

# Laudo [REDACTED]/2021

03/Março/2021

Aos cuidados de Dr. [REDACTED] ([REDACTED])

## Amostra

Identificação	" <i>Bacillus</i> " isolado [REDACTED]
Condição	Armazenado em solução de estabilização
Data de recebimento	17/Fevereiro/2021



O isolado [REDACTED] pertence à espécie *Bacillus thuringiensis* e possui o potencial genético para codificar a enterotoxina não-hemolítica (NHE) hemolisina BL (HBL).

Para determinar as sequências de DNA do genoma de [REDACTED], o DNA total do isolado foi extraído com níveis adequados de concentração, pureza e integridade. Como controle de qualidade, o gene 16S rRNA foi amplificado por PCR e sequenciado pelo método de Sanger. Segundo a análise da sequência de 1.405 nucleotídeos obtida, o isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Bacillus*, sendo *Bacillus cereus* o táxon mais próximo. Para determinar as sequências de DNA genômico, bibliotecas foram construídas e analisadas por sequenciamento de DNA de nova geração (NGS) no sistema NovaSeq 6000 (Illumina). As leituras obtidas foram filtradas e montadas. O genoma apresentou um tamanho de 6,8 Mb, porcentagem de GC de 35,5 e um número de 6.980 sequências codificantes. Os valores de completude e contaminação foram adequados. A cobertura média entre os *contigs* foi de 975 vezes, excedendo as 100 vezes de cobertura contratadas pela proposta. O genoma de [REDACTED] apresentou apenas uma sequência de 16S rRNA de 1.460 nucleotídeos, a qual compartilha 100% de similaridade com a sequência gerada por PCR e sequenciamento Sanger. O emprego de métricas genômicas e a busca por genes [REDACTED] foram utilizados para determinar a espécie do isolado [REDACTED]. Valores acima do limiar de 70% (dDDH) e 95–96% (ANI) para a separação de espécies foram obtidos com os isolados tipo de *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792. Apesar de formar um clado com alto suporte junto à *Bacillus cereus* ATCC 14579 na filogenia genômica, o isolado [REDACTED] pode ser considerada como pertencente à espécie *Bacillus thuringiensis* por apresentar pelo menos quatro genes [REDACTED] em seu genoma. O genoma do isolado foi avaliado para determinar o potencial genético de produção de endotoxinas. Os genes constituintes do operon *nheABC* e *hblCDA* foram localizados em *contigs* com alta cobertura e tamanho. É possível concluir que o isolado [REDACTED] possui o potencial genético para codificar a enterotoxina não-hemolítica (NHE) e hemolisina BL (HBL).



## Extração de DNA da amostra

### Metodologia

O DNA foi extraído utilizando o kit de extração comercial PureLink™ Genomic DNA Mini (Thermo Scientific), conforme as recomendações do fabricante. A concentração e pureza foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). A integridade foi checada em eletroforese com uso de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

### Resultado

A amostra de DNA extraído apresentou níveis adequados de concentração, pureza e integridade (Tabela 1).

**Tabela 1. Resultados de qualidade da extração de DNA.**

Concentração (µg/mL)		Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )		Integridade	
Obtido	Esperado	Obtido	Esperado	Obtido	Esperado
38,2	≥ 20,0	2,00	~1,8 – 2,0		

## Controle de qualidade por 16S rRNA

### Metodologia

A amplificação e o sequenciamento do gene 16 rRNA, um marcador universal para a identificação de gêneros bacterianos, foram empregados como controles prévios de qualidade e procedência da amostra. Para tal, foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores  (5'  3') e  (5'  3'). A amplificação foi feita um volume final de 25 µL, contendo: 20 ng de DNA genômico da estirpe, 5 µL de 5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 0,5 µL de 10 mM dNTP mix, 0,5 µL de 100 pM de cada oligonucleotídeo, 1 µL de  e 0,125 µL de GoTaq® DNA Polymerase 5 U/µL (Promega). O programa de ciclagem de PCR foi executado a 94°C por 5 min, seguido por 37 ciclos a 94°C por 1 min, °C por 1 min e 10 seg e 72°C por 1 min, seguido por uma etapa final a 72°C por 5 min. As sequências de nucleotídeos foram determinadas em ambas as fitas dos produtos de amplificação utilizando a plataforma de sequenciamento de DNA AB 3500 (Applied Biosystems). Regiões de baixa qualidade foram removidas e os fragmentos foram montados em uma única sequência de DNA. A sequência final foi comparada às sequências de um banco de dados de 16S rRNA com qualidade controlada ( et al., 2017).

### Resultado

Uma sequência de 1.405 nucleotídeos do 16S rRNA foi obtida e apresentou maior similaridade com espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo *Bacillus cereus* o táxon mais próximo (Tabela 2). A estirpe pode ser considerada como pertencente ao gênero *Bacillus* considerando o limiar de gênero de % ( et al., 2014).





**Tabela 3. Resultados de qualidade do sequenciamento.**

ID	LFL	Leituras brutas	Dados brutos	Eficácia (%)	Erro (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
██████████	FDS██████████_L3	4.24██████████.742	3,1	99,86	0,03	97,19	91,93
	FDS██████████_L4	3.73██████████.848		99,88	0,03	97,50	92,43
	FDS██████████_L3	12.80██████████.178		99,84	0,03	97,22	92,22

ID, identificação. LFL, Library Flowcell Lane: para nomeação de arquivos de dados brutos. Leituras brutas: quantidade total de leituras de dados brutos. Dados brutos: (leituras brutas \* comprimento da sequência), calculando em G. Eficácia: (leituras limpas / leituras brutas) \* 100%. Erro: taxa de erro básica. Q20, Q30: (contagem de base do valor Phred > 20 ou 30) / (contagem de base total).

**Tabela 4. Resultados de qualidade do genoma.**

	Tamanho (Mb)	GC (%)	C	R	Contigs	N50	L50	N90	L90	CDS	Cobertura
Valor obtido	6,8	35,5	1	1	197	80.370	25	13.189	101	6.980	975
Valor esperado	5,38 – 6,4*	34,81 – 35,25*	~1	~1	<300	-	-	-	-	3.998 – 7.640*	>100

C, completude. R, redundância. \*De acordo com (██████████ et al., 2018).

## Análise e filogenia do 16S rRNA genômico

### Metodologia

O algoritmo ██████████ (██████████ et al., 2017) foi utilizado para investigar as possíveis cópias de 16S rRNA presentes no genoma de ██████████. A sequência do 16S rRNA extraída do genoma foi comparada à sequência anteriormente obtida por PCR e sequenciamento Sanger. Uma análise filogenética foi reconstruída utilizando-se as sequências de 16S rRNA de ██████████ e outras 45 estirpes-tipo de *Bacillus*, com *Brevibacillus brevis* NCIMB 9372 usado como um grupo externo, de acordo com a sequência de acessos fornecidas no ██████████. As sequências de 16S rRNA foram alinhadas com a função ██████████ disponível através ██████████ (██████████, 2015). O pacote ██████████ (██████████, 2011) foi usado para selecionar ██████████ como o *best-fitting model* de acordo com o critério de informação de Akaike usando a função ██████████. Então, as funções do ██████████ também foram utilizadas para reconstruir árvores filogenéticas usando a estimativa por máxima verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*). Primeiro foi reconstruída uma árvore de ██████████ e, em seguida, esta foi utilizada como um ponto de partida para ajustar a árvore ██████████ ML. Um protocolo com um número explícito de 500 *bootstraps* foi calculado. A árvore foi enraizada no grupo externo. Os pacotes ██████████ (██████████, 2012) e ██████████ (██████████ et al., 2017) foram usados para visualizar e editar as árvores e cladogramas.

### Resultado

Segundo a análise do ██████████, o genoma apresentou apenas uma sequência de 16S rRNA de 1.460 nucleotídeos (Tabela 5). A sequência para o 16S rRNA obtida do genoma é idêntica à sequência obtida por PCR e Sanger (Tabela 6), ou seja, o genoma corresponde à estirpe esperada. A estirpe ██████████ foi encontrada agrupada com um baixo suporte com estirpes do grupo *Bacillus cereus* (Figura 1). Árvores baseadas em um único marcador filogenético, como o gene 16S rRNA, tendem a ter ramos com baixos valores de *bootstrap* (██████████, 2010).





# Filogenia genômica e identificação da espécie

## Contexto

De acordo com a análise de 16S rRNA, os táxons mais próximos da estirpe ██████ fazem parte do conhecido “grupo *Bacillus cereus*”. Atualmente, essa subdivisão do gênero *Bacillus* compreende ██████ espécies distintas (██████████ et al., 2017; ██████████ et al., 2016) e um potencial patogênico altamente variável (██████████ et al., 2019; ██████████ et al., 2009), mas com genomas e fenótipos muito semelhantes (██████████ et al., 2007). Segundo o ██████████, as informações sobre a nomenclatura dessas espécies são:

**Tabela 7. Informações de nomenclatura do grupo *Bacillus cereus*.**

Nome	Status nomenclatural	Status taxonômico
<i>Bacillus albus</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus anthracis</i> Cohn 1872 (Approved Lists 1980)	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus cereus</i> Frankland and Frankland 1887 (Approved Lists 1980)	publicado validamente	nome correto
██████████	██████████	██████████
<i>Bacillus luti</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus mobilis</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
██████████	██████████	██████████
<i>Bacillus nitratireducens</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus pacificus</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
██████████	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus paranthracis</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus proteolyticus</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
██████████	██████████	██████████
<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner 1915 (Approved Lists 1980)	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus toyonensis</i> Jiménez et al. 2014	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus tropicus</i> Liu et al. 2017	publicado validamente	nome correto
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> Lechner et al. 1998	publicado validamente	sinônimo
██████████	██████████	██████████

Tendo em vista a semelhança dos genomas, a discriminação das estirpes pertencentes a este grupo é possível graças à presença de alguns genes marcadores. Os genes ██████ são marcadores úteis para a identificação de *Bacillus thuringiensis*. Os genes ██████ estão localizados em um megaplasmídeo e codificam as ██████████ (██████████ et al., 2006; ██████████ et al., 1983).

## Metodologia

Para a filogenia e determinação da espécie, sequências genômicas foram recuperadas do banco de dados ██████████ ao pesquisar pelas espécies do grupo *Bacillus cereus*, com filtros “██████████” e “██████████”. Todos os genomas foram localizados, exceto para a espécie *Bacillus weihenstephanensis*. Para a análise de métricas genômicas, duas medidas de parentesco genético foram utilizadas para a definição do limiar de diferenciação de espécies, de acordo com a recomendação de ██████████ et al. (1987). A identidade média de nucleotídeos (ANI, *average nucleotide identity*) que utiliza o alinhamento com ██████████ (██████████; ██████████ et al., 2007) foi empregada como um substituto do ██████████ utilizando o módulo ██████████. Para substituir o ██████████ (██████████; ██████████ et al., 2015), o ██████████ (██████████) ██████████ com o alinhador ██████████ foi usado para calcular valores de hibridação de DNA digital (dDDH, *digital DNA-DNA hybridization*) e intervalos de confiança (C.I.) usando a fórmula ██████████. Para a filogenia genômica, distâncias intergenômicas obtidas na ██████████ foram usadas para inferir uma árvore de ██████████ com suporte inferido via ██████████ incluindo pós-processamento SPR (██████████ et al., 2015). O suporte de cada um dos ramos foi inferido de 100 *pseudo-*



bootstraps. As árvores foram enraizadas no ponto médio. Finalmente, para a determinação da espécie utilizou-se o alinhamento entre sequências iscas de proteínas codificadas por genes [REDACTED] e as sequências de nucleotídeos dos contigs recém-gerados. Um total de 79 sequências iscas foram obtidas na seção “[REDACTED]” da base de dados [REDACTED] ([REDACTED]), a qual contém registros com informações extraídas da literatura e análise computacional avaliada por curadores. Para os alinhamentos, utilizou-se análise de bioinformática baseada na ferramenta [REDACTED] ([REDACTED], 2005). Os alinhamentos aceitos foram feitos entre sequências com pelo menos 90% de score utilizando o modelo [REDACTED].

## Resultados

Na comparação com as estirpes tipo de *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792, a estirpe [REDACTED] apresentou valores acima do limiar de 70% (dDDH) ([REDACTED] et al., 2013) e 95–96% (ANI; [REDACTED], 2009) para a separação de espécies. Apesar de formar um clado com alto suporte junto à *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Figura 2), a estirpe [REDACTED] apresentou pelo menos quatro genes [REDACTED] em seu genoma. As maiores similaridades foram obtidas para comparações com [REDACTED] (100%), [REDACTED] (100%), [REDACTED] (100%) e [REDACTED] (99,7%). A estirpe [REDACTED] pode ser considerada como pertencente à espécie *Bacillus thuringiensis* por apresentar alta similaridade genômica (ANIb  $\geq$  96,0 e dDDH  $\geq$  72,3) com a estirpe tipo de *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 e apresentar pelo menos quatro genes [REDACTED] em seu genoma.

**Tabela 8. Análise de dDDH.**

Estirpe comparada a [REDACTED]	Fórmula [REDACTED]		Fórmula [REDACTED]		Diferença no GC (%)
	dDDH	C.I.	dDDH	C.I.	
<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 GCF_ 001884185.1	[REDACTED]	[54,8 - 62%]	[REDACTED]	[52,6 - 58,9%]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[55,3 - 62,4%]	[REDACTED]	[53 - 59,3%]	[REDACTED]
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 GCF_ 000007825.1	[REDACTED]	[64,6 - 72,1%]	[REDACTED]	[68,2 - 74,9%]	[REDACTED]
<i>Bacillus cytotoxicus</i> NVH 391-98 GCF_ 000017425.1	[REDACTED]	[22,1 - 29%]	[REDACTED]	[21,4 - 27,3%]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[51,4 - 58,4%]	[REDACTED]	[49,6 - 55,8%]	[REDACTED]
<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 GCF_ 001884045.1	[REDACTED]	[52,2 - 59,3%]	[REDACTED]	[50,3 - 56,5%]	[REDACTED]
<i>Bacillus mycoides</i> WSBC 10204 GCF_ 000775975.1	[REDACTED]	[49,8 - 56,8%]	[REDACTED]	[46,7 - 52,8%]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[49,1 - 56%]	[REDACTED]	[46,5 - 52,6%]	[REDACTED]
<i>Bacillus pacificus</i> EB422 GCF_ 001884025.1	[REDACTED]	[55,1 - 62,2%]	[REDACTED]	[52,9 - 59,2%]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[44,5 - 51,3%]	[REDACTED]	[42,1 - 48,1%]	[REDACTED]
<i>Bacillus paranthracis</i> Mn5 GCF_ 001883995.1	[REDACTED]	[52,5 - 59,5%]	[REDACTED]	[50,9 - 57,1%]	[REDACTED]
<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 GCF_ 001884065.1	[REDACTED]	[46 - 52,9%]	[REDACTED]	[44 - 50,1%]	[REDACTED]
<i>Bacillus pseudomycooides</i> DSM 12442 GCF_ 000161455.1	[REDACTED]	[22,7 - 29,7%]	[REDACTED]	[22,1 - 28,1%]	[REDACTED]
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 GCF_ 000161615.1	[REDACTED]	[68,4 - 76%]	[REDACTED]	[70,4 - 77,1%]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[54,1 - 61,2%]	[REDACTED]	[52,2 - 58,5%]	[REDACTED]
<i>Bacillus tropicus</i> N24 GCF_ 001884035.1	[REDACTED]	[55,4 - 62,6%]	[REDACTED]	[53,5 - 59,8%]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[54,5 - 61,7%]	[REDACTED]	[52,5 - 58,8%]	[REDACTED]

C.I., intervalo de confiança.

**Tabela 9. Análise de ANIb.**

Estirpe comparada a [REDACTED]	ANIb (%)
<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 GCF_ 001884185.1	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 GCF_ 000007825.1	[REDACTED]
<i>Bacillus cytotoxicus</i> NVH 391-98 GCF_ 000017425.1	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 GCF_ 001884045.1	[REDACTED]
<i>Bacillus mycoides</i> WSBC 10204 GCF_ 000775975.1	[REDACTED]







**Tabela 12. Resultados da busca dos genes de interesse de acordo com a “Abordagem 1”.**

Estirpe referência	Isca*	Alvo	Localização no genoma de				
			Contig	Start	End	Fita	%**
<i>Bacillus cereus</i> F837/76 (Auger et al., 2012)	WP_000000000.1	<i>nheA</i>	NODE_000000000	53305	59000	+	99,6%
	WP_000000000.1	<i>nheB</i>	NODE_000000000	53503	60000	+	99,2%
	WP_000000000.1	<i>nheC</i>	NODE_000000000	60819	61000	+	99,7%
	WP_000000000.1	<i>hblA</i>	NODE_000000000	10496	17000	-	99,3%
	WP_000000000.1	<i>hblC</i>	NODE_000000000	202640	203000	-	99,0%
	WP_000000000.1	<i>hblD</i>	NODE_000000000	202259	203041	-	99,5%

\* .ou .accession. \*\* Similaridade.

**Tabela 13. Resultados da busca dos genes de interesse de acordo com a “Abordagem 2”.**

Fator de virulência	Alvo	Isclas		Localização consenso no genoma de			
		Analizadas	Encontradas	Contig	Start	End	Fita
NHE	<i>nheA</i>	107	104	NODE_000000000	53305	590463	+
	<i>nheB</i>	77	75	NODE_000000000	53503	60709	+
	<i>nheC</i>	74	72	NODE_000000000	60009	60096	+
HBL	<i>hblA</i>	179	145	NODE_000000000	184009	170001	-
	<i>hblB</i>	4	3	NODE_000000000	180099	170001	-
	<i>hblC</i>	53	46	NODE_000000000	220040	213003	-
	<i>hblD</i>	66	56	NODE_000000000	21259	203041	-



## Referências

[Redacted text block]

## Responsáveis técnicos



Diretora Geral, Biólogo Responsável  
Dra. Adriana Ambrosini da Silveira  
Inscrição CRBio-03 118593/03-D



Diretora Técnica, Responsável  
MSc. Camila Gazolla Volpiano

☎ 35.990.394/0001-57 ☎

**AGREGA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
EM BIOTECNOLOGIA LTDA.**

Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421  
Agronomia - CEP 91501-970  
Porto Alegre - RS

## Informações de contato

📍 Av. Bento Gonçalves, 9.500. Prédio 43.421. Agronomia, Porto Alegre/RS. CEP: 91501-970. Caixa Postal 15005.

✉ [agrega@agregabiotec.com](mailto:agrega@agregabiotec.com)

☎ +55 51 9678-0556

☎ +55 51 3234-2165

🌐 [agregabiotec.com](http://agregabiotec.com)

📱 [f](#) [@](#) [in](#) agregabiotec