

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO - IFSP**

RUA HEITOR LACERDA GUEDES, 1000 - CIDADE SATÉLITE ÍRIS, CAMPINAS - SP, 13059-581

KATHERINE B. MARCHESAN

LUIZA R. DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS LINHAGENS DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE  
ANTIBIÓTICOS E ANTIFÚNGICOS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ELIZABETH BISLAND

FEV 2024 - DEZ 2024



## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA</b>	<b>6</b>
<b>4. DESENVOLVIMENTO</b>	<b>8</b>
4.1 Validação fenotípica de atividade antibacteriana	8
4.2 Validação fenotípica de atividade antifúngica	8
4.3 Extração de DNA genômico	9
4.4 Preparo de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo	10
4.5 Preparo e carregamento da flow cell	12
4.6 Montagem do genoma	12
4.7 Busca por clusters de genes biosintéticos em <i>Bacillus velezensis</i>	13
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
5.1 Validação fenotípica de atividade antibacteriana	13
5.2 Validação fenotípica de atividade antifúngica	14
5.3 Extração de DNA genômico	15
5.4 Preparo de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo	15
5.5 Sequenciamento por Nanoporo	15
5.6 Montagem do genoma	16
5.7 Busca por clusters de genes biosintéticos	16
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>19</b>



## 1. RESUMO

A era atual é marcada pelo surgimento de bactérias e fungos resistentes a todas as classes de antimicrobianos já descobertos. Por isso, é de extrema importância que se descubra novos antibióticos e antifúngicos que combatam micróbios de importância médica e agrícola. Para atacar esse problema, foi realizada uma bioprospecção em 2023 para isolar bactérias benéficas e testar sua capacidade de secretar antibióticos ou antifúngicos. Os microrganismos, provenientes de méis comerciais, foram plaqueados, isolados e cultivados para preparo de DNA genômico e subsequente identificação molecular. Também foram utilizados em ensaios de halo de inibição (antibiogramas) contra levedura e bactéria não patogênicas para testar a capacidade de secreção de compostos com ação antimicrobiana. Após o sequenciamento de regiões codificadoras para rRNA de alguns isolados, descobriu-se que a maioria dos microrganismos selecionados são do gênero *Bacillus*. O presente trabalho analisou as 70 linhagens bacterianas isoladas em 2023 contra fungos e bactérias causadores de doenças em plantas. O isolado que apresentou maior eficácia na produção de antimicrobianos, M3.18, teve seu DNA extraído para sequenciamento utilizando a tecnologia Nanoporo (MinION). Utilizou-se então uma série de ferramentas baseadas em Python para a montagem do novo genoma. Em paralelo a plataforma antiSMASH foi utilizada para averiguar genomas de *Bacillus* já disponíveis na literatura em busca de grupos de genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários. Desta maneira, apontamos quais genes podem ser responsáveis pela produção antibiótica e antifúngica, para futuramente possibilitar o aumento da capacidade produtiva.

## 2. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são consideradas a segunda maior causa de morte mundial. Seu impacto deletério à saúde global é cada vez mais marcante devido a um aumento na incidência de resistência bacteriana, concomitante com a redução dramática na descoberta de novos antimicrobianos (GUIMARÃES; MOMESSO;



PUPO, 2010). Os antibióticos são essenciais aos seres vivos, pois sem eles a expectativa de vida diminuiria consideravelmente (BRITO; CORDEIRO, 2012).

Além da necessidade dos antibióticos, a importância dos antifúngicos não pode ser menosprezada. Diversos fungos de importância médica e especialmente de importância agrícola desenvolveram resistência contra os fungicidas do mercado e passaram a atacar plantações e lavouras de soja, tomate, batata, frutos cítricos etc. (SUMITOMO CHEMICAL, 2021). Os fungos podem contaminar folhas, flores, os tubérculos e frutos nas plantações e apodrecê-los no campo ou pós-colheita, durante a armazenagem (REIS; MEDEIROS; BRESOLIN; CASA, 2015). Frequentemente, a única solução após essas infecções generalizadas por fungos é a queima total das lavouras.

Devido ao clima propício para a agricultura, o Brasil produz até 3 safras em uma única área por ano, comparada a uma safra, alternada com período frio, em climas temperados. O plantio ao longo de todo o ano, associado às altas temperaturas e umidade das regiões mais produtivas do Brasil, favorecem a proliferação de muitos patógenos causadores de doenças em plantas, os quais são tradicionalmente combatidos com defensivos químicos, chamados popularmente de agrotóxicos. Assim, em volume total o Brasil é o maior consumidor de defensivos agrícolas no mundo, gerando impactos negativos para o meio ambiente, consumidor e agricultor, que sofre com os altos custos e toxicidade dos produtos antimicrobianos (NETO, 2024).

Uma alternativa a defensivos químicos que vem ganhando espaço em todo o mundo são estratégias de controle biológico de pragas e doenças, que são compatíveis com uma agricultura orgânica. Hoje o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) tem aprovado 60 especificações de produtos fitossanitários para a agricultura orgânica (GOMES, 2024). Entre estes bioinsumos, existem diversas espécies de *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (MAPA, 2022).

Assim, o trabalho aqui apresentado visa caracterizar a produção de antibióticos e antifúngicos por linhagens de *Bacillus spp.* prospectadas em 2023, visando sua melhoria para uma maior capacidade de secretar antimicrobianos, desenvolvendo novos bioprodutos para substituir o uso desenfreado de fungicidas e antibióticos químicos em nossas lavouras.



O projeto de 2023 consistiu em selecionar méis originários de diferentes regiões do Brasil, diluição e plaqueamento em diferentes meios de cultivo, para crescimento de fungos e bactérias. Microrganismos foram cultivados para preparo de DNA genômico e estocagem em ultra-freezer. Ensaio de halo de inibição contra organismos não patogênicos (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e *Escherichia coli* DH5alpha) foram realizados com o objetivo de testar a secreção antibiótica e antifúngica. Foi amplificado e sequenciado o gene codificador para RNA ribossômico identificando as espécies de microrganismos isolados. As sequências foram recebidas e comparadas a sequências conhecidas disponíveis no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), utilizando a plataforma BLAST, um banco de dados online que contém as sequências de DNA derivadas de milhares de outros microrganismos. Como resultado, descobriu-se que quase todos os microrganismos encontrados no mel e selecionados com base em sua habilidade de secretar antimicrobianos são de alguma espécie de *Bacillus*. Várias das sequências sugeriram espécies de microrganismos já conhecidos pela habilidade de produzir antibióticos e/ou antifúngicos.

O presente projeto deu continuidade à validação fenotípica dos organismos isolados, porém focando nas atividades contra fungos e bactéria causadores de doenças em plantas. Desta maneira, foram realizados ensaios de halos de inibição para testar a eficiência dos organismos cultivados contra os fitopatógenos *Sclerotinia sp.*, *Rhizoctonia solanum* e *Xanthomonas citri*. Além disso, foi realizada a extração do DNA genômico para o sequenciamento por Nanoporo do microrganismo que secretou o antimicrobiano mais eficaz. O sequenciamento do genoma foi realizado utilizando a tecnologia Nanoporo, MinION, que identifica as bases de DNA medindo alterações na condutividade elétrica, originadas das cadeias de DNA que passam pelos poros biológicos (LU; GIORDANO; NING, 2016). Com os dados brutos assim obtidos, o genoma completo será montado utilizando ferramentas baseadas em Python (BAYNE, 2023).

Genomas já publicados bem como o genoma sequenciado e montado no presente trabalho serão analisados utilizando a plataforma antiSMASH, para buscar grupos de genes ou agrupamentos de genes biossintéticos (BGC) que podem ser responsáveis pela produção de metabólitos secundários ou especializados, os quais podem ter ação antibiótica ou antifúngica. Em sequência, se buscará desenvolver, a



partir da programação realizada para a montagem anterior, um software para facilitar o processo de montagem de genoma a partir dos dados brutos, usando codificação em Python, HTML, CSS e PHP (CASSOL *et al.*, 2022).

### 3. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto por Fleming em 1928. Antes da sua descoberta não havia tratamento eficiente para muitas doenças infecciosas, como a sífilis, pneumonia e meningites bacterianas (LIMA; SOUZA, 2023). Um corte simples, ou apenas um arranhão poderia ameaçar a vida, pois poderiam dar origem a infecções sistêmicas.

Com a descoberta da penicilina, a expectativa de vida aumentou 8 anos entre 1944 e 1972. Muitos especialistas acreditaram que havia sido cessado o risco de infecções bacterianas. “[...] em 1969, o cirurgião Geral dos EUA, William Stewart, corajosamente disse ao Congresso que era hora de “fechar os livros sobre doenças infecciosas.””(CZYZEWSKI, 2015, tradução nossa). Entretanto Alexander Fleming tinha suas dúvidas sobre essa previsão, ele disse:

*A maior possibilidade de mal na automedicação é o uso de doses muito pequenas, de modo que, em vez de eliminar a infecção, os micróbios sejam educados a resistir à penicilina e uma série de organismos resistentes à penicilina seja criada, que pode ser transmitida a outros indivíduos e deles para outros até chegarem a alguém que contrai uma septicemia ou pneumonia que a penicilina não pode salvar. (New York Times, 1945, tradução nossa)*

A hipótese de Fleming se concretizou. Nas últimas décadas, a eficácia dos antibióticos vem se reduzindo. Com o uso frequente dos antibióticos em subdosagem, as cepas de bactérias têm adquirido resistência. A falta de desenvolvimento e distribuição de novos antibióticos eficazes está aumentando os impactos desastrosos da resistência antimicrobiana (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2024).

Além da resistência bacteriana, sucessivamente evidencia-se a crescente resistência fúngica, tanto na medicina como na agricultura.

[...] um fungo que pode ser encontrado em quase todos os lugares, pode causar doenças pulmonares em pessoas com sistema imunológico enfraquecido. Também pode causar reações alérgicas ou infecções pulmonares que podem se tornar graves e se espalhar para outros órgãos.



Ele mostrou resistência antifúngica crescente, diz a OMS, graças ao uso generalizado de fungicidas azólicos para impedir sua propagação nas plantações.

(Christensen, 2023)

Fungos fitopatogênicos resistentes não controlados derivam do uso constante de fungicidas na agricultura. Tal problema pode gerar graves consequências, como aumento de custos, resíduos em alimentos e contaminações ambientais. (GHINI; KIMATI, 2000) A exposição ambiental aos fungicidas sintéticos favorece a multiplicação de fungos resistentes a esses compostos. Assim, isolados resistentes podem ser inalados ou ingeridos por indivíduos que trabalham em plantações, vivem próximo dessas áreas ou consomem os produtos da colheita. (INSTITUTO DE PESQUISA E EDUCAÇÃO EM SAÚDE DE SÃO PAULO, 2017)

Ademais, o aumento do uso de fungicidas químicos na agricultura contaminam o solo. Quando aplicados, as substâncias químicas presentes neles afetam microrganismos não destinados a sua aplicação, por exemplo, a microbiota do solo. (TAKAHASI; MELHEM, 2014). Para mais, o uso indiscriminado de fungicidas na agricultura, também está afetando humanos, por selecionar fungos oportunistas resistentes a medicamentos.

Presente no ar, o *Aspergillus fumigatus* é responsável por 90% dos casos de aspergilose, doença oportunista que afeta entre 10 milhões e 20 milhões de pessoas em todo o mundo. A enfermidade é tratada com antifúngicos azólicos. Porém, essas mesmas substâncias são amplamente utilizadas em plantas, o que, segundo pesquisadores do Imperial College de Londres, provoca a queda da eficácia da droga. (Oliveto, 2022)

Um terço da produção agrícola é perdido por doenças fúngicas, atingindo as cinco principais culturas de alimentos no Brasil. Evitar esses prejuízos poderia suprir a demanda de grande parte da população. (CROPLIFE, 2019).

Em vista disso, com o intuito de mitigar a resistência a agentes antimicrobhos, este trabalho tem por objetivo geral a montagem do genoma e análise de uma linhagem de bactéria produtora de antimicrobianos, a partir do desenvolvimento de pipeline computacional.

Desta maneira, são objetivos específicos:

- A. Realizar análises fenotípicas para selecionar linhagem a ser sequenciada;
- B. Realizar sequenciamento de organismo produtor de antimicrobianos;
- C. Montar e analisar o genoma do microrganismo selecionado.



## 4. DESENVOLVIMENTO

### 4.1 Validação fenotípica de atividade antibacteriana

Para testar a produção antibiótica dos microrganismos, eles foram testados em ensaios de halos de inibição (antibiogramas) contra a bactéria *Xanthomonas citri*. *X. citri* é causadora do cancro cítrico, responsável pelas lesões locais em folhas, frutas e ramos, afetando todas as espécies e variedades de citros de importância comercial (FUNDECITRUS, 2019).

Para o cultivo de microrganismos, foram preparadas 72 placas de petri de 5 cm de diâmetro com o meio Ágar Tríplico de Soja (TSA). Sobre as placas foram repicadas 72 linhagens de microrganismos armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após incubação a  $30^{\circ}\text{C}$  por 2 dias, cada microrganismo foi inoculado em 1 ml de meio Caldo de Tríplico de Soja (TSB) e incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Em paralelo, 10 ml de meio Luria-Bertani (LB) líquido foi inoculado com *Xanthomonas citri* e incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Em seguida, diluições de *X. citri* foram preparadas e 100  $\mu\text{l}$  plaqueadas na superfície de placas Luria-Bertani (LB) com ágar. 8 discos de 3 mm de filtro de papel estéril foram posicionados em 8 posições equidistantes da placa. Pipetou-se 2  $\mu\text{l}$  de cultura de microrganismos do mel diluídos 1:100 nos filtros de papel. As placas com filmes de *Xanthomonas* e 8 microrganismos do mel foram incubados por 24 a 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Fotografou-se as placas e mediu-se os halos de inibição para avaliar a secreção de compostos antibacterianos.

### 4.2 Validação fenotípica de atividade antifúngica

A fim de testar a atividade antifúngica dos organismos, foram realizados halos de inibição utilizando os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solanum*, causadores de doenças em diversas plantas de importância econômica, como a batata, o feijão, o milho, a soja e o tomate (ÁVILA; QUEZADO-SOARES, 2022).

Desta maneira, preparou-se placas de meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e distribuiu-se sob elas, 8 papéis de filtro estéreis de modo equidistante na placa, nos quais foram pipetados 2  $\mu\text{l}$  de cultura (em meio TSB) de microrganismos do mel



diluídos 1:100. No centro de cada placa, foram posicionados discos contendo hifas de fungos patogênicos. As placas com microrganismos do mel e fungos patogênicos foram incubados a 30°C por 72 horas e fotografadas para monitoramento dos halos de inibição. Em cada placa há 6 organismos isolados do mel, o *Bacillus subtilis* padrão de laboratório (*B. subtilis* 168) e o *Bacillus sp.* utilizado comercialmente para o controle biológico na agricultura (nome comercial Serenade).

### 4.3 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico de bactéria gram positiva, foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit da Promega (A1125), seguindo o passo a passo indicado pelo fabricante (PROMEGA CORPORATION, 2018).

Sendo assim, inoculou-se 2,5 mL de meio TSB em tubo de 15 mL com o *Bacillus* a ser sequenciado e crescido a 30°C durante a noite. Centrifugou-se a 13.000–16.000 × g para sedimentar as células e remover o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 480 µL de ácido etileno-diamina-tetraacético (EDTA) na concentração de 50 mM. Foi adicionado 120 µL de lisozima 10 mg/mL ao sedimento celular e pipetado para misturar. O objetivo deste pré-tratamento foi enfraquecer a parede celular para que ocorresse uma lise celular eficiente. A amostra foi incubada a 37°C durante 30–60 minutos, centrifugada por 2 minutos a 13.000–16.000 × g e removido o sobrenadante. Adicionou-se 600 µL de solução de lise de núcleos do kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega, pipetando suavemente até que as células fossem ressuspensas. Incubou-se a 80°C durante 5 minutos para lisar as células; em seguida, esperou-se esfriar até a temperatura ambiente. Foi adicionado 3 µL de solução RNase ao lisado celular e invertido o tubo 2–5 vezes para misturar. O tubo foi incubado a 37°C durante 15–60 minutos e a mostra foi resfriada à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de solução de precipitação de proteínas ao lisado celular tratado com RNase. Vortex vigorosamente em alta velocidade por 20 segundos para misturar a Solução de Precipitação de Proteínas com o lisado celular. A amostra foi incubada em gelo durante 5 minutos e centrifugada a 13.000–16.000 × g durante 3 minutos, e a seguir transferido o sobrenadante contendo o DNA para um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml contendo 600 µL de isopropanol. Misturou-se suavemente por inversão até que os filamentos de DNA



formassem uma massa visível e centrifugou-se a  $13.000\text{--}16.000 \times g$  durante 2 minutos. Foi descartado cuidadosamente o sobrenadante e drenado o tubo em papel absorvente limpo. Foi adicionado  $600 \mu\text{L}$  de 70% etanol e inverteu-se suavemente o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA. Centrifugou-se a  $13.000\text{--}16.000 \times g$  durante 2 minutos e aspirou-se cuidadosamente o etanol. O tubo foi drenado em papel absorvente limpo e deixado o pellet secar ao ar por 10–15 minutos. Adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  de solução de reidratação de DNA ao tubo e reidratou-se o DNA incubando a  $65^\circ\text{C}$  por 1 hora. Foi misturado periodicamente a solução batendo suavemente no tubo. Mediu-se a concentração e pureza do DNA com nanofotômetro (Implen).

Foram pesados 4 gramas de agarose e foi dissolvido em 50 mL de tampão Tris, Acido Acético, EDTA (TAE), aquecendo no microondas até que nenhum fragmento de agarose seja visível. Verteu-se o gel de agarose com  $3 \mu\text{L}$  de solução de brometo de etídio, e após esperar solidificar, foi transferido para a cuba de eletroforese e correu as amostras de DNA para avaliar a qualidade do material preparado. O DNA foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **4.4 Preparo de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo**

Para o preparo de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo, foi utilizado o Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) da Oxford Nanopore Technologies, seguindo as recomendações do fabricante (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES, 2016).

A amostra de controle de DNA (DCS) foi descongelada em temperatura ambiente, centrifugada, e misturada por pipetagem e colocada no gelo. Descongelou-se todos os reagentes do kit New England Biolabs (NEB) M6630 em gelo. Diluiu-se  $1 \mu\text{g}$  DNA genômico preparado em 4.3 em água livre de nuclease para atingir um volume de  $47 \mu\text{L}$  em tubo de 1,5 mL LoBind. Misturou-se bem e coletou o conteúdo no fundo do tubo por centrifugação. Foi misturado:  $47 \mu\text{L}$  DNA da etapa anterior,  $3,5 \mu\text{L}$  de tampão de reparo de DNA NEBNext FFPE,  $2 \mu\text{L}$  de mistura de reparo de DNA NEBNext FFPE,  $3,5 \mu\text{L}$  de tampão de reação de preparação final Ultra II e  $3 \mu\text{L}$  de mistura enzimática de preparação final Ultra II. Usando um termociclador, foi incubado a  $20^\circ\text{C}$  por 5 minutos e  $65^\circ\text{C}$  por 5 minutos.



Quantificou-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra eluída usando um nanofotômetro (Implen). As esferas AMPure XP foram ressuspensas, agitando-as em um Vortex. A amostra de DNA foi transferida para um tubo Eppendorf DNA LoBind limpo de 1,5 mL. Foram adicionadas 60  $\mu\text{L}$  de esferas AMPure XP e incubadas em um misturador Hula (misturador rotativo). Foram preparados 500  $\mu\text{L}$  de etanol fresco a 70% em água. A amostra foi centrifugada e sedimentada em um ímã e o sobrenadante foi pipetado. Mantendo o tubo no ímã, os beads magnéticos foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. O etanol com foi removido com uma pipeta e descartado. Foi repetido a etapa anterior. O tubo foi centrifugado e colocado de volta no ímã. Após secar e remover o tubo do suporte magnético, o pellet foi ressuspensado em 61  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease. Incubou-se à temperatura ambiente. As esferas foram agrupadas em um ímã até que o eluato ficou límpido e incolor. Foi removido e 61  $\mu\text{L}$  de eluato foi retido em um tubo Eppendorf DNA LoBind limpo de 1,5 mL. O Adapter Mix (AMX) e Quick T4 Ligase foram centrifugados e colocados no gelo. O Tampão de Ligação (LNB) foi descongelado, centrifugado, misturado com a pipeta e colocado no gelo imediatamente. O tampão de eluição (EB) foi descongelado, misturado em vórtex, centrifugado e colocado no gelo.

Para enriquecer fragmentos de DNA de 3 kb ou mais, usou-se o Tampão de Fragmento Longo (LFB). Certificando-se de que os componentes estivessem misturados. Incubou-se a reação durante 10 minutos. As esferas AMPure XP foram ressuspensas agitando-as em Vortex e adicionados 40  $\mu\text{L}$  das esferas à reação e misturado. Incubou-se em um misturador rotativo por 5 minutos em temperatura ambiente. Quantificou-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra eluída usando um nanofotômetro (Implen). E armazenou-se a biblioteca preparada acima no gelo até a hora de carregar no Flow Cell. Foi centrifugada a amostra e concentrada com um ímã e pipetado o sobrenadante. Os beads foram lavados adicionando 250  $\mu\text{L}$  de LFB. Ressuspendeu-se, centrifugou-se e retornou-se o tubo ao suporte magnético para permitir que as esferas formem pellets. Foi removido e descartado o sobrenadante. As 2 etapas anteriores se repetiram. Foi centrifugado e colocado o tubo de volta no ímã. Após isso, Pipetou-se qualquer sobrenadante residual e deixou-se secar por 30 segundos. Foi removido o tubo do suporte magnético e ressuspensado o pellet em 15  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição (EB). Centrifugou-se e incubou-se a 37°C. Foram agrupadas as esferas num ímã até que o eluato ficou límpido e incolor.



Removeu-se e reteu-se 15  $\mu\text{L}$  de eluato contendo a biblioteca de DNA em um tubo Eppendorf DNA LoBind limpo de 1,5 mL.

#### 4.5 Preparo e carregamento da flow cell

Para o preparo da biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo e o carregamento da flow cell, foi utilizado o Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) da Oxford Nanopore Technologies, seguindo as recomendações do fabricante (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES, 2016).

O tampão de sequenciamento (SQB), as esferas de carregamento (LB) o Flush Tether (FLT) e um tubo de tampão de descarga (FB) foram descongelados antes de misturar os reagentes em vortex e centrifugados à temperatura ambiente. Para o preparo da mistura de preparação da célula de fluxo, foi adicionado 30  $\mu\text{L}$  de FLT descongelado diretamente ao tubo de FB descongelado, e misturado em vórtex. Abriu-se a tampa do dispositivo MinION e deslizou-se a lâmina de fluxo sob o clipe. Foi pressionado firmemente a célula de fluxo para garantir o contato térmico e elétrico correto. A célula de fluxo foi inserida no dispositivo sob o clipe. Misturou-se o conteúdo das LB.

Em um novo tubo, foi preparada a biblioteca para carregamento misturando 37,5  $\mu\text{L}$  de SQB, 25,5  $\mu\text{L}$  de LB e 12  $\mu\text{L}$  da Biblioteca de DNA preparada acima. A tampa da porta de amostra SpotON foi levantada, e 200  $\mu\text{L}$  da mistura de priming foram carregadas na porta da célula de fluxo, evitando a introdução de bolhas. Abriu-se suavemente a tampa SpotON. Adicionou-se 75  $\mu\text{L}$  da biblioteca preparada à célula de fluxo através da porta de amostra SpotON, gota a gota. Foram seguidas as instruções no software MinOW para proceder com o sequenciamento.

#### 4.6 Montagem do genoma

Para o alinhamento das sequências e a análise dos dados brutos, irá se empregar o uso do software EPI2ME, recomendado pela Oxford Nanopore Technologies. Será usado o workflow “epi2me-labs/wf-bacterial-genomes”.

Em paralelo, serão utilizados os guias contidos na plataforma GitHub: [https://github.com/baynec2/nanopore\\_pipelines](https://github.com/baynec2/nanopore_pipelines), que engloba códigos que irão



auxiliar na montagem e anotação do novo genoma. Além de construir o código em Python, serão empregados programas como Prokka, Medaka, Seqkit e Quarto, para realizar a montagem e anotação automática. Conta-se com a utilização do HTML e CSS para a codificação da interface do usuário.

#### **4.7 Busca por clusters de genes biosintéticos em *Bacillus velezensis***

Após a montagem do novo genoma sequenciado neste trabalho, ele será submetido à plataforma antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). O antiSMASH proporciona a anotação, identificação e análise eficiente de clusters de genes de biossíntese de metabólitos secundários em genomas bacterianos e fúngicos, sendo desenvolvido com diversas ferramentas de código aberto. O programa irá buscar BGC, que podem ser responsáveis pela produção de metabólitos secundários, os quais podem ter ação antibiótica ou antifúngica.

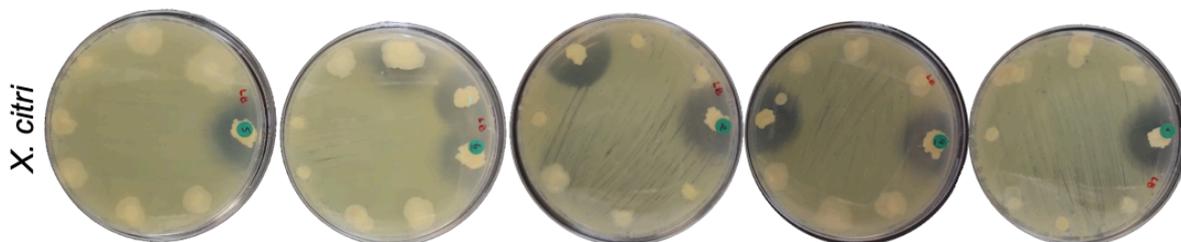
A identificação molecular do organismo isolado com melhor atividade antifúngica revelou que o mesmo é um *Bacillus velezensis*, portanto, foram selecionados também 20 genomas já publicados de diferentes linhagens da mesma espécie da bactéria, para realizar a busca por grupos de genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários, e avaliar a diversidade do metabolismo especializado dentro de uma mesma espécie de bactéria.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Validação fenotípica de atividade antibacteriana**

Foram realizados testes de halo de inibição para aproximadamente 70 isolados, sobre filtros em placas LB com a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri*. Nesses experimentos foi incluída a linhagem de *B. subtilis* vendida para controle biológico sob o nome comercial Serenade. Observa-se que diversos dos nossos isolados possuem atividade comparável a produtos comerciais (Figura 1).

**Figura 1** - Halos de inibição devido à secreção de antimicrobianos por microrganismos isolados transferidos para discos de papel absorvente distribuídos na periferia das placas sobre uma camada da bactéria fitopatogênica *X. citri*. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. As posições das placas marcadas com rótulos verdes indicam o controle positivo: cepa comercial de *B. subtilis* vendida para fins agrícolas sob o nome comercial Serenade para controle biológico de fungos e bactérias.

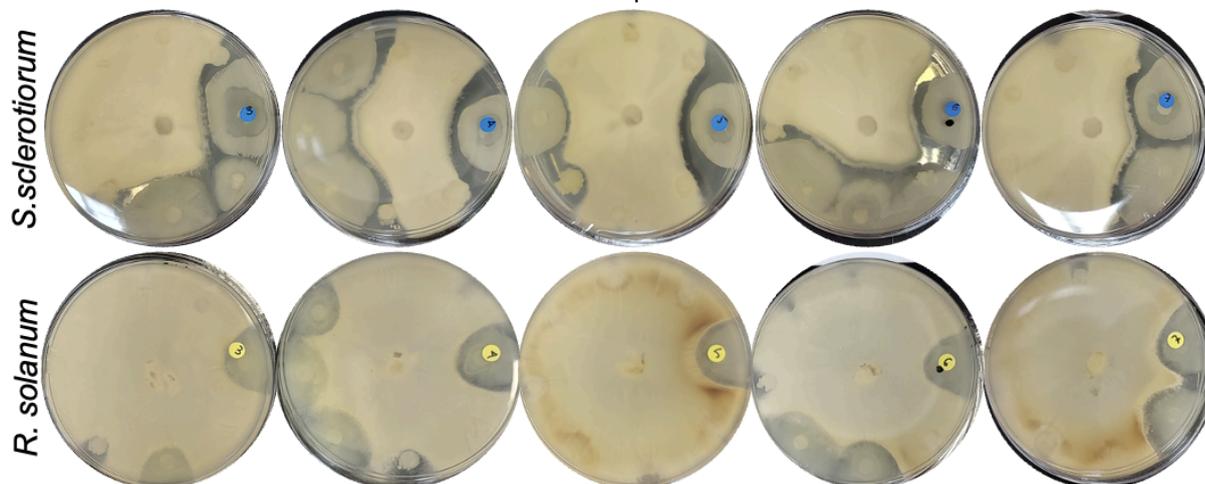


Fonte: elaborado pelo autor (2024)

## 5.2 Validação fenotípica de atividade antifúngica

Também foram realizados testes de halo de inibição para os 70 isolados, sobre filtros em placas BDA com discos contendo os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solanum*. Como no experimento anterior, foram incluídos nesses experimentos a linhagem de *B. subtilis* vendida para controle biológico sob o nome comercial Serenade. Observa-se que diversos dos nossos isolados possuem atividade comparável a produtos comerciais (Figura 2). O isolado com melhor atividade antibacteriana e antifúngica foi o *Bacillus velezensis* M3.18.

**Figura 2** - Halos de inibição devido à secreção de antimicrobianos por microrganismos isolados transferidos para discos de papel absorvente distribuídos na periferia das placas onde foram colocados discos de ágar com hifas de *Sclerotinia sclerotiorum* (imagens superiores) ou *Rhizoctonia solanum* (imagens inferiores) no centro. As posições das placas marcadas com etiquetas azuis ou amarelas indicam o controle positivo: cepa comercial de *Bacillus subtilis* vendida para fins agrícolas sob o nome comercial Serenade para controle biológico de fungos e bactérias. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

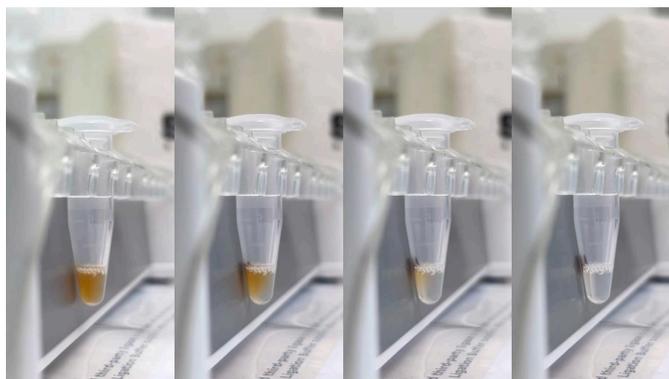
### 5.3 Extração de DNA genômico

Foram realizadas diversas tentativas de extração de DNA genômico da linhagem M3.18, atingindo um rendimento de até 58,4 ng/μl.

### 5.4 Preparo de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo

Utilizando o DNA genômico do *Bacillus velezensis* M3.18, foi preparada a biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo (Figura 3). Infelizmente todos os reagentes utilizados para o preparo da biblioteca ultrapassaram o prazo de validade já em 2020, portanto havia ciência de que a qualidade do preparo seria ruim.

**Figura 3** - Purificação de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo com formação de um pellet pela ação de beads magnéticos atraídos pelo suporte magnético.



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

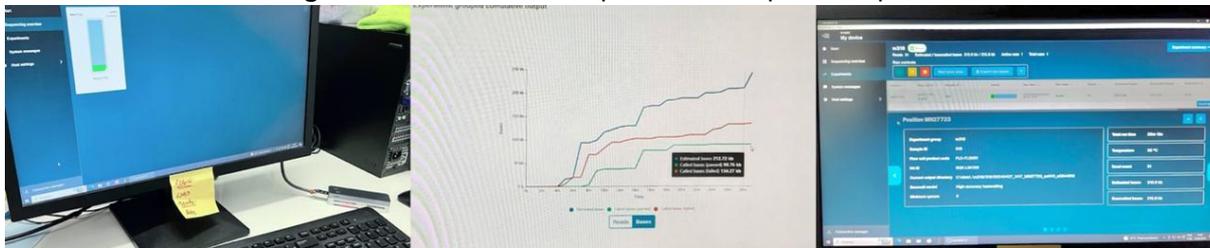
Seguindo as recomendações do fabricante foi possível obter DNA com adaptadores na concentração de 2,17 ng/ul.

Foi avaliado a qualidade dos poros ativos nos flowcells Flongle para Minlon Nanoporo. Um flowcell novo tem aproximadamente 50 poros ativos, porém o flowcell vencido que foi utilizado tinha somente 17 poros.

### 5.5 Sequenciamento por Nanoporo

Para a familiarização com o equipamento, procedeu-se com o sequenciamento e foram obtidos 107 mil pares de bases sequenciadas (Figura 4).

**Figura 4** - Processo de sequenciamento por Nanoporo.



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

## 5.6 Montagem do genoma

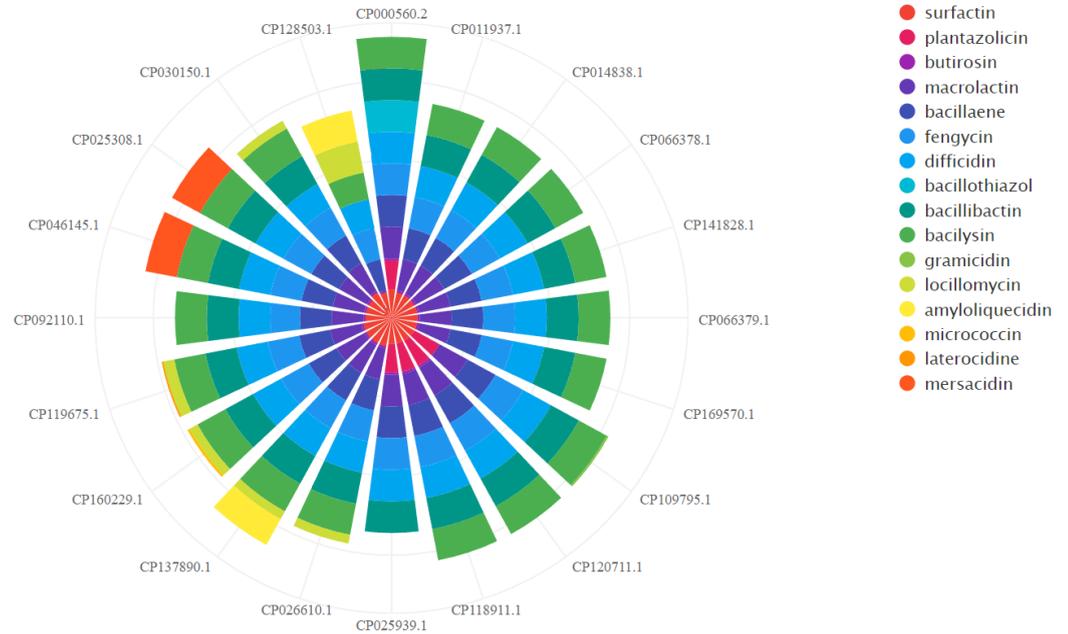
Espera-se montar um código simples e eficiente capaz de receber os dados brutos de sequenciamento e montar e anotar o genoma de maneira rápida. Assim, contribuindo com o projeto para ajudar a descobrir os genes responsáveis pela secreção antibiótica e antifúngica, para posteriormente proporcionar o aumento da capacidade produtiva dos microrganismos cultivados. Além disso, busca-se que o software possa facilitar o processo de montagem e anotação do genoma tornando-o mais compreensível, sendo uma nova ferramenta que possa ser disponibilizada para o uso gratuito a terceiros, e poderá auxiliar novas descobertas científicas.

## 5.7 Busca por clusters de genes biosintéticos

A partir da anotação realizada pelo antiSMASH, espera-se identificar os genes responsáveis pela produção dos antibióticos e antifúngicos da linhagem M3.18. Assim, possibilitando futuramente o aumento da capacidade produtiva de antimicrobianos das bactérias cultivadas.

Além disso, foi realizada a busca por BGCs em genomas publicados de várias linhagens diferentes da mesma espécie da bactéria, *Bacillus velezensis*, que a linhagem M3.18. Observa-se que dentro de uma mesma espécie de bactéria há uma grande diversidade de *clusters* de genes produtores de antimicrobianos (Figura 5).

**Figura 5** - Clusters de genes biossintéticos (BGC) em *Bacillus velezensis*. Realizou-se a busca por antiSMASH de BGCs em 20 linhagens de *B. velezensis* já sequenciadas e identificou-se metabólitos secundários em comum e outros únicos para certas linhagens (gráfico elaborado com Everviz).



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

## 6. CONCLUSÕES

Durante 2023, isolou-se e realizou-se uma caracterização preliminar de aproximadamente 70 linhagens de fungos e bactérias presente em amostras de méis comerciais. Encorajados pelo grande número de linhagens com atividade antifúngica ou antibiótica contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e a bactéria *Escherichia coli* DH5alpha, organismos padrão em laboratórios, foi decidido testar a atividade de nossos isolados contra fungos e bactérias de importância agrícola. Para isso, experimentos foram realizados com os fungos *S. sclerotiorum* e *R. solanum* e a bactéria *X. citri*, verificando que diversos de nossos isolados têm atividade tão boa quanto a linhagem vendida para agricultores como agente de controle biológico.

Foram identificadas as espécies de várias linhagens isoladas e as mesmas são diferentes da linhagem comercial para controle biológico. Os estudos anteriores também haviam constatado que as linhagens isoladas possuem diferentes padrões de resistência a antibióticos, levando a concluir que produzem antibióticos distintos. Sendo assim, a primeira vista nossas linhagens não parecem superiores à



comercial, mas o fato de aparentemente estarem produzindo antimicrobianos distintos, faz com que as linhagens prospectadas do mel sejam uma alternativa atraente caso fungos e bactérias se tornem resistentes a antimicrobianos produzidos pela linhagem comercial.

Com base na caracterização fenotípica, foi selecionada a linhagem M3.18 para sequenciamento genômico e posterior identificação de grupos de genes responsáveis pela produção dos antimicrobianos. Para isso teve-se acesso a reagentes para sequenciamento por Nanoporo com data de validade no ano de 2020. Apesar das claras limitações decorrentes do trabalho com reagentes vencidos, a primeira tentativa de sequenciamento já gerou 107 510 pares de bases. Este valor está muito aquém dos 20-25 milhões de bases necessárias para o sequenciamento do genoma completo (5 vezes de cobertura sobre o genoma de 4,2 milhões de pares de bases), mas indica que com novas rodadas de sequenciamento poderá-se obter um maior volume de resultados para completar o genoma.

Com o genoma completo, será possível realizar as análises bioinformáticas para a identificação dos *clusters* biossintéticos responsáveis pela síntese dos antimicrobianos na linhagem M3.18. Por enquanto, foi realizada a busca por BGCs em várias linhagens de *B. velezensis* com genomas sequenciados e de acesso público, e foi possível observar uma grande variedade de *clusters* de genes produtores de antimicrobianos dentro de uma mesma espécie de bactéria. Em paralelo, está sendo desenvolvido um programa para facilitar o processo de montagem de genoma sequenciado por Nanoporo, para facilitar as análises futuras de demais pesquisadores.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁVILA, Antonio Carlos de; QUEZADO-SOARES, Maria Alice. **Fungo**. 2022. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/tomate/producao/doencas-e-pragas/doencas/fungo>. Acesso em: 27 mar. 2024.

BAYNE, Charlie. **Nanopore Pipelines**. 2023. Disponível em:

[https://github.com/baynec2/nanopore\\_pipelines](https://github.com/baynec2/nanopore_pipelines). Acesso em: 30 mar. 2024.

BRITO, Monique Araujo; CORDEIRO, Benedito Carlos. **Necessidade de novos antibióticos**. 2012. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/jbpml/a/qbFCDmHFwGRJLQZ8Yz9HQSQ/#>. Acesso em: 22 mar. 2024.

**Cancro Cítrico**. 2019. FUNDECITRUS. 2024. Disponível em:

<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro>. Acesso em: 22 jun. 2024.

CASSOL, Matheus Pedron; LENZ, Alexandre Rafael; ZACARIA, Rudinei; AVILA E SILVA, Scheila de. **Configuração de Ambiente Computacional para Montagem e Anotação Genômica: orientações para pesquisadores da Ciência da Vida**. 2022. Disponível em:

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-75872022000200071&lang=en](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872022000200071&lang=en). Acesso em: 27 mar. 2024.

CHRISTENSEN, Jen. **Ameaça dos fungos à saúde humana cresce em um mundo cada vez mais quente e úmido**. 2023. Disponível em:

<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/ameaca-dos-fungos-a-saude-humana-cresce-em-um-mundo-cada-vez-mais-quente-e-umido/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

CZYZEWSKI, Andrew. **The Imperial researchers taking the fight to the superbugs**. 2015. Disponível em:

<https://www.imperial.ac.uk/news/166470/the-imperial-researchers-taking-fight-superbugs/>. Acesso em: 26 mar. 2024.

**Doenças resistentes podem inviabilizar o controle químico**. 2021. © SUMITOMO CHEMICAL. 2024. Disponível em:

<https://www.sumitomochemical.com.br/artigos/doencas-resistentes-podem-inviabilizar-o-controle-quimico/>. Acesso em: 22 mar. 2024.

**Escassez global de antibióticos inovadores estimula surgimento e disseminação da resistência aos medicamentos**. 2021. © ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. 2024 Disponível em:

<https://www.paho.org/pt/noticias/15-4-2021-escassez-global-antibioticos-inovadores-estimula-surgimento-e-disseminacao-da>. Acesso em: 27 mar. 2024



**Fungicidas, conheça os produtos responsáveis por proteger os alimentos dos fungos.** 2019. CROPLIFE. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/conceitos/fungicidas-conheca-os-produtos-responsaveis-po-r-proteger-os-alimentos-dos-fungos/>. Acesso em: 3 out. 2024.

GHINI, Raquel; KIMATI, Hiroshi. **Resistência de fungos a fungicidas.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/13231>. Acesso em: 3 out. 2024.

GOMES, Shisleny. **Mapa amplia especificações de produtos fitossanitários para agricultura orgânica.** 2024. Disponível em: <https://agro2.com.br/agricultura/mapa-amplia-especificacoes-de-produtos-fitossanit-arios-para-agricultura-organica/>. Acesso em: 5 out. 2024.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/dhKT3h4ZxxvsQdkzyZ4VnpB/#>. Acesso em: 22 mar. 2024.

LIMA, Ana Carolina Almeida; SOUZA, Motaanny Karoline. **Um Mundo Assombrado por Demônios: a História da Descoberta e Desenvolvimento dos Antibióticos.** 2023. 54 f. TCC (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2023. Disponível em: [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/17911/2/Ana\\_Carolina\\_Almeida\\_Lima\\_Mota\\_%26\\_Ann\\_y\\_Karoline\\_Souza\\_Porto.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/17911/2/Ana_Carolina_Almeida_Lima_Mota_%26_Ann_y_Karoline_Souza_Porto.pdf). Acesso em: 26 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.

MAPA. **Produtos Fitossanitários com uso Aprovado para a Agricultura Orgânica Registrados.** Brasília: Ministério da Agricultura e Pecuária, 2022. 14 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtos-fitossanitarios/ProdutosFitossanitrioscomusoAprovadoparaAgriculturaOrgnicaRegistradosatualizadoem31052022.pdf>. Acesso em: 5 out. 2024.

NETO, João. **Brasil já tem 3 safras agrícolas por ano, e tecnologia pode fazer produção dobrar.** 2024. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/negocios/noticia/2024/09/21/brasil-ja-tem-3-s-afra-agricolas-por-ano-e-tecnologia-pode-fazer-producao-dobrar.ghtml>. Acesso em: 5 out. 2024.

OLIVETO, Paloma. **Uso de fungicidas está tornando fungos resistentes a medicamentos.** 2022. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/ciencia-e-saude/2022/04/5003041-uso-de-fungicidas-na-agricultura-esta-tornando-fungos-resistentes-a-medicamentos.html#go>



[gle\\_vignette](#). Acesso em: 3 out. 2024.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES (Reino Unido). **Ligation sequencing gDNA (SQK-LSK109)**. Oxford: Oxford Nanopore Technologies, 2016. 35 p. Disponível em: <https://nanoporetech.com/document/gDNA-sqk-lsk109#overview-of-the-1d-sequenc>. Acesso em: 2 out. 2024.

PROMEGA CORPORATION (Estados Unidos da América). **Wizard(R) Genomic DNA Purification Kit Technical Manual**. Madison: Promega Corporation, 2018. 18 p. Disponível em: [https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?rev=4365298e7d1148e78b6c466889006f83&sc\\_lang=en](https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?rev=4365298e7d1148e78b6c466889006f83&sc_lang=en). Acesso em: 2 out. 2024.

REIS, Erlei Melo; MEDEIROS, Carlos A.; BRESOLIN, Andrea C. Reis; CASA, Ricardo T. **Requeima - Ameaça à batata e ao tomate**. 2015. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/index.php/artigos/requeima-ameaca-a-batata-e-ao-tomate>. Acesso em: 22 mar. 2024.

TAKAHASHI, Juliana Possatto; MELHEM, Marcia de Souza Carvalho. **Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica**. 2014. 2 f. Tese (Doutorado) - Curso de M Ciências - Coordenadoria de Controle de Doenças-Secretaria de Estado da Saúde, Instituto Adolfo Lutz, Pacaembu, 2014. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial\\_241/bial\\_24\\_1-13.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_241/bial_24_1-13.pdf). Acesso em: 3 out. 2024.

**Uso de fungicidas na agricultura e resistência a antifúngicos na clínica médica**. 2017. INSTITUTO DE PESQUISA E EDUCAÇÃO EM SAÚDE DE SÃO PAULO. Disponível em: <https://www.ipessp.edu.br/site/blog/blog/uso-de-fungicidas-na-agricultura/>. Acesso em: 3 out. 2024.