

Katherine B. Marchesan, Luiza R. de Souza; Orientador: Elizabeth Bilsland;
Instituição: Instituto Federal de São Paulo, Campinas e Laboratório de Biologia Sintética, Instituto de Biologia, Unicamp

Resumo

A era atual 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, foi testada 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, foi realizado o sequenciamento utilizando a tecnologia Nanopore. Para a montagem do genoma e sua anotação foi desenvolvido um *pipeline* baseado em Python. Em seguida a plataforma antiSMASH foi utilizada para buscar grupos de genes responsáveis pela produção de antimicrobianos. Desta maneira, foram sugeridos quais genes podem ser responsáveis pela produção antimicrobiana, para futuramente possibilitar o aumento da capacidade produtiva das bactérias cultivadas para uso comercial.

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. Com isso, busca-se caracterizar bactérias produtores de antimicrobianos isolados em 2023 de méis comerciais, para sua otimização.

Objetivos

O presente projeto visa dar continuidade à validação fenotípica de organismos isolados do mel, além de realizar o sequenciamento de uma bactéria para a identificação dos genes responsáveis pela síntese de antimicrobianos.

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 e o preparo e carregamento da flow cell 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.

Resultados

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

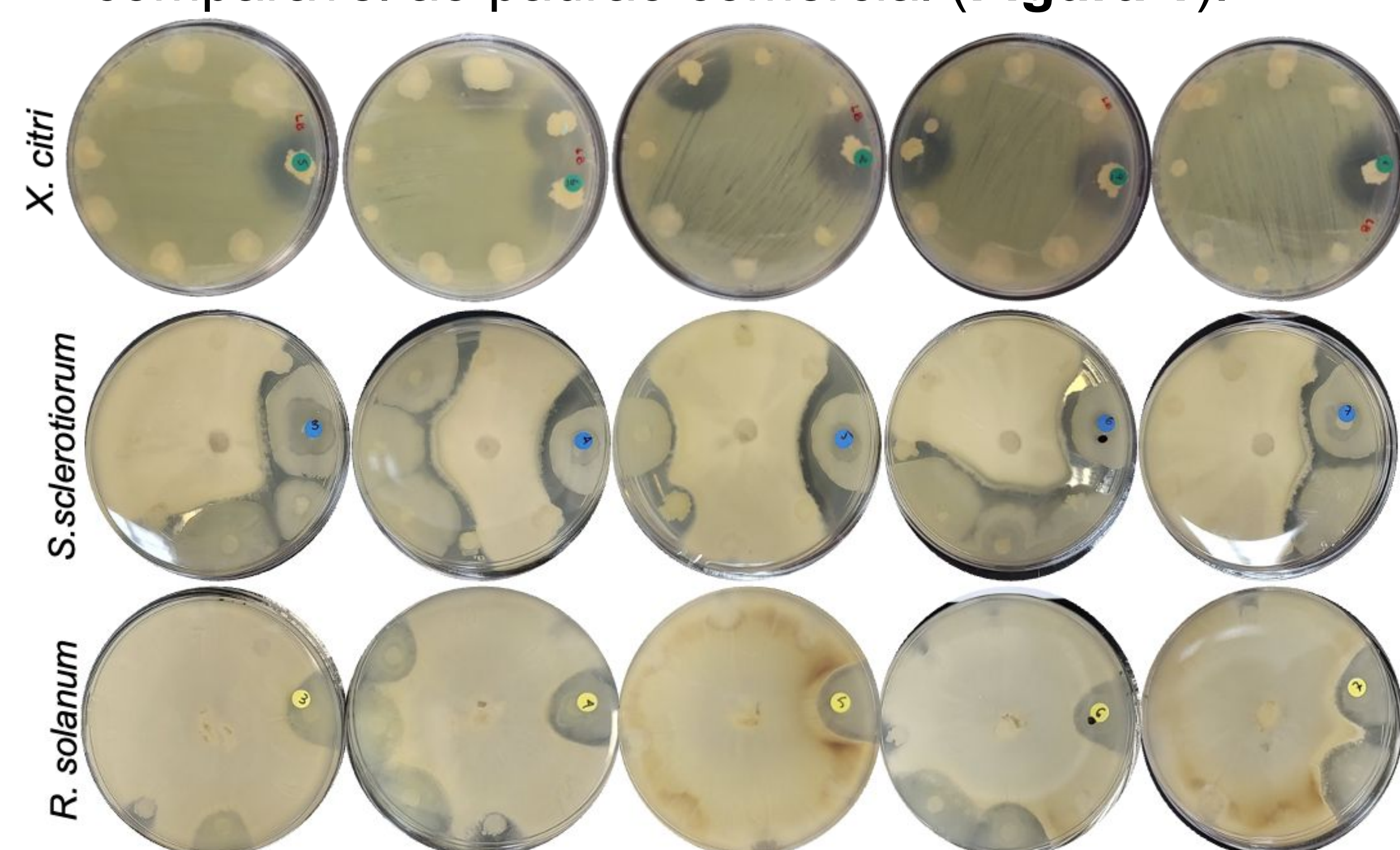


Figura 1. Antibiogramas bactérias isoladas do mel e bactéria comercial (posição com adesivo colorido) diluídas até 1:100 e pipetadas sob papéis de filtro distribuídos em placas com meio Luria-Bertani (LB) e um filma da bactéria *X. citri*, ou placas com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e os fungos *Sclerotinia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

Fonte: elaborado pelos autores (2024)

Foi realizada a extração de DNA genômico de M3.18, atingindo um rendimento de 58,4 ng/μl. Infelizmente todos os reagentes para sequenciamento utilizados ultrapassaram o prazo de validade, portanto foi possível obter DNA com adaptadores na concentração de 2,17 ng/ul e apenas 17 poros ativos no flowcell (um flowcell novo tem por volta de 800 poros ativos). Apesar disso, foram obtidas 107 mil pares de bases sequenciadas.



Figura 2. Sequenciamento por nanopore. Imagens ilustrando 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**).

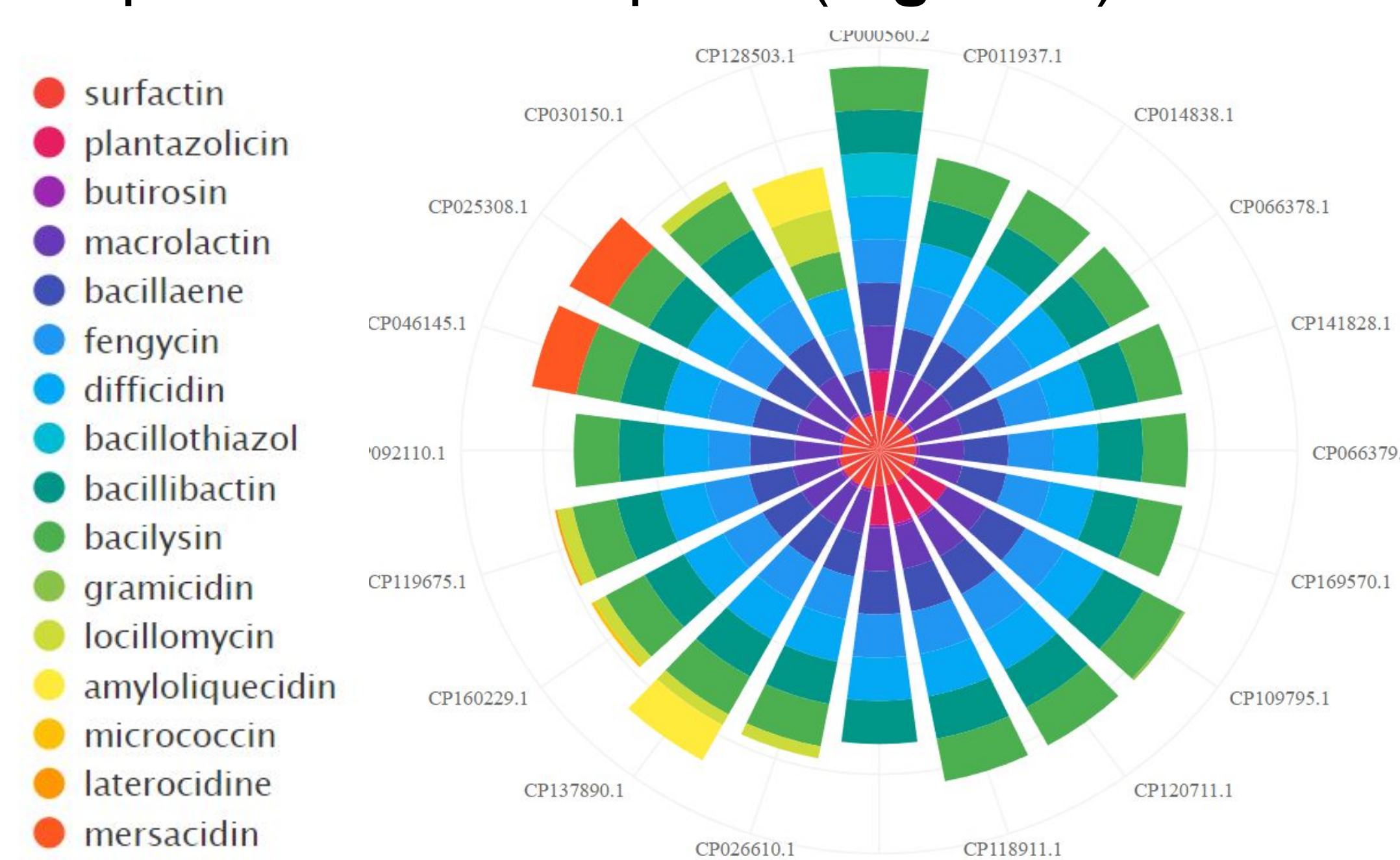


Figura 3. Clusters de genes biossintéticos (BCG) em *Bacillus velezensis*. Realizou-se a busca por antiSMASH de BCGs em 20 linhagens de *B. velezensis* já sequenciadas e identificou-se metabólitos secundários em comum e outros únicos para certas linhagens (gráfico elaborado com Evviz).

Fonte: elaborado pelos autores (2024)

Conclusão

Apesar das limitações decorrentes do trabalho com reagentes vencidos, com novas rodadas de sequenciamento, poderá-se obter um maior volume de resultados para completar o genoma. Assim, será possível realizar as análises bioinformáticas e progredir no desenvolvimento do programa para facilitar o processo de montagem de genoma para futuros pesquisadores.

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.