

## 15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

### Caracterização Genética e Fenótipica de Bactérias Produtoras de Antimicrobianos Isoladas de Méis Comerciais

KATHERINE. B. MARCHESAN<sup>1</sup>, LUIZA. R. DE SOUZA<sup>2</sup>, ELIZABETH BILSLAND<sup>3</sup>, MÁRCIO A. MIRANDA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Cursando Técnico em Informática, Bolsista CNPQ Júnior, IFSP, Campus Campinas, [katherine.b@aluno.ifsp.edu.br](mailto:katherine.b@aluno.ifsp.edu.br)

<sup>2</sup> Cursando Técnico em Informática, Bolsista CNPQ Júnior, IFSP, Campus Campinas, [luiza.souza@aluno.ifsp.edu.br](mailto:luiza.souza@aluno.ifsp.edu.br)

<sup>3</sup> Professora, UNICAMP, Campus Campinas, [bilsland@unicamp.br](mailto:bilsland@unicamp.br)

<sup>4</sup> Professor, IFSP, Campus Campinas, [m\\_amiranda@ifsp.edu.br](mailto:m_amiranda@ifsp.edu.br)

**RESUMO:** Atualmente existe um alto surgimento de bactérias e fungos resistentes a todas as classes de antimicrobianos já descobertos. Por isso, é crucial que se descubra novos antibióticos e antifúngicos que combatam esses microorganismos. Portanto, a proposta deste trabalho, é o sequenciamento de uma linhagem de bactéria isolada e a montagem do genoma com a finalidade de identificação dos genes responsáveis pela produção de antimicrobianos. Para obtenção de bactérias com capacidade de secretar antibióticos e antifúngicos, foi utilizado como fonte 5 méis diferentes. Foram selecionadas para preparo de DNA genômico, genotipagem e ensaios de halo de inibição as bactérias que cresceram em diferentes meios de cultura. Obteve-se 20 isolados capazes de secretar antimicrobianos, sendo a maioria, do gênero *Bacillus*. Pretende-se, na sequência, avaliar a eficácia destes microrganismos contra fungos e bactérias prejudiciais. Para os microrganismos com maior eficácia na produção de antimicrobianos, será extraído o DNA e sequenciado. Para a montagem do genoma e sua anotação será utilizado ferramentas baseadas em Python, Linguagem de Marcação de HiperTexto (HTML), Folha de Estilo em Cascatas (CSS), Linguagem de Consulta Estruturada (SQL) e Pré-Processador de Hipertexto (PHP). Ademais, utilizará a plataforma antiSMASH para buscar grupos de genes responsáveis pela produção de antibióticos e antifúngicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobiano; genotipagem; sequenciamento.

### Characterisation of New Strains of Antibiotic and Antifungal Producing Bacteria.

**ABSTRACT:** Nowadays, there is a high emergence of bacteria and fungi resistant to all classes of antimicrobials that have been discovered. Therefore, it is crucial to discover new antibiotics and antifungals that combat these microorganisms. Thus, the current proposal of this work is the sequencing of a strain of isolated bacteria and the assembly of the genome with the specific purpose of identifying the genes responsible for the production of antimicrobials. To obtain bacteria with the ability to secrete antibiotics and antifungals, 5 different honeys were used as a source. Bacteria that grew in different culture media were selected for genomic DNA preparation, genotyping and halo inhibition assays. 20 isolates capable of secreting antimicrobials were obtained, the majority of which were from the *Bacillus* genus. In sequence, the effectiveness of these microorganisms against specific problematic fungi and bacteria will be evaluated. Microorganisms with greater effectiveness in the production of antimicrobials, will have DNA extracted and sequenced. To assemble the genome and its annotation, tools based in Python, HyperText Markup Language (HTML), Cascading Style Sheet (CSS), Structured Query Language (SQL) and Hypertext Preprocessor (PHP) will be used. Furthermore, the platform antiSMASH will be utilized to search for groups of genes responsible for the production of antibiotics and antifungals.

**KEYWORDS:** Antimicrobial; genotyping; sequencing.

## INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são 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, e a redução dramática na descoberta de novos antimicrobianos (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010). Além da necessidade dos antibióticos, há a grande importância dos antifúngicos. Diversos fungos de importância médica e especialmente de importância agrícola desenvolveram resistência contra os fungicidas do mercado e passaram a atacar plantações e lavouras (Sumitomo Chemical, 2021).

Há uma necessidade emergente em desenvolver novos antimicrobianos e disponibilizá-los no mercado (Organização Pan-Americana de Saúde, 2024). Desde 2023, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na seleção de microrganismos de méis de diferentes regiões do Brasil com a finalidade de detectar possíveis microrganismos capazes de secretar antimicrobianos e antifúngicos. As cepas que apresentaram estas características foram cultivadas para preparo de DNA genômico, estocagem e ensaios de halo de inibição. Os organismos que secretam mais antimicrobianos foram amplificados, sequenciados e comparados no banco de dados online BLAST. Como resultado, descobriu-se que quase todos os microrganismos encontrados no mel são de alguma espécie de *Bacillus*.

Assim, o presente projeto visa dar continuidade à validação fenotípica dos organismos isolados para desenvolver antimicrobianos novos com maior capacidade de secreção de antimicrobianos aos produtos comerciais, além de realizar o sequenciamento do genoma completo de um dos *Bacillus* isolados. Para isso, será criado um software, usando codificação em Python, HTML, CSS, e PHP, que facilitará o processo de montagem e análise de genoma a partir dos dados brutos do sequenciamento dos microrganismos (Cassol *et al.*, 2022).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para analisar a produção antibacteriana dos microrganismos, eles foram testados em ensaios de halos de inibição (antibiogramas) contra a bactéria *Xanthomonas citri*, causadora do cancro cítrico, afetando todas as espécies e variedades de citros de importância comercial (Fundecitrus, 2019).

Para o cultivo de microrganismos, foram preparadas placas de petri de 5 cm de diâmetro com o meio Ágar Trípico de Soja (TSA). E replicados 72 linhagens de microrganismos armazenados a -80°C. Após incubação a 30°C por 2 dias, cada microrganismo foi inoculado em 1 ml de meio Caldo de Trípico de Soja (TSB) e incubado a 30°C por 4 horas. Em seguida, diluições de *X. citri* foram preparadas e 100 µl 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 µl 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 48h a 37°C. Fotografou-se as placas e mediu-se os halos de inibição para avaliar a secreção de compostos antibacterianos.

A fim de testar a atividade antifúngica dos organismos, foram realizados halos de inibição utilizando fungos fitopatogênicos. 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 µl 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 dias 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.

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

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).

Para o preparo e carregamento da *flow cell* para sequenciamento por Nanoporo, foi utilizado o protocolo *Flow Cell Priming Kit* (EXP-FLP002) da *Oxford Nanopore Technologies*, seguindo as recomendações do fabricante. Após o carregamento do DNA, foram seguidas as instruções no software para proceder com o sequenciamento.

Para a detecção de variantes, alinhamento 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”. Além da utilização dos 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. Após construir o código em *Python* que realizará a montagem e anotação automática, conta-se com a utilização do HTML e CSS para a codificação da interface do usuário e SQL e PHP para a manipulação do banco de dados.

Após a montagem do novo genoma e busca por genomas já publicados de linhagens semelhantes às isoladas do mel, os genomas serão submetidos 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.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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).

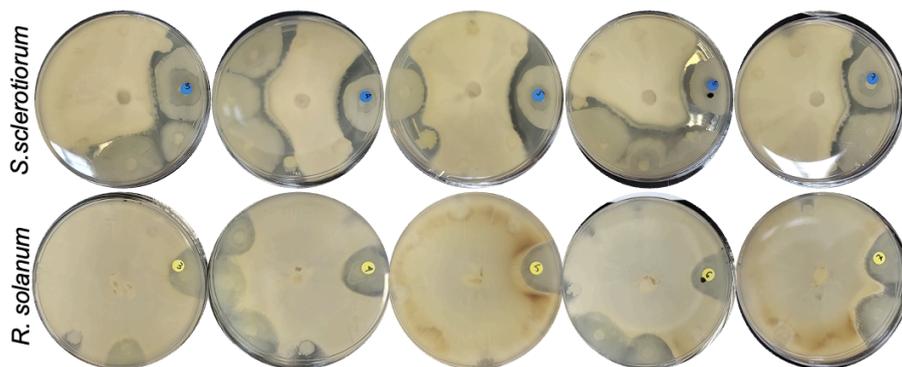
FIGURA 1. Imagem ilustrando halos de inibição devido à secreção de antimicrobianos por microrganismos isolados transferidos para discos de papel absorvente distribuídos na periferia das placas sobre uma camada da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri*. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. 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: Os autores

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).

FIGURA 2. Imagem ilustrando 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: Os autores

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

Utilizando o DNA genômico do *Bacillus sp.* 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. Imagem ilustrando a purificação de biblioteca de DNA para sequenciamento por Nanoporo com formação de um pellet pela ação de *beads* magnéticos atraídos pelo suporte magnético.



Fonte: Os autores

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 Floccells Flongle para MinIon Nanoporo. Um flowcell novo tem aproximadamente 800 poros ativos, porém o flowcell vencido que foi utilizado tinha somente 17 poros.

Para a familiarização com o equipamento, procedemos com o sequenciamento e obtivemos 107 mil pares de bases sequenciadas.

Espera-se montar um código simples 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. 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. A partir da anotação realizada pelo antiSMASH, espera-se identificar os genes responsáveis pela produção dos antibióticos e antifúngicos. Assim, possibilitando futuramente o aumento

## 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. Nossos 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 selecionado 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, nossa 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 obter um maior volume de resultados para completar o genoma. Com o genoma completo, será possível realizar as análises bioinformáticas para a identificação dos operons responsáveis pela síntese dos antimicrobianos, e criar um programa para facilitar o processo de montagem de genoma a partir dos dados brutos para futuros pesquisadores. Além de possibilitar o aumento da sua capacidade de produção antibiótica e antifúngica.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

L.R.S e K.B.M contribuíram com o trabalho laboratorial, análise de dados, pesquisas, experimentos, registros e elaboração de software e artigo.

E.B foi responsável pela orientação do trabalho laboratorial e teórico e M.A.M pela coorientação do trabalho teórico.

Todos os autores contribuíram com a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

## REFERÊNCIAS

BAYNE, Charlie. **Nanopore Pipelines**. 2023. Disponível em: [https://github.com/baynec2/nanopore\\_pipelines](https://github.com/baynec2/nanopore_pipelines). Acesso em: 30 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.

**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

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.

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.