfera, colonização da raiz e promoção do crescimento de plantas (Malusá et al., 2012).

A genômica comparativa demonstrou que o isolado EB-40 possui dois *clusters* associados a formação de EPS. A relação dos *clusters* EPSs com a formação de biofilme foi investigada no isolado *B. cereus* ATCC14579 por Caro-Astorga et al (2020). O *cluster* EPS1 é homólogo ao *operoneps* identificado em *B. subtilis* e mutações nesse *cluster* não afetam a formação do biofilme. O *cluster* EPS2 está associado a produção de polissacarídeos capsulares e apresentaram superexpressão em células associadas a biofilme. Mutantes EPS2 apresentaram menor capacidade de adesão e de formação de biofilme. A exploração do genoma do isolado EB-40 permitiu que fossem identificados os grupos gênicos associados a produção de EPS.

A fisiologia e a adaptação bacteriana são influenciadas pelos EPSs. Esses polímeros são indispensáveis para a montagem da matriz extracelular do biofilme em múltiplas espécies bacterianas.

A produção de EPSs por microrganismos nas raízes das espécies vegetais além de ser

fundamental para o processo de colonização, contribui para o aumento da tolerância ao estresse abiótico, tornando as plantas mais resistentes à seca, salinidade, temperatura e toxicidade por metais pesados (Morcillo e Manzanera, 2021).

Os resultados obtidos demonstraram que o isolado EB-40 possui características importantes para o processo da colonização da raiz e estabelecimento na rizosfera que, em conjunto com seus mecanismos de promoção do crescimento vegetal, o tornam promissor candidato para a composição de produtos biológicos comerciais. Entretanto, sabemos que estudos adicionais devem ser realizados a fim de se determinar a composição do biofilme e a expressão gênica da planta e da bactéria durante a colonização e aplicação da bactéria em condições de estresse abiótico.

2.5 CONCLUSÃO

O isolado EB-40 (*Bacillus cereus*) forma biofilmes em meio TSA, coloniza e produz biofilmes em raízes de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ em fase de enraizamento em meio MS líquido e possui dois *clusters* de genes homólogos ao EPS1 e EPS2 de *Bacillus subtilis*.

2.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (Capes) e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (NUBIOMOL).

2.7 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

2.8 REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410.
- Amaya-Gómez, C. V., Porcel, M., Mesa-Garriga, L., & Gómez-Álvarez, M. I. (2020). A framework for the selection of plant growth-promoting rhizobacteria based on bacterial competence mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, 86(14), e00760-20.
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S.,

- Pereira, M. C. T., & Pereira, D. F. G. S. (2014). Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(1), 27–34.
- Ansari, F. A., & Ahmad, I. (2018). Biofilm development, plant growth promoting traits and rhizosphere colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: a promising PGPR. *Advances in Microbiology*, 8(03), 235.
- Armbruster, C. R., & Parsek, M. R. (2018). New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4317–4319.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473.
- Banerjee, A., Sarkar, S., Cuadros-Orellana, S., & Bandopadhyay, R. (2019). Exopolysaccharides and biofilms in mitigating salinity stress: the biotechnological potential of halophilic and soil-inhabiting PGPR microorganisms. In *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions* (p. 133–153). Springer.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 1621–1630.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2004). Bacterial biofilms on plants: relevance and phenotypic aspects. In *Microbial biofilms* (p. 141–159). American Society of Microbiology.
- Caro-Astorga, J., Pérez-García, A., de Vicente, A., & Romero, D. (2015). A genomic region involved in the formation of adhesin fibers in *Bacillus cereus* biofilms. *Frontiers in microbiology*, 5, 745.
- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., & Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), 303–311.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623–633.
- Galelli, M. E., Sarti, G. C., & Miyazaki, S. S. (2015). *Lactuca sativa* biofertilization using biofilm from *Bacillus* with PGPR activity. *Journal of Applied Horticulture*, 17(3).
- Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S., & Rodriguez, F. (2019). Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). *Microbiological research*, 220, 12–20.
- Gao, T., Foulston, L., Chai, Y., Wang, Q., & Losick, R. (2015). Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. *Microbiologyopen*, 4(3), 452–464.
- Gilchrist, C. L. M., & Chooi, Y.-H. H. (2020). clinker & clustermap. js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *bioRxiv*.
- Gingichashvili, S., Feuerstein, O., & Steinberg, D. (2021). Topography and Expansion Patterns at the Biofilm-Agar Interface in *Bacillus subtilis* Biofilms. *Microorganisms*, 9(1), 84.

- Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-Hurek, B., & Ladha, J. K. (2001). Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 183(8), 2634–2645.
- Haque, M., Mosharaf, M. K., Khatun, M., Biswas, M., Islam, M., Shozib, H. B., Miah, M., Uddin, M., Molla, A. H., & Siddiquee, M. A. (2020). Biofilm producing rhizobacteria with multiple plant growth-promoting traits promote growth of tomato under water-deficit stress. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2954.
- Ku, Y., Xu, G., Tian, X., Xie, H., Yang, X., & Cao, C. (2018). Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6. *PLoS One*, 13(11), e0200181.
- Lim, E. S., Baek, S.-Y., Oh, T., Koo, M., Lee, J. Y., Kim, H. J., & Kim, J.-S. (2021). Strain variation in *Bacillus cereus* biofilms and their susceptibility to extracellular matrix-degrading enzymes. *Plos one*, 16(6), e0245708.
- Majed, R., Faille, C., Kallassy, M., & Gohar, M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms—same, only different. *Frontiers in microbiology*, 7, 1054.
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The scientific world journal*, 2012.
- Morris, J. K. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. cell Biol*, 27, 1–149.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473–497.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115–125.
- Posada, L. F., Álvarez, J. C., Romero-Tabarez, M., de-Bashan, L., & Villegas-Escobar, V. (2018). Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiological research*, 217, 69–80.
- Robards, A. W. (1991). Rapid-freezing methods and their applications. *Electron microscopy of plant cells*, 257–312.
- Rocha, J. S., Nietzsche, S., Pereira, M. C. T., MARIA O, M.-S., Santos, R. C., & XAVIER, A. A. (2019). Endophytic interaction of *Bacillus* sp. in micropropagated banana plantlets. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.
- Souza, G. L. O. D., Nietzsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Pereira, M. C. T., & Santos, M. A. (2016). Triple combinations with PGPR stimulate plant growth in micropropagated banana plantlets. *Applied Soil Ecology*, 103, 31–35.
- Souza, S. A., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A., Pereira, M. C. T., & Nietzsche, S. (2013).

- Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (Musa spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 252–264.
- Thomas, P., & Sekhar, A. C. (2014). Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. *AoB Plants*, 6.
- van Teeseling, M. C. F., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2017). Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Frontiers in microbiology*, 8, 1264.
- Velmourougane, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Agriculturally important microbial biofilms: present status and future prospects. *Journal of basic microbiology*, 57(7), 548–573.
- Wahlen, L. K., Mantei, J. R., DiOrio, J. P., Jones, C. M., & Pasmore, M. E. (2018). Production and analysis of a *Bacillus subtilis* biofilm comprised of vegetative cells and spores using a modified colony biofilm model. *Journal of microbiological methods*, 148, 181–187.
- Wu, Y., Ma, Y., Xu, T., Zhang, Q., Bai, J., Wang, J., Zhu, T., Lou, Q., Götz, F., & Qu, D. (2018). Nicotine enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by altering the bacterial autolysis, extracellular DNA releasing, and polysaccharide intercellular adhesin production. *Frontiers in microbiology*, 9, 2575.
- Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology*, 16(7), 2196–2211.
- Zhou, H., Luo, C., Fang, X., Xiang, Y., Wang, X., Zhang, R., & Chen, Z. (2016). Loss of *gltb* inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of γ -polyglutamate and three lipopeptides. *PLoS One*, 11(5), e0156247.
- Zhou, Y., & Gao, X. (2019). Characterization of biofilm formed by phenanthrene-degrading bacteria on rice root surfaces for reduction of PAH contamination in rice. *International journal of environmental research and public health*, 16(11), 2002.

3 CONCLUSÃO GERAL

O isolado EB-40 (*Bacillus cereus*) forma biofilmes em meio TSA, coloniza e produz biofilmes em raízes de explantes de bananeira ‘Prata Anã’ em fase de enraizamento em meio MS líquido e possui dois *clusters* de genes homólogos ao EPS1 e EPS2 de *Bacillus subtilis*.

O isolado EB-40 (*Bacillus* sp.) foi identificado a nível de espécie como *Bacillus cereus*. Possui genoma circular com um tamanho 5,37 Mb e dois plasmídeos circulares. A estirpe possui genes associados a assimilação de amônio, redução do nitrato, produção de fosfatases e produção de auxinas. O isolado é capaz de reduzir nitrato, produzir auxinas e biofilmes *in vitro*.