

Resumo

A atualidade é marcada pelo surgimento de bactérias e fungos resistentes a todas as classes de antimicrobianos já descobertos, portanto, é essencial que se descubra novos antibióticos e antifúngicos. Assim, avaliou-se a eficácia de microrganismos isolados de mel contra fungos e bactérias causadores de doenças em plantas. Para a linhagem que apresentou maior eficácia na produção de antimicrobianos, realizou-se o sequenciamento utilizando a tecnologia Nanopore. Para a montagem do genoma e sua anotação desenvolveu-se um *pipeline* baseado em Python. Em seguida, utilizou-se a plataforma antiSMASH para buscar grupos de genes responsáveis pela produção de antimicrobianos. Desta maneira, sugeriu-se genes que podem ser responsáveis pela produção antimicrobiana, para possibilitar o aumento da capacidade produtiva das bactérias para uso comercial na medicina e agricultura.

1 Introdução

O impacto deletério das doenças infecciosas de animais e plantas está cada vez mais marcante devido a um aumento na incidência de resistência bacteriana e fúngica e a redução na descoberta de novos antimicrobianos. Isso pode nos levar a uma era pós-antibióticos, na qual um simples ferimento pode ser fatal. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias para a descoberta de antimicrobianos é essencial.

2 Objetivos

O presente projeto visa a caracterização fenotípica de organismos isolados do mel, além de realizar o sequenciamento de uma bactéria produtora de antimicrobianos para a identificação dos genes responsáveis pela síntese destes compostos.

3 Metodologia

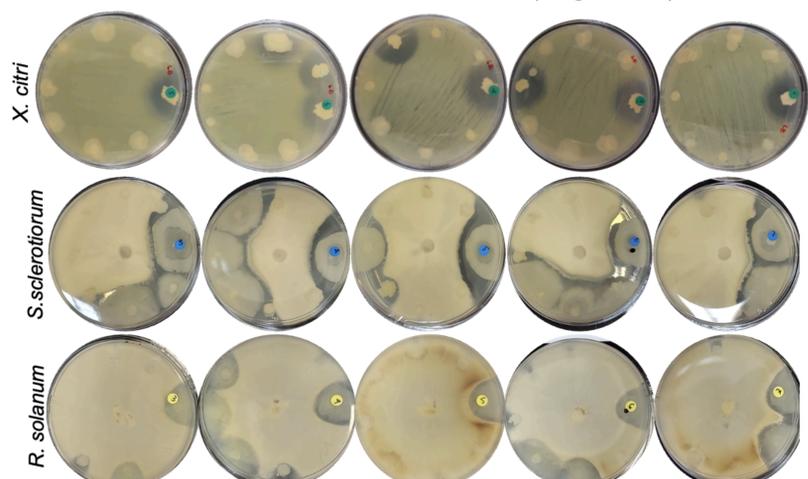
Para analisar a produção antibacteriana e antifúngica dos microrganismos, eles foram testados em ensaios de halo de inibição contra a bactéria *Xanthomonas citri*, causadora do cancro cítrico, e fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia sp.* e *Sclerotinia sp.*

Para a extração do DNA genômico, o preparo de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanopore, foram utilizados os kits e protocolos da Promega e do Oxford Nanopore.

Para a detecção de variantes e o alinhamento dos dados brutos, foi utilizado o software EPI2ME, além dos guias contidos na plataforma GitHub. Os genomas foram submetidos à plataforma antiSMASH para identificação de genes responsáveis pela produção de antimicrobianos.

4 Resultados

Foram realizados antibiogramas para 70 isolados contra bactérias e fungos fitopatogênicos, incluindo a *B. subtilis* usado em controle biológico. Observa-se que diversos isolados possuem atividade comparável ao padrão comercial (Figura 1).



Fonte: elaborado pelos autores (2024).

Figura 1. Antibiogramas de bactérias isoladas do mel e bactéria comercial (posição com adesivo colorido) diluídas até 1:100 e pipetadas sob papéis de filtro distribuídos em placas com meio Luria-Bertani (LB) e um filme da bactéria *X. citri*, ou placas com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solanum*.

Foi realizada a extração de DNA genômico de M3.18, atingindo um rendimento de 58,4 ng/μl. Uma biblioteca de DNA com adaptadores na concentração de 2,17 ng/μl foi construída e carregada em uma flowcell com apenas 17 poros ativos. Apesar disso, foram obtidas 107 mil pares de bases sequenciadas. (Figura 2).



Figura 2. Sequenciamento por nanopore. Imagens ilustrado o equipamento e resultados parciais gerados em tempo real.

Fonte: elaborado pelos autores (2024).

A partir destes dados brutos, elaborou-se um pipeline utilizando ferramentas baseadas em Python, capaz de receber os dados brutos e realizar a sua montagem utilizando os métodos: montagem *de novo* e *variant calling*. A linhagem M3.18 foi identificada como *Bacillus velezensis*, portanto exploramos os grupos de genes biossintéticos presentes em diferentes linhagens sequenciadas da espécie (Figura 3).

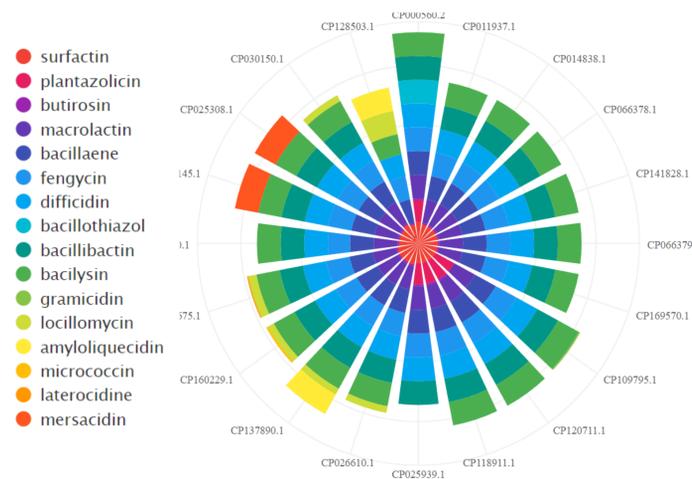


Figura 3. Clusters de genes biossintéticos (BCG) em *Bacillus velezensis*. Realizou-se a busca por antiSMASH de BCGs em 20 linhagens de *B. velezensis* já sequenciadas e identificou-se metabólitos secundários em comum e outros únicos para certas linhagens (gráfico elaborado com Evertz).

Fonte: elaborado pelos autores (2024).

5 Conclusão

Apesar das limitações decorrentes do trabalho, com novas rodadas de sequenciamento, será possível obter um maior volume de resultados para completar o genoma. Assim, análises de bioinformática serão realizados progredindo no desenvolvimento do programa que facilitará o processo de montagem de genoma para futuros pesquisadores.

6 Referências

- BAYNE, Charlie. **Nanopore Pipelines**. 2023. Disponível em: https://github.com/baynec2/nanopore_pipelines. Acesso em: 30 mar. 2024
- LU, Hengyun; GIORDANO, Francesca; NING, Zemin. **Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly**. 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/gpb/article/14/5/265/7224938?login=false>. Acesso em: 17 fev. 2024.