

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Julia Heinzmann

Identificação e caracterização de uma bactéria do gênero *Paenibacillus* com potencial para a promoção do crescimento de plantas

Porto Alegre
2018

Julia Heinzmann

Identificação e caracterização de bactéria do gênero *Paenibacillus* com potencial para a promoção do crescimento de plantas

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Celular e Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane M. P. Passaglia
Co-orientação: Dr^a. Adriana Ambrosini

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Heinzmann, Julia

Identificação e caracterização de bactéria do gênero *Paenibacillus* com potencial para a promoção do crescimento de plantas / Julia Heinzmann. -- 2018.

35 f.

Orientadora: Luciane Maria Pereira Passaglia.

Coorientadora: Adriana Ambrosini.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Microbiologia Agrícola. I. Pereira Passaglia, Luciane Maria, orient. II. Ambrosini, Adriana, coorient. III. Título.

Julia Heinzmann

Identificação e caracterização de bactéria do gênero *Paenibacillus* com potencial para a promoção do crescimento de plantas

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Andreia Carina Turchetto Zolet - UFRGS

Lívia Kmetzsch Rosa e Silva - UFRGS

Luciane Maria Pereira Passaglia - UFRGS (orientadora)

RESUMO

O crescimento e a produtividade das plantas são amplamente influenciados pelos micro-organismos do solo, especialmente as bactérias benéficas conhecidas como PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), as quais são encontradas ao redor das raízes ou associadas a tecidos vegetais. Membros do gênero *Paenibacillus* apresentam ampla diversidade metabólica e têm sido isolados de diferentes plantas e habitats. Em estudos anteriores, três bactérias anaeróbias facultativas formadoras de endósporos (denominadas P3E, P26E e P32E) foram isoladas da rizosfera de girassol cultivado em campos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Estes isolados apresentaram resultados positivos para fixação de nitrogênio e foram identificados como membros do gênero *Paenibacillus*, de acordo com análises preliminares do gene 16S rRNA. Os genomas desses isolados foram sequenciados e análises genômicas de identidade média de nucleotídeos (ANI e OrthoANI) e hibridização DNA-DNA digital (dDDH) foram realizadas. Nas três métricas, valores abaixo do ponto de corte foram obtidos quando os isolados de girassol foram comparados às linhagens-tipo das espécies intimamente relacionadas (*Paenibacillus graminis*, *Paenibacillus jilunlii* e *Paenibacillus sonchi*). Reconstruções filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA e no *core proteome* mostraram que P3E, P26E e P32E formam um grupo monofilético, o qual não incluiu nenhuma linhagem-tipo das espécies atuais de *Paenibacillus*. O isolado P26E, designado a linhagem-tipo da nova espécie, produziu endósporos elipsoidais com localização terminal sob crescimento em anaerobiose. Os principais ácidos graxos celulares foram anteiso-C_{15:0} e iso-C_{15:0}, que representaram cerca de 58 e 14% do total de ácidos graxos em P26E, respectivamente. A linhagem P26E apresentou um maior percentual de ácido graxo iso-C_{15:0}, ao invés de iso-C_{16:0}, contrastando com as demais espécies intimamente relacionadas. O valor encontrado para o conteúdo de DNA G+C foi de 49,4 mol%, aproximadamente 1% menor que o conteúdo de *Paenibacillus riograndensis*, *P. jilunlii*, *P. graminis* e *P. sonchi*. Com base em diferentes métricas genômicas, filogenia e dados fenotípicos (como redução de nitrato, crescimento em presença de 0,001% de lisozima, bem como análise da capacidade de produção de ácido a partir de diferentes fontes de carbono), foi sugerido que P26E^T representa a linhagem-tipo de uma nova espécie dentro do gênero *Paenibacillus*, para o qual o nome *Paenibacillus helianthi* sp. nov. foi proposto.

Palavras-chave: *Paenibacillus*, bactérias promotoras de crescimento vegetal, fixação de nitrogênio, filogenia do gene 16S rRNA, métricas genômicas.

ABSTRACT

Plant growth and productivity are largely influenced by soil microbes, especially the beneficial bacteria known as PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), which are found around roots or associated with plant tissues. Members of the genus *Paenibacillus* present broad metabolic diversity and have been isolated from different plants and habitats. In previous studies, three facultative anaerobic endospore-forming bacteria (designated P3E, P26E, and P32E) were isolated from the rhizosphere of sunflower grown in fields of Rio Grande do Sul State (Brazil). These isolates presented positive results for nitrogen fixation and were identified as members of the genus *Paenibacillus*, according to preliminary analyses of 16S rRNA gene. The genomes of these isolates were sequenced and genomic analyses of average nucleotide identity (ANI and OrthoANI) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) were performed. In the three metrics, values below the cut-off point were obtained when the sunflower isolates were compared to the closely related type-strain species (*Paenibacillus graminis*, *Paenibacillus jilunlii*, and *Paenibacillus sonchi*). *In silico* DNA-DNA hybridization (dDDH) also showed similarity ranges below the recommended threshold of 70%. Phylogenetic reconstructions based on 16S rRNA gene and core-proteome showed that P3E, P26E, and P32E form a monophyletic cluster, which did not include any type strain of the current *Paenibacillus* species. The isolate P26E, designated as type strain, produced ellipsoidal endospores terminally located in swollen sporangia, under anaerobiosis growth. Major cellular fatty acids were anteiso-C_{15:0} and iso-C_{15:0}, which represent about 58 and 14% of the total fatty acids in P26E, respectively. The strain P26E showed a high percentage of the fatty acid iso-C_{15:0} than iso-C_{16:0}, in contrast to other closely related species. The value found for the DNA G + C content of P26E was 49.4 mol %, approximately 1 percent lower than the content of *Paenibacillus riograndensis*, *P. jilunlii*, *P. graminis*, and *P. sonchi*. Based on different genomic metrics, phylogeny, and phenotypic data (like nitrate reduction, growth in the presence of 0,001% of lysozyme, as well as the analysis of the production of acid from different sources of carbon), it was suggested that P26E represents a type strain of a novel species within the genus *Paenibacillus*, for which the name *Paenibacillus helianthisp. nov.* was proposed.

Keywords: *Paenibacillus*, plant growth promoting bacteria, nitrogen-fixing, 16S rRNA gene phylogeny, genomic metrics.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Morfologia das células e endósporos da linhagem-tipo P26E ^T	19
Figura 2 – Filogenia do gene 16S rRNA de <i>Paenibacillus</i> spp.....	24
Figura 3 – Filogenia do <i>core proteome</i> de <i>Paenibacillus</i> spp.....	27
Tabela 1 – Características fenotípicas diferenciais	18
Tabela 2 – Perfis de ácidos graxos celulares	20
Tabela 3 – Dados relacionados à atividade da nitrogenase estimada por meio do ensaio de redução de acetileno a etileno	21
Tabela 4 – Capacidade de excretar amônia em meio de cultura sem nitrogênio	22
Tabela 5 – Percentuais de similaridade para o gene 16S rRNA	25
Tabela 6 – Comparações genômicas	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano

ANI: *Average Nucleotide Identity* (Identidade Nucleotídica Média)

ANM: *Agar Nutrient Medium*

DDH: *DNA-DNA hybridization*

dDDH: *digital DNA-DNA hybridization*

DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

GB: *Glucose Broth*

LB: Luria-Bertani

NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma reduzida)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NGS: *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

Ortho ANI: *Orthologous ANI*

PGPB: *Plant Growth Promoting Bacteria*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVAS	14
3. OBJETIVO GERAL	14
3.1. Objetivos específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas do solo exercem papéis cruciais no crescimento e desenvolvimento vegetal. A complexa associação entre plantas e micro-organismos, também referida como “segundo genoma vegetal”, afeta diretamente o cultivo e a produtividade de plantas agrícolas (BERENDSEN et al., 2012; MENDES et al., 2011; PANKE-BUISSE et al., 2015). Micro-organismos benéficos, neutros ou patogênicos são atraídos pela vasta gama de exsudatos liberados na rizosfera – zona do solo intimamente associada às raízes vegetais, mas também influenciada pelas mesmas (BAETZ; MARTINOIA, 2014). Além de colonizar a rizosfera, micro-organismos benéficos também podem ser encontrados no interior do tecido radicular (micro-organismos endofíticos e simbióticos) ou aderidos à superfície da raiz (micro-organismos associativos) (BERG; SMALLA, 2009).

Ao mesmo tempo em que os processos mediados pela comunidade microbiana estão sob forte influência do sistema radicular, os exsudatos vegetais também são liberados em resposta a sinais químicos emitidos pelos micro-organismos rizosféricos (CHAPARRO et al., 2012). Desta forma, os diferentes tipos e quantidades de compostos liberados pelas raízes, assim como açúcares, aminoácidos, flavonóides, ácidos alifáticos, proteínas e ácidos graxos, influenciam diretamente o estabelecimento de interações benéficas ou patogênicas na rizosfera (BAIS et al., 2006) (BADRI et al., 2009). Esse mútuo reconhecimento de sinais químicos se constitui em uma forma de comunicação entre plantas e micro-organismos, a qual pode ser bastante específica e variável para diferentes linhagens microbianas ou variedades vegetais.

O isolamento de micro-organismos presentes na rizosfera ou em associação com as raízes, sobretudo bactérias, é o primeiro passo para a obtenção de linhagens com potencial para a promoção de crescimento vegetal. O caráter benéfico é complexo e dependente de uma série de fatores, mas, de forma geral, certas características são um indicativo do potencial microbiano em estabelecer interações positivas com plantas. Dentre os principais mecanismos destacam-se a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfato, produção de hormônios e reguladores do crescimento vegetal, produção de sideróforos e a modulação da expressão gênica da ACC deaminase, enzima bacteriana capaz de atenuar eventos de estresses por degradação de ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), molécula precursora de etileno (DE SOUZA et al., 2015).

Devido à necessidade de manutenção das lavouras e o grande aumento populacional, tecnologias que possam alcançar o aumento da produtividade em menores áreas de plantio

têm se tornado um novo desafio para a agricultura. Atualmente, a produtividade dos mais diversos tipos de plantios, especialmente *commodities*, depende da aplicação excessiva de grandes quantidades de agrotóxicos e fertilizantes químicos. Dessa forma, a prevenção de futuros problemas ambientais depende do desenvolvimento e aplicação de práticas agrícolas que propiciem sistemas sustentáveis de cultivo. Nesse contexto, o emprego de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB, do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*) constitui-se em uma das alternativas mais promissoras para biofertilização ou controle biológico de cultivos agrícolas (PII et al., 2015).

A inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal é uma importante estratégia para a sustentabilidade da agricultura, pois tal tecnologia permite a redução ou até mesmo a eliminação do uso de pesticidas e fertilizantes químicos (CALVO et al., 2014; DE SOUZA et al., 2015). Leguminosas como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), por exemplo, são amplamente beneficiadas pela interação simbiótica mutualística com rizóbios, o que permite o cultivo sem adição de adubação nitrogenada. Como resultado dessa interação, nódulos são formados nas raízes das plantas fornecendo carboidratos como forma de energia para a bactéria, que, em troca, cede nitrogênio sob a forma de amônia, fixado a partir do nitrogênio atmosférico. A maneira mais prática e viável para adicionar bactérias às sementes é através da inoculação. Inoculantes são formulações líquidas ou turfosas contendo micro-organismos que atuam favoravelmente para o desenvolvimento de plantas, sendo geralmente produzidos com linhagens bacterianas específicas para determinados tipos de plantas (SIGNOR; DIONÍSIO; PIMENTEL, 2016).

Para a obtenção de um inoculante efetivo, diferentes quesitos são levados em conta, assim como a compatibilidade do produto com práticas rotineiras do campo, facilidade de uso, compatibilidade com o equipamento utilizado para a semeadura, capacidade de atuar em diferentes condições climáticas e de solo (por exemplo, capacidade de o micro-organismo colonizar plantas em solo ácido e/ou básico), bem como a compatibilidade da bactéria com os diferentes adjuvantes que aumentam o tempo de prateleira do produto (BASHAN et al., 2014).

Os inoculantes são normalmente comercializados em duas formas físicas: sólidos (em pó, sendo a turfa como base para as bactérias), e fluidos (inoculante líquido, com a bactéria estabilizada por protetores celulares). Atualmente, os inoculantes líquidos representam a maior parte do mercado nacional devido a sua facilidade de aplicação, a qual se dá por meio da mistura de sementes e um pequeno volume do produto líquido. Em comparação à fertilização química, a inoculação de sementes apresenta uma série de vantagens e

contribuições para uma prática agrônômica sustentável, como, por exemplo, a melhoria da qualidade do solo e a redução dos custos de cultivo e do impacto ambiental (SIGNOR; DIONÍSIO; PIMENTEL, 2016). Atualmente o cultivo de soja demanda a maior parte dos produtos comercializados no Brasil, sendo *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* as duas espécies bacterianas mais utilizadas na fabricação de inoculantes agrícolas (ANPII, 2018).

Dentre os gêneros bacterianos de maior importância agrícola pode-se destacar, além dos rizóbios, *Azospirillum*, *Bacillus* e *Paenibacillus* (GYANESHWAR et al., 2011). O gênero *Paenibacillus* foi proposto por ASH et al. (1993), de acordo com análises da sequência do gene 16S rRNA de diversas linhagens previamente classificadas como *Bacillus* (ordem Bacillales, filo Firmicutes). *Paenibacillus* são bactérias aeróbias ou facultativamente anaeróbias, gram-positivas ou gram-variáveis, formadoras de endósporos de posição terminal e esporos elipsoidais, e um conteúdo de DNA G + C variando entre 45 e 54%. Membros desse gênero também são encontrados em diferentes nichos ecológicos, tais como solos (BENEDUZI et al., 2010; BERGE et al., 2002; HONG et al., 2009), geleiras (KISHORE et al., 2010), bancos de areia (TRAIWAN et al., 2011), sedimentos marinhos (LEE et al., 2013), turfas (AW et al., 2016) e lagos de alta altitude (KIRAN et al., 2017).

Diferentes produtos contendo bactérias do gênero *Paenibacillus* vêm sendo patenteados e comercializados como agentes de controle biológico (também chamados de BCAs, do inglês *Biological Control Agents*). Algumas linhagens apresentam potencial antagônico contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos, como por exemplo, *Paenibacillus polymyxa* JZB 120001 e sua capacidade de ação contra diversos fungos e bactérias patogênicas (por exemplo, *Rhizoctonia cerealis* e *Agrobacterium tumefaciens*) (RYBAKOVA et al., 2016).

Em um estudo anterior (AMBROSINI et al., 2016), cerca de cem bacilos isolados da rizosfera de girassol (*Helianthus annuus* L.) foram avaliados quanto à capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico. Apenas sete isolados apresentaram resultados positivos (acima de 1 nmol de C₂H₄ mg proteína h⁻¹) para o ensaio de redução de acetileno a etileno, o qual fornece uma estimativa da atividade da nitrogenase, enzima chave para o processo de fixação de nitrogênio. O isolado denominado P26E apresentou os mais altos valores de atividade estimada da nitrogenase, além de um aumento significativo do peso seco e conteúdo de nutrientes da parte aérea de plantas cultivadas em vermiculita. A análise filogenética do gene 16S rRNA de diversas linhagens de *Paenibacillus* permitiu a observação de um agrupamento monofilético contendo P26E e outros dois isolados de girassol (P3E e P32E),

resultado de grande relevância taxonômica. Dessa forma, tais bactérias foram selecionadas para o emprego de uma caracterização polifásica com vistas à possibilidade de descrição de uma nova espécie bacteriana do gênero *Paenibacillus*. A correta identificação e caracterização de linhagens com potencial agrícola é de suma importância para a segurança do processo de inoculação, tendo em vista que o uso de linhagens patogênicas não se constitui em uma possibilidade viável.

Por ser uma cultura que apresenta características como ciclo curto, capacidade de adaptação a diferentes ambientes e elevado rendimento em óleo, quesitos desejáveis sob o ponto de vista agrônomo, o cultivo de girassol é uma boa opção aos produtores brasileiros (AMORIM et al., 2008; BACKES et al., 2008; CASTRO, 2017; F. PIRES et al., 2007; SILVA et al., 2007). Sua importância econômica está relacionada ao mercado de óleos comestíveis nobres, apicultura, alimentação animal, utilização ornamental e, mais recentemente, à produção de biodiesel (CASTRO, 2017; GAZZOLA et al., 2011). Segundo informações fornecidas pela Embrapa (2017), o girassol é principalmente cultivado como fonte de óleo comestível, sendo responsável por 16% da produção mundial. Suas sementes se destacam por apresentar excelentes características nutricionais e funcionais à dieta humana, pois possui uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (aproximadamente 65%) em relação aos saturados (cerca de 10%).

Atualmente, a caracterização polifásica de bactérias baseia-se na comparação de linhagens relacionadas por meio de métodos microbiológicos, bioquímicos, quimiotaxonômicos e moleculares. A identificação bacteriana baseada em análises fenotípicas tende a ser menos precisa do que aquela obtida por meio de métodos moleculares. Isso ocorre devido à falta de reprodutibilidade de muitos métodos bioquímicos e à heterogeneidade fenotípica encontrada entre diferentes linhagens de uma mesma espécie, o que dificulta a obtenção de dados suficientes ao emprego de uma correta classificação taxonômica (CHUN; RAINEY, 2014). Mesmo que os testes sejam realizados sob as mesmas condições e cuidadosamente manipulados, mínimas variações podem afetar a expressão gênica das espécies analisadas e, conseqüentemente, o padrão fenotípico esperado (THOMPSON et al., 2015).

Um dos principais objetivos da taxonomia microbiana é conceber um processo de classificação e identificação que seja estável, objetivo e garanta portabilidade entre diferentes análises laboratoriais. Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), dados genômicos são obtidos de forma rápida e menos custosa, permitindo que os

genomas de organismos possam ser seqüenciados com alta qualidade e utilizados em vários campos da microbiologia. A informação contida nas sequências genômicas fornece meios altamente informativos, objetivos e confiáveis para a inferência de relações filogenéticas que contribuam para a taxonomia de procariontes (CHUN et al., 2018). Dessa forma, atualmente, as métricas baseadas em análises genômicas foram incorporadas aos padrões mínimos de classificação de novas espécies bacterianas, dada a alta precisão dos resultados e a portabilidade dos dados (CHUN et al., 2018; SANT'ANNA et al., 2017).

Tradicionalmente, a hibridização DNA-DNA (DDH, do inglês *DNA-DNA hybridization*) tem sido chamada de “padrão ouro” da taxonomia de procariotos. A técnica de DDH mede o grau de similaridade entre os genomas de diferentes espécies com base em uma propriedade física do DNA, a complementaridade definida pela presença de diferentes números de pontes de hidrogênio entre os pares A – T e C – G. O princípio geral do DDH consiste em (i) fragmentação do DNA genômico das linhagens (espécie de interesse e linhagens-tipo das espécies intimamente relacionadas, ou linhagens de referência) em pequenos fragmentos de 600 a 800 pares de bases; (ii) desnaturação das fitas duplas de DNA por uso de alta temperatura; (iii) reanelamento das sequências por meio de gradual resfriamento (AUCH et al., 2010).

A substituição da técnica de hibridização DNA-DNA, tradicionalmente chamada de “padrão ouro” da taxonomia de procariotos, por métodos de maior acurácia e o emprego de análises genômicas e métricas como ANI, Ortho ANI e dDDH, tem sido sugerida por diversos autores (COLSTON et al., 2014; GORIS et al., 2007; KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; LEE et al., 2016; MEIER-KOLTHOFF et al., 2013; RICHTER; ROSSELLO-MORA, 2009; YOON et al., 2017a). ANI, do inglês *Average Nucleotide Identity*, refere-se à identidade nucleotídica média compartilhada entre os genomas de duas linhagens. Os valores de ANI são baseados nos alinhamentos da ferramenta Blastn e o ponto de corte desta métrica é o valor de 95%, ou seja, linhagens que compartilham valores de ANI $\geq 95\%$ podem ser consideradas representantes de uma mesma espécie. O mesmo ponto de corte é aplicado para o Ortho ANI, o qual se baseia nos mesmos princípios que o ANI, porém realizado apenas com genes ortólogos (LEE et al., 2016). O dDDH, do inglês *digital DNA-DNA hybridization* (também citado como GGDC, do inglês *Genome-to-Genome Distance Calculator*), é a versão *in silico* do método de hibridização DNA-DNA realizado rotineiramente *in vitro*. Valores de DDH $< 70\%$ são um indicativo de que o organismo testado pertence a uma espécie diferente daquela que foi utilizada como referência (AUCH et al., 2010).

Tendo em vista que as análises genômicas fornecem alta resolução para a caracterização e diferenciação de espécies, as técnicas dDDH, ANI e OrthoANI ocupam atualmente uma posição chave na taxonomia microbiana. De todo modo, dada a multiplicidade de informações residentes em sequências genômicas, a aplicação de dados do genoma para a inferência de relações filogenéticas – a chamada filogenômica, constitui-se em uma ferramenta essencial à classificação de espécies biológicas de modo geral. Ainda que percentuais de identidade e filogenias baseadas no gene 16S rRNA (ou mesmo em outros genes *housekeeping*) sejam ferramentas úteis para a classificação de espécies bacterianas, o uso de um conjunto maior de genes principais, tal como realizado com a filogenia do *core proteome*, permite que uma estrutura taxonômica mais robusta seja alcançada (CHUN et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVAS

O uso indiscriminado de fertilizantes na agricultura traz severas consequências ao meio ambiente, sobretudo quanto à redução de qualidade do solo, poluição atmosférica e eutrofização das águas. Os fertilizantes biológicos são uma importante estratégia para a agricultura sustentável, pois o uso de tal tecnologia permite a redução ou até mesmo a eliminação do uso de pesticidas e/ou fertilizantes sintéticos (DE SOUZA et al., 2015). A seleção de inoculantes com potencial para uso na agricultura está relacionada à busca de determinadas características microbianas que possam contribuir para a promoção do crescimento vegetal, assim como os processos de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos e produção de reguladores do crescimento vegetal e sideróforos (BASHAN et al., 2014). Entretanto, estudos taxonômicos são cruciais para a segurança do processo de inoculação e reintrodução de determinados micro-organismos ao meio ambiente. Para tal, análises filogenéticas e comparações genômicas são essenciais para o estudo das relações de parentesco ou eventual associação com grupos de bactérias patogênicas. Dessa forma, o presente trabalho pretende empregar uma caracterização polifásica para a descrição de uma nova espécie bacteriana, a fim de contribuir para o estudo de micro-organismos com potencial utilização agrícola.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliação e caracterização de três isolados da rizosfera de girassol por meio de análises fenotípicas, genotípicas e genômicas, em comparação com linhagens-tipo de espécies intimamente relacionadas, para a descrição de uma nova espécie bacteriana do gênero *Paenibacillus*.

3.1. Objetivos específicos

- Verificar a capacidade de crescimento na presença de lisozima e NaCl, bem como a hidrólise de amido e caseína e redução de nitrato, dentre outros testes bioquímicos;
- Avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio e excreção de amônia *in vitro*;
- Analisar o perfil de ácidos graxos celulares;
- Analisar a esporulação e morfologia dos esporos;
- Utilizar dados genômicos para a comparação do percentual de identidade nucleotídica (ANI), OrthoANI e hibridização DNA-DNA digital (dDDH);
- Inferir relações filogenéticas baseadas no gene 16S do RNA ribossomal e *core proteome*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bactérias e condições de cultivo

As linhagens bacterianas caracterizadas neste trabalho (P26E^T, P3E e P32E) foram rotineiramente cultivadas em King B (GLICKMANN et al., 1995) a 28°C e 120 rpm, bem como as linhagens-tipo das espécies intimamente relacionadas: *Paenibacillus graminis* RSA19^T, *Paenibacillus jilunlii* Be17^T, *Paenibacillus sonchi* X19-5^T, *Paenibacillus riograndensis* SBR5^T e *Paenibacillus polymyxa* IAM 13419^T (linhagem-tipo do gênero *Paenibacillus*).

4.2 Caracterização fenotípica e morfológica

Testes fenotípicos foram realizados de acordo com HOLT (1986; 2000) e MACFADDIN (2000). A atividade da catalase foi avaliada pela produção de bolhas através do contato das células com o peróxido de hidrogênio a 3%. O crescimento na presença de sal foi determinado em meio King B com a adição de 3 ou 5% de NaCl. King B também foi usado para testar o crescimento na presença de lisozima (0,001% v/v). Hidrólises de amido e caseína foram analisadas inoculando 20 µL de um caldo de cultura cultivado por 24 h em placas de ágar substrato de cada nutriente, seguido de avaliação da formação de halo. A redução de nitrato, a reação de Voges-Proskauer e a produção de ácido a partir da fermentação de diferentes substratos foram realizadas de acordo com MACFADDIN (2000). A faixa de pH (4-10) para o crescimento foi determinada em meio King B. Todos os testes foram realizados em triplicata e avaliados após 48 ou 72 h de incubação a 28°C.

A morfologia e o tamanho das colônias foram observados em placas de King B ágar após 3 dias a 28°C. A coloração de Gram foi realizada de acordo com procedimentos padrão (MOALEDJ, 1986). A análise da morfologia dos esporos foi realizada por meio da utilização de diferentes meios de cultura (ANM, AK, LB, GB e King B) e condições de cultivo. Células Gram-variáveis foram observadas em fotomicrografias usando microscopia óptica de contraste de fase (100x) juntamente com o software AxionVision (Zeiss®). Os cultivos foram analisados por microscopia de contraste de fase (Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Genética, UFRGS) e de varredura (LabCEMM, PUCRS).

4.3 Análise da fixação de nitrogênio e excreção de amônia

Para ambos os ensaios, as linhagens foram cultivadas de acordo com SELDIN e colaboradores (1983). A atividade da nitrogenase foi avaliada por meio do ensaio de redução de acetileno *in vitro* e cromatografia gasosa, como descrito por AMBROSINI et al. (2012). A determinação espectrofotométrica da amônia foi avaliada de acordo com o método do indofenol (BOLLETER et al., 1961). Cloreto de amônio foi utilizado como controle e nove repetições avaliadas por amostra, em cinco diferentes tempos de cultivo (24, 48, 72, 96 e 120 h).

4.4 Análise do perfil de ácidos graxos celulares

Extração e análise de ácidos graxos celulares foram realizadas pelo Serviço de Identificação do DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,

Braunschweig, Alemanha). Ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos a partir de 40 mg de células de placas de Petri por saponificação, metilação e extração usando o método de MILLER (1982) com pequenas modificações e KUYKENDALL et al. (1988). As misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos foram separadas por cromatografia gasosa de acordo com KÄMPFER e KROPPESTEDT (1996).

4.5 Análises genômicas e filogenéticas

O DNA genômico dos isolados foi extraído de acordo com AMBROSINI e colaboradores (2012). Os genomas foram sequenciados através da plataforma MiSeq Illumina, utilizando-se MiSeq Reagent Kit V3. A montagem e anotação dos genomas foram realizadas de acordo com SANT'ANNA e colaboradores (2017). Para as análises genômicas foram empregados os métodos de identidade nucleotídica média (ANI), Ortho ANI (ANI com genes ortólogos) e hibridização DNA-DNA digital (dDDH) (SANT'ANNA et al., 2017). ANI e OrthoANI foram calculados através do software OAT versão 0.93 (LEE et al., 2016). Os valores de dDDH foram computados no GGDC (*Genome-to-Genome Distance Calculator*) utilizando GGDC 2.0 BLAST+ e a fórmula recomendada 2 (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

As sequências dos genes 16S rRNA de linhagens-tipo das espécies de *Paenibacillus* estreitamente relacionadas foram obtidas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI (GenBank). Valores de similaridade par a par para o gene 16S rRNA (1.334 nucleotídeos, sem *gaps*) foram calculadas com BioEdit (HALL, 1999) e EzBio Cloud (YOON et al., 2017b), após o alinhamento realizado com parâmetros padrão do RDP (Ribosomal Database Project; COLE et al., 2014). Um total de 1.804 proteínas ortólogas (a partir de genes de cópia única) presentes em todas as linhagens de *Paenibacillus* analisadas foram alinhadas e concatenadas de acordo com SANT'ANNA et al. (2017) usando Phyutility (SMITH; DUNN, 2008). Reconstruções filogenéticas do gene 16S rRNA e *core proteome* foram realizadas conforme descrito por (SANT'ANNA et al., 2017). As reconstruções filogenéticas foram realizadas com o software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) usando *Neighbor Joining* com o modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood* e *bootstrap* de 1.000 replicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, a caracterização polifásica de três linhagens do gênero *Paenibacillus* foi realizada com vistas à possibilidade de descrição de uma nova espécie de bactéria. As bactérias foram previamente isoladas da rizosfera de girassol (AMBROSINI et al., 2016) e o isolado denominado P26E foi escolhido, neste estudo, como linhagem-tipo da nova espécie, tendo como base resultados prévios e expressivos para a promoção de crescimento de girassol (AMBROSINI et al., 2016). Dentre os testes bioquímicos realizados, os seguintes resultados diferenciais foram observados: (i) as estirpes P26E^T, P3E e P32E não cresceram em meio de cultura contendo 0,001% de lisozima, diferentemente das linhagens-tipo intimamente relacionadas; (ii) P26E^T não foi capaz de produzir ácido a partir do cultivo em meio de cultura contendo glicerol e manitol, embora essa característica tenha sido positiva para as outras linhagens, incluindo P3E e P32E; (iii) as três linhagens também não cresceram na presença de NaCl a 3%, semelhante às linhagens-tipo de *P. jilunlii* Be17^T e *P. graminis* RSA19^T (Tabela 1).

Tabela 1: Características fenotípicas diferenciais das linhagens analisadas nesse estudo: 1, P26E^T; 2, P3E; 3, P32E; 4, *P. graminis* RSA19^T; 5, *P. jilunlii* Be17^T; 6, *P. riograndensis* SBR5^T; 7, *P. sonchi* X19-5^T; 8, *P. polymyxa* ATCC 842^T.

Características fenotípicas	1	2	3	4	5	6	7	8
Atividade da catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Redução de nitrato	+	+	—	+	+	+	+	+
Crescimento:								
3 % (v/v) NaCl	—	—	—	—	—	+	+	+
5 % (v/v) NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—
0.001 % (v/v) lisozima	—	—	—	+	+ ¹	+	+	— ²
Hidrolise de:								
Amido	+	+	+	+	—	+	—	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção de ácido a partir de:								
Glicerol	—	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	—	+	+	+	+	+	+	+
D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Teste de Voges-Proskauer	—	—	—	—	—	—	—	—

Símbolos: +, positivo; — negativo. ¹JIN et al., 2011. ²MA et al., 2007.

A capacidade de esporulação dos três isolados foi analisada em diversas condições e meios de cultura, mas apenas no cultivo em anaerobiose e meio King B, com 72 h de incubação a 28°C, tal característica pôde ser observada. Diferentes formas celulares puderam ser observadas em fotomicrografias obtidas em microscópio de contraste de fase (Fig. 1A) ou de varredura (Fig. 1B), tais como as células vegetativas e os endósporos em formação ou já formados. As células da linhagem P26E^T possuem a forma de bastonete ($0,3 \pm 0,6$ por $3,5 \pm 3,8$ μm) e endósporos elipsoidais localizados terminalmente em esporângios ligeiramente inchados. As características fenotípicas não diferenciais são apresentadas, juntamente com os demais resultados, na seção de descrição geral da espécie, no item Conclusão.

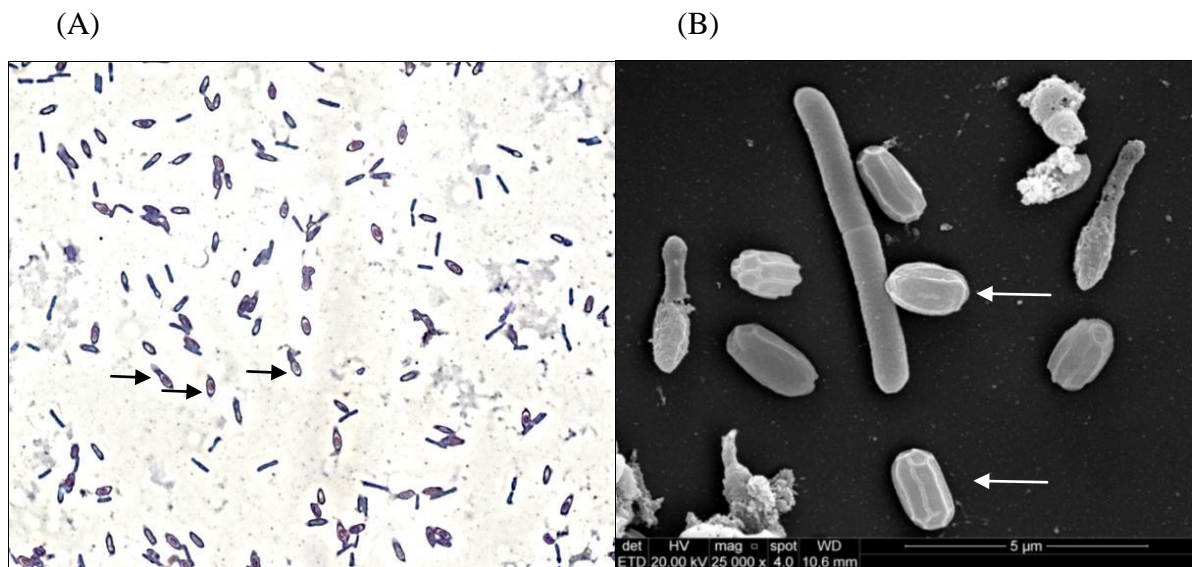


Figura 1: Morfologia das células e endósporos da linhagem P26E^T: (A) Fotomicrografia das células coradas pelo método padrão de Gram, utilizando microscopia de contraste de fase e, (B) Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo. Setas pretas em (A) e brancas em (B) indicam endósporos maduros.

Em relação às características quimiotaxonômicas, a linhagem P26E^T apresentou anteiso-C_{15:0} e iso-C_{15:0} como os ácidos graxos celulares mais abundantes, representando cerca de 58 e 14% do total de ácidos graxos caracterizados para esta linhagem, respectivamente (Tabela 2). Segundo ASH et al. (1993), anteiso-C_{15:0} é o principal ácido graxo celular em *Paenibacillus* spp. Em contraste com as linhagens-tipo intimamente relacionadas, o ácido graxo iso-C_{15:0} foi mais abundante que iso-C_{16:0} na linhagem P26E^T.

Tabela 2. Perfis de ácidos graxos celulares (%) das novas linhagens e das linhagens de referência. 1, P26E^T; 2, P32E; 3, *P. graminis* RSA19^T; 4, *P. jilunlii* Be17^T; 5, *P. riograndensis* SBR5^T; 6, *P. sonchi* X19-5^T. Os resultados para as linhagens P26E^T e P32E foram obtidos através do serviço de identificação do DSMZ (Braunschweig, Alemanha). Outros resultados foram obtidos de JIN et al. (2011).

Tipo de ácido graxo	1	2	3	4	5	6
C _{14:0}	1,4	1,9	7,3	5,2	7,0	3,6
C _{16:0}	8,3	8,8	7,1	11,8	16,8	8,6
iso-C _{14:0}	2,0	2,3	28,5	15,0	5,0	22,1
iso-C _{15:0}	12,1	18,5	5,0	4,3	6,3	4,7
iso-C _{16:0}	7,2	6,7	11,2	13,3	6,5	16,1
iso-C _{17:0}	3,5	3,2	nd	nd	0,9	0,6
anteiso-C _{15:0}	57,7	53,9	36,2	30,9	44,4	35,9
anteiso-C _{17:0}	4,6	3,0	0,4	1,9	1,8	1,1

nd = não determinado. Os resultados não foram determinados para a linhagem P3E.

Em relação à capacidade de fixar nitrogênio, a linhagem P26E^T apresentou notável atividade de nitrogenase (estimada por meio do ensaio de redução de acetileno a etileno), em comparação com as estirpes P3E e P32E (Tabela 3) (AMBROSINI et al., 2016). Verificou-se que as três linhagens isoladas da rizosfera de girassol foram capazes de excretar volumes significativos de amônia no tempo de 96 h (Tabela 4), resultado que pode estar associado a características de promoção do crescimento de plantas.

Análises *in silico* revelaram que os principais genes de fixação de nitrogênio *nifH*, *nifD* e *nifK* são muito similares entre as linhagens. Entretanto, como demonstrado na Tabela 4, as linhagens apresentaram atividades diferenciais de fixação de nitrogênio na condição testada. De fato, a variabilidade da fixação de nitrogênio entre linhagens de *Paenibacillus* tem sido relatada por meio de ensaios de redução de acetileno (XIE et al., 2012) e comparações genômicas (EASTMAN, 2014; XIE et al., 2014).

Genes que codificam a nitrito redutase dependente de NADH citoplasmático (*nirB*) ou sua variante de duas subunidades (*nirBD*) (SIMON, 2002) foram encontrados nas montagens preliminares dos genomas das linhagens P26E^T, P3E e P32E. NirBD está envolvido com a redução de nitrito a amônio em processos de redução assimilatória e dissimilatória (RODIONOV et al., 2005). Em contraste, os genes envolvidos na desnitrificação não foram

encontrados, isto é, *nirK* ou *nirS* (redutase de nitrito a óxido nítrico), *norBC* (redutase do óxido nítrico a óxido nitroso), e *nosZ* (redutase do óxido nitroso a dinitrogênio) (RODIONOV et al., 2005). Conceitualmente, os processos de desnitrificação e oxidação anaeróbica de amônio (anammox) levam à perda de nitrogênio, ao contrário da fixação de nitrogênio e da redução dissimilatória de nitrato a amônio (DNRA), que promovem a retenção de nitrogênio nos solos (RODIONOV et al., 2005; WELSH et al., 2014). Dessa forma, as análises *in silico* sugerem que as linhagens de girassol, principalmente P3E e P26E^T, podem apresentar potencial para processos bióticos de retenção de nitrogênio nos ecossistemas.

Tabela 3. Estimativa da atividade da nitrogenase para as linhagens P26E^T, P3E, P32E e as linhagens de referência. A atividade foi inferida após 2 h sob atmosfera gasosa contendo 2% de acetileno.

Linhagens bacterianas	nmol C ₂ H ₄ mg proteína h ⁻¹
P26E ^T	74,7 (± 24,2) ¹
P3E	28,6 (± 7,5) ¹
P32E	0,16 (0,1) ¹
<i>P. graminis</i> RSA19 ^T	108,3 (± 15,2)
<i>P. jilunlii</i> Be17 ^T	236,86 (± 36,7) ²
<i>P. riograndensis</i> SBR5 ^T	543,0 (± 0,5)
<i>P. sonchi</i> X19-5 ^T	129,8 (± 82,2) ³

Os resultados são média (± desvio padrão) de três repetições. ¹AMBROSINI et al., (2016) relataram os seguintes resultados: P26E^T (64,62), P3E (3,72), P32E (0,008). ²JIN et al., (2011). ³HONG et al., (2009).

Tabela 4. Dados relacionados à excreção de amônia pelas linhagens P26E^T, P3E, P32E e linhagens-tipo de referência.

Linhagens bacterianas	μM NH ₄ / sobrenadante				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
P26E ^T	0,310 (± 0,187) a	0,381 (± 0,167) a	1,013 (± 0,042) b	0,967 (± 0,033) a	0,924 (± 0,050) b
P3E	0,214 (± 0,080) a	0,317 (± 0,113) a	1,069 (± 0,044) b	0,951 (± 0,045) a	0,947 (± 0,046) c
P32E	0,341 (± 0,049) a	0,252 (± 0,107) b	1,021 (± 0,058) b	0,953 (± 0,082) a	0,809 (± 0,062) e
<i>P. graminis</i> RSA19 ^T	0,348 (± 0,076) a	0,240 (± 0,109) b	0,881 (± 0,038) c	0,849 (± 0,083) b	0,861 (± 0,065) c
<i>P. jilunlii</i> Be17 ^T	Nd	Nd	0,887 (± 0,049) c	0,916 (± 0,113) a	0,862 (± 0,041) c
<i>P. riograndensis</i> SBR5 ^T	0,255 (± 0,104) a	0,236 (± 0,101) b	3,083 (± 0,115) a	0,998 (± 0,028) a	1,073 (± 0,058) a
<i>P. sonchi</i> X19-5 ^T	0,264 (± 0,091) a	0,120 (± 0,080) c	0,742 (± 0,059) d	0,759 (± 0,062) c	0,733 (± 0,060) d
<i>Coefficiente de Variação</i>	41,61%	48,62%	5,05%	7,95%	6,21%

Os resultados são média (± desvio padrão) de nove repetições. Nd = não determinado. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas no nível 0,01 (Software Beta Assistat 7.7; SILVA, 1996). Valores na mesma coluna seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente em P < 0,01 (one-way ANOVA; teste de Scott-Knott).

O gene do RNA ribossomal 16S é amplamente utilizado na caracterização de gêneros e espécies de bactérias, seja por meio do percentual de identidade compartilhado com outras linhagens ou sua utilização em reconstruções filogenéticas. Tendo em vista a função biológica essencial do 16S rRNA, além de suas diversas regiões bem conservadas, tal gene tornou-se o principal marcador molecular para estudos que empregam a caracterização de bactérias (CASE et al., 2007).

No presente estudo, comparações entre as linhagens da nova espécie e seus parentes mais próximos resultaram em valores de similaridade acima do limiar de 98,65% definido por KIM et al. (2014) para demarcação de espécies (Tabela 5). No entanto, como avaliado por SANT'ANNA e colaboradores (2017), tal ponto de corte não é aplicável para diferenciar as espécies *P. graminis*, *P. jilunlii* e *P. sonchi* (genomovares Sonchi e Riograndensis), cujos genes 16S rRNA são altamente conservados. Outros estudos também estabeleceram que o gene 16S rRNA pode não ser um marcador taxonômico apropriado para discriminar certos organismos em nível de espécie (BACH et al., 2017; CHAN et al., 2012; FOX et al., 1992). De fato, algumas linhagens-tipo de *Paenibacillus* analisadas neste estudo (*P. graminis*, *P. jilunlii*, *P. riograndensis* e *P. sonchi*) também compartilham percentuais de similaridade superiores a 98,65% entre si.

De acordo com a filogenia do gene 16S rRNA, as linhagens P26E^T, P3E e P32E formaram um grupo monofilético separado das outras linhagens do gênero *Paenibacillus* analisadas (Figura 2). A filogenia do *core proteome* suportou a monofilia do grupo formado pelas linhagens P26E^T, P3E e P32E, e também demonstrou que elas não são clones (Figura 3).

Ao considerar diferentes métricas taxogenômicas, as linhagens P26E^T, P3E e P32E apresentaram valores acima dos limiares de circunscrição de espécies quando comparadas entre si (Tabela 6): valores de ANI e Ortho ANI acima de 98% e valores de dDDH acima de 89%. Por outro lado, tais linhagens apresentaram valores de ANI, Ortho ANI e dDDH inferiores aos pontos de corte quando comparadas às linhagens-tipo mais próximas, resultado decisivo para a descrição de uma nova espécie bacteriana (Tabela 6).

Em conclusão, por meio do emprego de uma abordagem polifásica, as linhagens P26E^T, P3E e P32E puderam ser caracterizadas como representantes de uma nova espécie do gênero *Paenibacillus*, para a qual o nome *Paenibacillus helianthi* foi proposto. O TaxoNumber do banco de dados *The Digital Protologue* (ROSSELLÓ-MÓRA et al., 2017) para a linhagem-tipo P26E^T é TA00608.

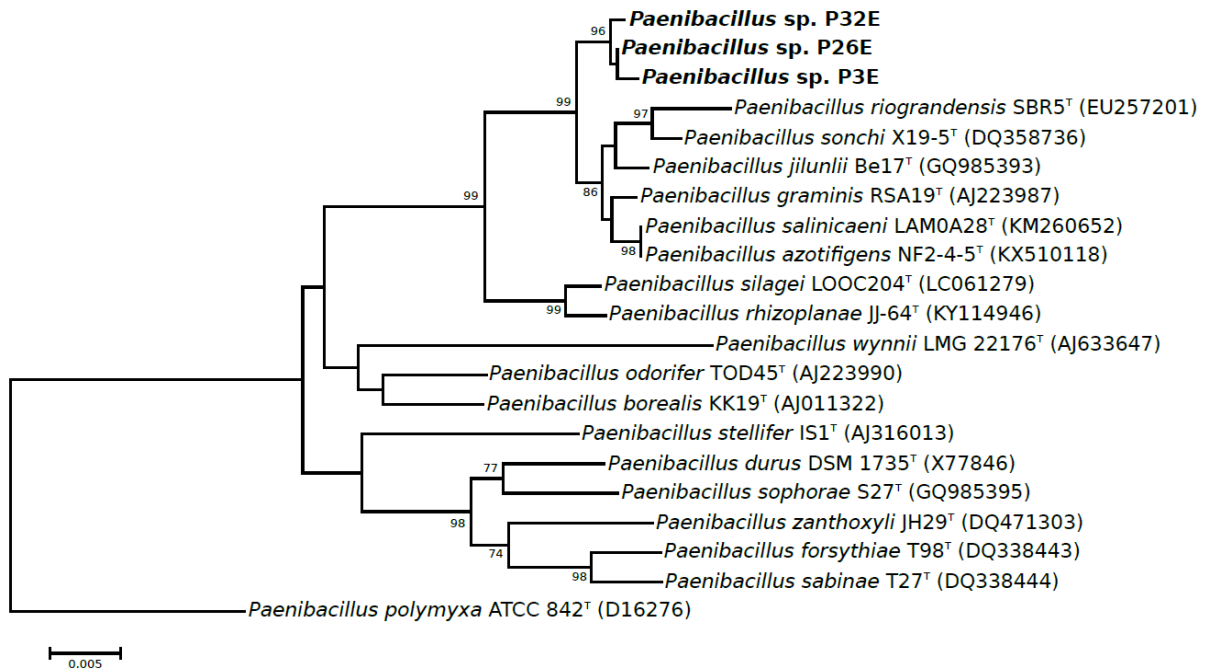


Figura 2. Filogenia do gene 16S rRNA de *Paenibacillus* spp. (*Neighbor Joining* e modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood*). Valores de *bootstrap* maiores que 70% são mostrados ao lado das ramificações. As linhagens da nova espécie proposta estão em negrito. Em parênteses estão os números de acesso das sequências no GenBank.

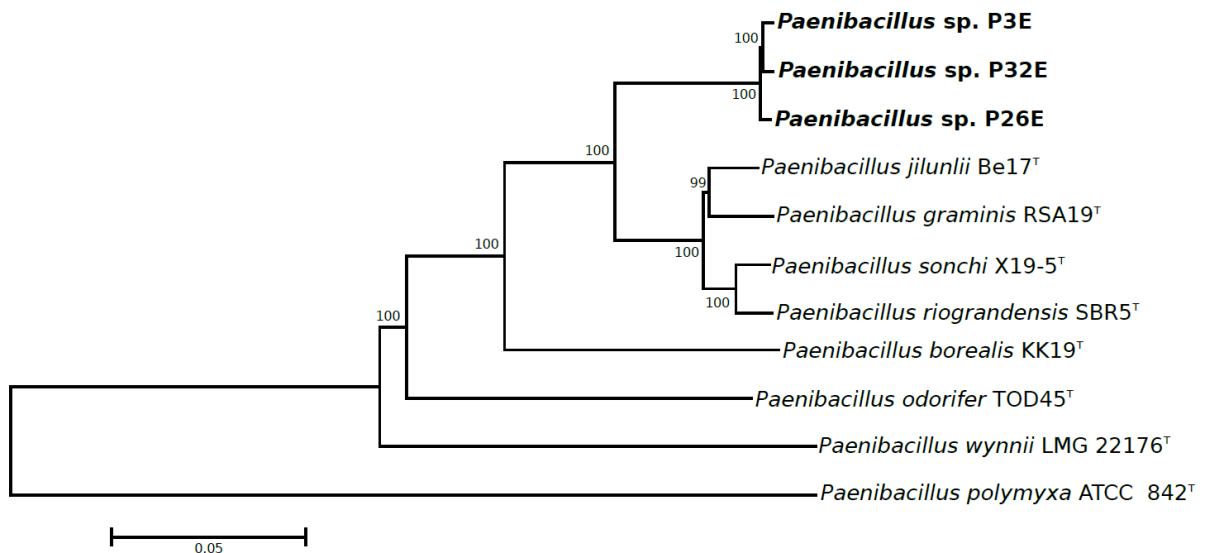


Figura 3. Filogenia do *core proteome* de *Paenibacillus* spp. (*Neighbor Joining* e modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood*). Valores de *bootstrap* maiores que 70% são mostrados ao lado das ramificações. As linhagens da nova espécie proposta estão em negrito.

Tabela 5. Similaridade aos pares para as linhagens P3E, P26E^T, P32E e seus parentes próximos. Os números de acesso do gene 16S rRNA são mostrados entre parênteses.

Hit-taxon	16S rRNA query							
	P3E	P26E ^T	P32E	NF2-4-5 ^T	RSA19 ^T	Be17 ^T	LAM0A28 ^T	SBR5 ^T
P3E (MH014097)	*	*	*	*	*	*	*	*
P26E ^T (MH014098)	99,8	*	*	*	*	*	*	*
P32E (MH014096)	99,5	99,7	*	*	*	*	*	*
<i>P. azotifigens</i> NF2-4-5 ^T (KX510118.1)	98,8	99,0	98,9	*	*	*	*	*
<i>P. graminis</i> RSA19 ^T (AJ223987)	99,1	99,2	99,1	99,4	*	*	*	*
<i>P. jilunlii</i> Be17 ^T (GQ985393)	98,6	98,8	98,8	99,2	99,2	*	*	*
<i>P. salinicaeni</i> LAM0A28 ^T (KM260652.1)	98,8	99,0	98,9	100	99,4	99,2	*	*
<i>P. riograndensis</i> SBR5 ^T (EU257201)	98,4	98,5	98,4	98,6	98,8	98,7	98,6	*

Tabela 6. Comparações genômicas aos pares entre as linhagens P3E, P26E^T, P32E e seus parentes mais próximos.

Linhagens	P3E	P26E ^T	P32E	RSA19 ^T	Be17 ^T	SBR5 ^T	X19-5 ^T
P3E	*	89,90	90,00	29,60	29,40	29,20	29,60
P26E ^T	98,79 (98,83)	*	90,40	29,50	29,40	29,10	29,50
P32E	98,79 (98,87)	98,84 (98,88)	*	29,50	29,30	29,10	29,40
<i>P. graminis</i> RSA19 ^T	84,45 (84,93)	84,37 (84,86)	84,46 (84,96)	*	51,60	47,60	51,60
<i>P. jilunlii</i> Be17 ^T	84,46 (84,87)	84,40 (84,90)	84,46 (84,95)	93,28 (93,50)	*	51,30	53,10
<i>P. riograndensis</i> SBR5 ^T	84,10 (84,71)	84,00 (84,58)	84,04 (84,63)	92,07 (92,47)	93,05 (93,36)	*	73,20
<i>P. sonchi</i> X19-5 ^T	84,22 (84,79)	84,18 (84,73)	84,18 (84,76)	92,27 (92,69)	93,50 (93,80)	96,66 (96,92)	*

Os valores correspondentes ao dDDH são apresentados no triângulo superior da matriz. Os valores de ANI e Ortho ANI são apresentados no triângulo inferior da matriz. Os valores de Ortho ANI estão entre parênteses. Valores acima do limiar de circunscrição das espécies estão em negrito: dDDH \geq 70%, ANI e Ortho ANI \geq 95%.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com a aplicação de metodologia polifásica para estudos taxonômicos de bactérias e ênfase nas análises genômicas e reconstruções filogenéticas, o presente estudo descreve a caracterização de uma nova espécie de *Paenibacillus*, denominada *Paenibacillus helianthi*. As células de tal espécie são Gram-variáveis, anaeróbicas facultativas e seus endósporos são produzidos sob anaerobiose; os esporos elipsoidais são localizados terminalmente nos esporângios. As colônias são brancas, translúcidas, circulares e com tamanho variando entre 1 e 2 mm de diâmetro quando a bactéria é cultivada em meio King B (condições de 72 h sob 28°C).

A presença de 3 e 5% de NaCl no meio de cultura não permitiu o crescimento bacteriano, bem como o mesmo foi inibido na presença de 0,001% de lisozima. Obteve-se resultado positivo para a atividade da catalase e redução de nitrato, assim como para os testes de hidrólise de caseína e amido. A produção de ácido ocorreu a partir do crescimento em meio de cultura contendo D-glicose, D-xilose, lactose, maltose e sacarose, mas apenas a linhagem-tipo P26E^T não foi capaz de produzir ácido a partir de glicerol e manitol. Os principais ácidos graxos da linhagem-tipo P26E^T são anteiso-C_{15:0} e iso-C_{15:0}. O conteúdo de DNA G + C está na faixa de 49,4 – 49,6 mol%.

De acordo com os resultados obtidos, os três isolados de girassol, sobretudo a linhagem-tipo P26E^T, são diazotróficos com capacidade de excretar amônia, características de grande relevância para a promoção do crescimento de plantas. A linhagem P26E^T constitui-se em um bom candidato a inoculante de uso agrícola, sobretudo no cultivo de girassol. Para averiguação do potencial agrônomo desse isolado, experimentos a campo deverão ser empregados para avaliação da produtividade de grãos sob reduzida fertilização nitrogenada, de acordo com as normas do MAPA (2011).

O cultivo do girassol ainda necessita de adequações aos diferentes sistemas de produção das culturas tradicionais, como milho (*Zea mays*), soja, cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e arroz (*Oryza sativa*), entre outras, assim como carece de incrementos à produtividade e bons rendimentos da cultura (CASTRO, 2017; SMIDERLE; DA COSTA, 2012). Desta forma, o uso de inoculantes se constitui em uma alternativa promissora e economicamente viável, sendo de crucial importância o estudo e a caracterização de linhagens bacterianas com potencial para a promoção de crescimento vegetal.

Com base nos resultados aqui expostos, o presente trabalho contribuiu para a descrição de uma nova espécie de bactéria isolada da rizosfera de girassol cultivado em solos gaúchos. Tais resultados foram publicados no periódico *Antonie van Leeuwenhoek*, em julho de 2018. A caracterização adequada de linhagens bacterianas com potencial de uso agrícola é essencial para a segurança do processo de inoculação, em que as bactérias aderidas às sementes são reintroduzidas nos solos. Como perspectivas, a patente e a utilização comercial de uma formulação a base da linhagem P26E^T podem contribuir para o cultivo sustentável de girassol, uma oleaginosa de alta importância econômica e boa opção para o uso em rotação de culturas.

7. REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, A. et al. Diazotrophic bacilli isolated from the sunflower rhizosphere and the potential of *Bacillus mycoides* B38V as biofertiliser. **Annals of Applied Biology**, [s. l.], 2016.
- AMBROSINI, Adriana et al. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant and Soil**, [s. l.], 2012.
- AMORIM, Edson Perito et al. Correlações e análise de trilha em girassol. **Bragantia**, [s. l.], 2008.
- ANPII. **Mapa homologa coleção de micro-organismos da Embrapa Soja para o uso em inoculantes**. 2018.
- ASH, Carol; PRIEST, Fergus G.; COLLINS, M. David. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], 1993.
- AUCH, Alexander F. et al. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], 2010.
- AW, Yoong Kit et al. Newly isolated *Paenibacillus tyrfis* sp. nov., from Malaysian tropical peat swamp soil with broad spectrum antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], 2016.
- BACH, Evelise et al. Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov. **Pathogens and Disease**, [s. l.], 2017.
- BACKES, Rogério Luiz et al. Desempenho de cultivares de girassol em duas épocas de plantio de safrinha no planalto norte catarinense. **Scientia Agraria**, [s. l.], 2008.
- BADRI, Dayakar V. et al. **Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions**. **Current Opinion in Biotechnology**, 2009.
- BAETZ, Ulrike; MARTINOIA, Enrico. Root exudates: The hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, 2014.
- BAIS, Harsh P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], 2006.
- BASHAN, Yoav et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, 2014.
- BENEDUZI, Anelise et al. *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2010.

BERENDSEN, Roeland L. et al. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in plant science**, [s. l.], 2012.

BERG, Gabriele; SMALLA, Kornelia. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, 2009.

BERGE, O. et al. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2002.

BERGEY, D. H. (David Hendricks); KRIEG, Noel R.; HOLT, John G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore MD: Williams & Wilkins, 1984. Disponível em: <<http://www.worldcat.org/title/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology/oclc/9042846>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

BOLLETER, W. T.; BUSHMAN, C. J.; TIDWELL, P. W. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol. **Analytical Chemistry**, [s. l.], 1961.

CALVO, Pamela; NELSON, Louise; KLOEPPER, Joseph W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, 2014.

CASE, Rebecca J. et al. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], 2007.

CASTRO, César. Expansão do girassol no Brasil. **XVII Reunião Nacional de Pesquisa de Girassol**. [s.l: s.n.].

CHAN, Jacqueline Z. M. et al. Defining bacterial species in the genomic era: Insights from the genus *Acinetobacter*. **BMC Microbiology**, [s. l.], 2012.

CHAPARRO, Jacqueline M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, 2012.

CHUN, Jongsik et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2018.

CHUN, Jongsik; RAINEY, Fred A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2014.

COLE, James R. et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, 2014.

COLSTON, Sophie M. et al. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *aeromonas* as a test case. **mBio**, [s. l.], v. 5, n. 6, 2014.

DE SOUZA, Rocheli; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciane M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, [s.

l.], 2015.

EASTMAN, Alexander W.; HEINRICHS, David E.; YUAN, Ze Chun. Comparative and genetic analysis of the four sequenced *Paenibacillus polymyxa* genomes reveals a diverse metabolism and conservation of genes relevant to plant-growth promotion and competitiveness. **BMC Genomics**, [s. l.], 2014.

F. PIRES, João Leonardo et al. Avaliação de genótipos de girassol no Planalto Médio do Rio Grande do Sul na safra 2008/2009. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, [s. l.], 2007.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], 1992.

GAZZOLA, Adriano et al. Universidade de São Paulo Departamento de Produção Vegetal A CULTURA DO GIRASSOL. [s. l.], p. 1–69, 2011.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 1995.

GORIS, Johan et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 81–91, 2007.

GYANESHWAR, Prasad et al. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1276–1288, 2011. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-06-11-0172>>

HALL, Thomas A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, 1999. Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>

HONG, Yuan Yuan et al. *Paenibacillus sonchi* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2009.

JIN, Hao Jie et al. *Paenibacillus jilunlii* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2011.

KÄMPFER, Peter; KROPPESTEDT, Reiner M. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], 1996.

KIRAN, Shashi et al. *Paenibacillus ihbetae* sp. nov., a cold-adapted antimicrobial producing bacterium isolated from high altitude Suraj Tal Lake in the Indian trans-Himalayas. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], 2017.

KISHORE, K. Hara et al. *Paenibacillus glacialis* sp. nov., isolated from the Kafni glacier of

the Himalayas, India. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2010.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 7, p. 2567–2572, 2005. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409727102>>

KUYKENDALL, L. D. et al. Fatty Acids, Antibiotic Resistance, and Deoxyribonucleic Acid Homology Groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], 1988.

LEE, Hae-Won et al. *Paenibacillus marinisediminis* sp. nov., a bacterium isolated from marine sediment. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, [s. l.], 2013.

LEE, Imchang et al. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2016.

MA, Yuchao et al. *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2007.

MACFADDIN, J. Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. **Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition**, [s. l.], 2000.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P. et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], 2013.

MENDES, Rodrigo et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, [s. l.], 2011.

MILLER, L. T. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], 1982.

MOALEDJ, K. Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], 1986.

PANKE-BUISSE, Kevin et al. Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. **ISME Journal**, [s. l.], 2015.

PII, Youry et al. Microbial interactions in the rhizosphere : beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process . A review. [s. l.], p. 403–415, 2015.

RICHTER, M.; ROSSELLO-MORA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 45, p. 19126–19131, 2009. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0906412106>>

- RODIONOV, Dmitry A. et al. Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: Comparative reconstruction of transcriptional networks. **PLoS Computational Biology**, [s. l.], 2005.
- ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon; TRUJILLO, Martha E.; SUTCLIFFE, Iain C. Introducing a Digital Protologue: A timely move towards a database-driven systematics of Archaea and Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], 2017.
- RYBAKOVA, Daria et al. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. **Plant and Soil**, [s. l.], 2016.
- SANT'ANNA, Fernando H. et al. Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-based metrics improve bacterial taxonomic classification. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], 2017.
- SELDIN, Lucy; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, Elisa G. C. Bacillus nitrogen fixers from Brazilian soils. **Plant and Soil**, [s. l.], 1983.
- SIGNOR, DIANA; DIONÍSIO, Jair Alves; PIMENTEL, Ida Chapaval. Capítulo XI: Inoculação de Sementes de Leguminosas. In: **Protocolo X EMBRAPA**. [s.l: s.n.].
- SILVA, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE 1996, **Anais...** [s.l: s.n.]
- SILVA, Mirian De L. O. et al. Growth and productivity of sunflower cultivated in late summer and with different water depths. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 482–488, 2007.
- SIMON, Jörg. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. **FEMS Microbiology Reviews**, 2002.
- SMIDERLE, Oscar José; DA COSTA, Luiz Antonio Mendonça Alves. Produtividade e teor de óleo de girassol em função da aplicação de calcário. [s. l.], 2012.
- SMITH, Stephen A.; DUNN, Casey W. Phyutility: A phyloinformatics tool for trees, alignments and molecular data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 715–716, 2008.
- TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], 2013.
- THOMPSON, Cristiane C. et al. Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? **Archives of Microbiology**, [s. l.], 2015.
- TRAIWAN, Jitsopin; PARK, Mi Hak; KIM, Wonyong. *Paenibacillus puldeungensis* sp. nov., isolated from a grassy sandbank. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], 2011.
- WELSH, Allana et al. Refined NrfA phylogeny improves PCR-based nrfA gene detection. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], 2014.

XIE, J. B. et al. Phylogeny of 16S rRNA and nifH genes and regulation of nitrogenase activity by oxygen and ammonium in the genus *Paenibacillus*. **Microbiology**, [s. l.], 2012.

XIE, Jian Bo et al. Comparative Genomic Analysis of N₂-Fixing and Non-N₂-Fixing *Paenibacillus* spp.: Organization, Evolution and Expression of the Nitrogen Fixation Genes. **PLoS Genetics**, [s. l.], 2014.

YOON, Seok Hwan et al. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 110, n. 10, p. 1281–1286, 2017. a.

YOON, Seok Hwan et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017. b.