



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC



INGRIDE JARLINE SANTOS DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE BIOINOCULANTES PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE INTERESSE
AGRÍCOLA COM BASE EM ESPÉCIES DE *Streptomyces* E *Bacillus*
ISOLADOS DE RIOS AMAZÔNICOS

MANAUS-AM
2026

INGRIDE JARLINE SANTOS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOINOCULANTES PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE INTERESSE
AGRÍCOLA COM BASE EM ESPÉCIES DE *Streptomyces* E *Bacillus*
ISOLADOS DE RIOS AMAZÔNICOS**

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC – UFAM), como requisito para obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

**MANAUS-AM
2026**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- S586d Silva, Ingrid Jarline Santos da
Desenvolvimento de bioinoculantes para promoção de crescimento e controle de fitopatógenos de interesse agrícola com base em espécies de *Streptomyces* e *Bacillus* isolados de rios amazônicos / Ingrid Jarline Santos da Silva. - 2026.
120 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Gilvan Ferreira da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2026.
1. Microrganismos amazônicos. 2. Biotecnologia. 3. Mineração genômica. 4. Controle biológico. 5. Promoção de crescimento. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título
-

INGRIDE JARLINE SANTOS DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOINOCULANTES PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE INTERESSE
AGRÍCOLA COM BASE EM ESPÉCIES DE *Streptomyces* E *Bacillus* ISOLADOS DE
RIOS AMAZÔNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 26/02/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva
Embrapa Amazônia Ocidental

Prof. Dr. Marcos Antônio Soares
Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dra. Marisa Vieira de Queiroz
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Thiago Fernandes Sousa
Northeastern University (USA)

Prof. Dra. Larissa Kirsch Barbosa
Universidade do Estado do Amazonas

MANAUS-AM
2026

Dedicatória

À minha mãe, Ednir Carvalho dos Santos, por todo o auxílio, incentivo e apoio para que eu pudesse continuar seguindo na vida acadêmica e realizar meus sonhos; e à minha avó, que sempre me incentivou a estudar. Mesmo sem saber ler ou escrever, ela sempre acreditou que os estudos seriam o caminho para transformar e melhorar o meu futuro.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, incentivo e compreensão ao longo desta trajetória, em especial à minha mãe, Ednir Carvalho, e ao meu padrasto, Domingos Sávio, pelas palavras positivas e pelo amparo nos momentos mais delicados deste período; e aos meus irmãos, Amaury Vasque e Flávio Ribeiro, por sempre acreditarem em mim e incentivarem meu trabalho.

Aos meus amigos, pela compreensão diante da minha ausência em tantos momentos (eu realmente estava estudando).

Aos meus amigos do laboratório, em especial a Kamila Tomoko e Thiago Fernandes, pela troca de conhecimentos; à Beatriz Miranda, pelo auxílio nas práticas de laboratório; e a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para esta etapa.

À minha amiga Vanessa Ribeiro e à sua mãe, pelo acolhimento e apoio durante o processo de doutorado; serei eternamente grata.

Ao Dr. Gilvan Ferreira da Silva, pela orientação, paciência e valiosa troca de conhecimentos ao longo deste período.

À Embrapa Amazônia Ocidental, em especial ao Laboratório de Biologia Molecular, pelo suporte estrutural essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA/ESA e ESAT), pela colaboração e parceria no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de formação acadêmica.

À FAPEAM, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Sumário

RESUMO.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. OBJETIVOS	16
CAPÍTULO I - Linhagens de <i>Streptomyces</i> isoladas de sedimentos amazônicos como promotoras do crescimento vegetal e agentes de biocontrole da antracnose em pós-colheita de <i>Capsicum chinense</i>	
RESUMO.....	19
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 Coleta e Isolamento	23
2.2. Caracterização morfológica	23
2.3. Extração de DNA	23
2.4 Amplificação da PCR.....	24
2.5 Sequenciamento do genoma completo	24
2.6 Análise filogenética.....	24
2.7 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	25
2.8. Atividade de Biocontrole Pós-Colheita	25
2.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
2.10. Avaliação de Mecanismos de Promoção de Crescimento	26
2.11. Promoção de Crescimento em <i>Capsicum chinense</i>	27
2.12. Análise Estatística	27
3. RESULTADOS	28
3.1. Aspectos Morfológicos e Identificação Molecular.....	28
3.2. Atividade Antifúngica	31
3.3. Efeito dos isolados de <i>Streptomyces</i> no controle de <i>Colletotrichum scovillei</i> em frutos de <i>Capsicum chinense</i>	34
3.4. Promoção de Crescimento Vegetal	37
3.5. Ensaio Enzimáticos	38
3.6. Tolerância a pH e Temperatura	40
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
MATERIAL SUPLEMENTAR	54

CAPÍTULO II - Análise genômica e química de duas linhagens de <i>Streptomyces</i> amazônicas: anotação de metabólitos bioativos com potencial biotecnológico	51
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1. Origem da linhagem	55
2.2. Extração de DNA e Sequenciamento do Genoma	55
2.3. Análise filogenética baseada no genoma completo	56
2.4. Mineração Genômica	56
2.5. Extração de Metabólitos Secundários	57
2.6. Perfil químico	58
3. RESULTADOS	59
3.1. Análise filogenômica	59
3.2. Anotação genômica e integração das ferramentas de predição de BGCs	60
3.3. Perfil químico	67
4. DISCUSSÃO	72
5. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
MATERIAL SUPLEMENTAR	81

CAPÍTULO III - Potencial biotecnológico de <i>Bacillus</i> spp. amazônicos como bioinoculantes para agricultura sustentável	78
RESUMO	79
1. INTRODUÇÃO	81
2. MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1. Sequenciamento do Genoma	83
2.2. Análise filogenômica baseada no genoma completo	83
2.3. Mineração genômica	83
2.4. Atividade antagônica contra diferentes fitopatógenos	84
2.5. Atividade enzimática	85
2.6. Tolerância a temperatura	87
3. RESULTADOS	87
3.1. Caracterização filogenômica	87

3.2. Predição de genes biossintéticos	88
3.3. Atividade antagônica de <i>Bacillus</i> contra diferentes fitopatógenos	90
3.4. Atividade enzimática	91
3.5. Tolerância a temperatura	91
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
REFERÊNCIAS	94
MATERIAL SUPLEMENTAR	105
REFERÊNCIAS GERAL	107

RESUMO

Esta tese teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico de duas linhagens de *Streptomyces* e três de *Bacillus* isoladas de sedimentos amazônicos para o desenvolvimento de bioinoculantes com aplicações no controle de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal. O trabalho foi dividido em três capítulos complementares: Capítulo I, onde duas linhagens de *Streptomyces* (APUR 32.5 e MPUR 40.3) foram avaliadas quanto ao seu potencial de biocontrole da antracnose causada por *Colletotrichum scovillei* em pimenta (*Capsicum chinense*), bem como sua capacidade de estimular o crescimento vegetal. Ambas apresentaram atividade antifúngica significativa *in vitro* e *in vivo*, além de promoverem o crescimento radicular das plantas. As linhagens também expressaram enzimas hidrolíticas, solubilizaram fosfatos e produziram sideróforos, demonstrando características promissoras para uso como bioinoculantes multifuncionais. Capítulo II aprofundou a caracterização genômica e química dessas linhagens de *Streptomyces*. A análise filogenômica indicou que APUR 32.5 representa uma potencial nova espécie. A mineração genômica revelou clusters biossintéticos (BGCs) relacionados à produção de metabólitos bioativos, corroborada por análises metabolômicas e ensaios de atividade antifúngica dos extratos. A integração dos dados genômicos e químicos permitiu associar a presença de BGCs a compostos bioativos detectados, reforçando o potencial dessas linhagens para aplicações biotecnológicas. Já no capítulo III, três linhagens de *Bacillus* (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1) foram caracterizadas por meio de filogenia, predição de genes biossintéticos e atividade antifúngica. As análises demonstraram que essas linhagens possuem ampla diversidade de genes relacionados à produção de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas. Os resultados desta tese obtidos destacam o potencial de microrganismos amazônicos como fontes promissoras para o desenvolvimento de bioinsumos sustentáveis, contribuindo para a redução do uso de pesticidas químicos e para a adoção de práticas sustentáveis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um dos principais obstáculos à produtividade agrícola é a incidência de doenças causadas por fitopatógenos, que reduzem significativamente o rendimento das culturas e comprometem a segurança alimentar global (PRIYA et al., 2024; GAI e WANG, 2024). Para diminuir esses impactos, o uso intensivo de defensivos agrícolas tem sido amplamente adotado (FENIBO et al., 2022; HEZAKIEL et al., 2024). No entanto, a aplicação indiscriminada desses compostos químicos levanta sérias preocupações ambientais e de saúde pública, além de favorecer a seleção de patógenos resistentes (ZHOU e ACHAL, 2024). Esse cenário se agrava diante dos desafios impostos pelas mudanças climáticas e da crescente demanda por alimentos, dificultando a adoção de sistemas agrícolas que conciliem alta produtividade e menor impacto ambiental (KHATRI et al., 2024).

Estima-se que aproximadamente um terço da produção mundial anual de alimentos, cerca de 1,3 bilhão de toneladas, seja perdido ou desperdiçado ao longo da cadeia produtiva, desde a pré-colheita até o pós-colheita, resultando em consequências econômicas significativas (SHAHBAZI et al., 2025). As taxas de perda variam entre os grupos alimentares, alcançando aproximadamente, 30% para cereais, 40-50% para tubérculos, frutas e hortaliças, e 20% para oleaginosas (ISHANGULYYEV et al., 2019; SHAHBAZI et al., 2025). Grandes partes dessas perdas estão associadas à ação de fitopatógenos, que continuam sendo um dos principais desafios da agricultura moderna (SADVAKASOVA et al., 2025; MADHUSHAN et al., 2025). No período pós-colheita, por exemplo, estima-se que patógenos sejam responsáveis por perdas entre 25% e 40% na produção global de frutas e hortaliças, contribuindo significativamente para o desperdício de alimentos (PORAT et al., 2018; SAWICKA e EGBUNA, 2020; GODANA et al., 2023).

Nesse contexto de vulnerabilidade e limitação dos métodos convencionais, cresce o interesse por estratégias sustentáveis de manejo fitossanitário e aumento da resiliência das plantas ao estresse abiótico (BEYARI, 2024). Entre as alternativas promissoras, destacam-se os bioinoculantes, microrganismos benéficos aplicados ao solo ou às plantas, que atuam tanto no controle de fitopatógenos quanto na promoção do crescimento vegetal, por meio de mecanismos como solubilização de fosfato, produção de sideróforos, fixação de nitrogênio e síntese de hormônios vegetais (SUMAN et al., 2022; SHARMA et al., 2023; BEYARI, 2024).

Dentre esses microrganismos, o gênero *Streptomyces* tem despertado grande interesse nas indústrias farmacêutica, alimentícia e agrícola por sua capacidade de produzir metabólitos secundários com propriedades antifúngicas, antibacterianas e anticâncer (SETHI et al., 2024; SIVALINGAM et al., 2024; VOJNOVIC et al., 2024; PATEL et al., 2025). Esses microrganismos também favorecem o crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios e da solubilização de nutrientes (AL-QUWAIE, 2024; WANG et al., 2024; PATEL et al., 2025). Estima-se que o gênero *Streptomyces* seja responsável pela produção de mais de 100.000 metabólitos com ação antibiótica, representando cerca de 75 a 80% de todos os compostos bioativos naturais utilizados na agricultura e na indústria farmacêutica (CHATTERJEE et al., 2025). Além da produção de metabólitos, suas enzimas são amplamente aplicadas na degradação de resíduos orgânicos e na formulação de biofertilizantes (KUMAR et al., 2020; KHUSHBOO et al., 2022).

De maneira semelhante, microrganismos do gênero *Bacillus* têm se destacado como agentes eficazes no controle biológico de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal (ZHANG et al., 2022). As linhagens deste grupo produzem compostos bioativos diversos, como lipopeptídeos e enzimas hidrolíticas, que atuam diretamente na supressão de doenças e na indução de resistência vegetal (WANG et al., 2024; MENG et al., 2024). A aplicação de *Bacillus* como bioinoculantes representa uma alternativa viável e sustentável ao uso de pesticidas químicos, com potencial para o desenvolvimento de bioinsumos inovadores (SALES e RIGOBELLO, 2024; WU et al., 2025).

No processo de seleção e caracterização de linhagens promissoras para formulação de bioinoculantes, ferramentas moleculares têm revolucionado o campo, com destaque para as tecnologias ômicas (genômica, transcriptômica e metabolômica) (PALAZZOTTO e WEBER, 2018; LAVANYA et al., 2025). A obtenção do genoma completo desses microrganismos permite uma identificação precisa em nível de espécie por meio de análises filogenômicas (como TYGs, ANI e MLST), além de viabilizar a descrição de novas espécies, contribuindo para a taxonomia microbiana e para a ampliação do repertório de organismos com potencial biotecnológico (KOMAKI, 2022; MISPELAERE et al., 2024; QI et al., 2024; NOUIOUI et al., 2025).

A integração de abordagens metabolômicas à mineração e prospecção de genomas amplia o potencial de caracterização funcional dos microrganismos, permitindo a identificação de clusters gênicos responsáveis pela produção de metabólitos bioativos como antibióticos,

sideróforos e hormônios vegetais, além de permitir a identificação de enzimas degradadoras de parede celular, podendo ser usadas no controle de patógenos (YE et al., 2022; TANAKA et al., 2024; NGUYEN et al. 2025; OLIVEIRA et al., 2025; NAWAZ et al., 2025). Esses genes e seus produtos funcionam como marcadores moleculares valiosos para discriminação e qualificação das linhagens de alto desempenho agrícola e no direcionamento para aplicações específicas de diversas indústrias (YE et al., 2022).

Diante desse cenário, este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial de linhagens bacterianas dos gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* no controle de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal e produção de compostos bioativos. Para isso, foram definidos três capítulos complementares. O Capítulo I investiga o potencial antagonista *in vitro* de duas linhagens de *Streptomyces* (APUR 32.5 e MPUR 40.3) contra diferentes espécies de *Colletotrichum*, com ênfase no controle pós-colheita de *C. scovillei*, agente da antracnose em pimenta de cheiro, bem como seus efeitos na promoção do crescimento vegetal. O Capítulo II aprofunda-se na caracterização molecular dessas linhagens com base no sequenciamento genômico completo, análises filogenômicas e mineração de clusters gênicos biossintéticos, com destaque para a possível descrição de uma nova espécie (*Streptomyces* APUR 32.5 sp. nov.). Por fim, o Capítulo III amplia o escopo da pesquisa ao avaliar três linhagens de *Bacillus*, sendo dois *B. amoliquefacies* (MPUR 33.1 e MPUR 35.2) e um *B. subtilis* (MPUR 44.1), quanto às suas capacidades antifúngicas e promotoras de crescimento em pimenteira, proporcionando uma abordagem comparativa entre diferentes gêneros bacterianos com potencial biotecnológico para o manejo sustentável dessa cultura de importância econômica.

2. OBJETIVOS:

2.1 GERAL

Investigar o potencial biotecnológico de microrganismos isolados de sedimentos amazônicos, com ênfase em linhagens de *Streptomyces* e *Bacillus*, visando aplicações no biocontrole de fitopatógenos, promoção do crescimento vegetal e produção de compostos bioativos.

2.2 ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1 - Linhagens de *Streptomyces* de Sedimentos Amazônicos como Promotoras de Crescimento de Plantas e Agentes de Biocontrole da Antracnose em Pós-colheita de *Capsicum chinense*

1. Caracterizar morfológica e taxonomicamente linhagens de *Streptomyces* isoladas de sedimentos amazônicos;
2. Investigar o potencial antagonista das linhagens contra espécies de *Colletotrichum*, destacando espectro de ação e possíveis mecanismos de inibição;
3. Verificar a eficácia das linhagens no controle da antracnose pós-colheita em frutos de *Capsicum chinense*;
4. Avaliar o potencial das linhagens de *Streptomyces* na promoção do crescimento de *Capsicum chinense*;
5. Identificar o potencial enzimático das linhagens, com ênfase na produção de enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico;
6. Avaliar a tolerância das linhagens a diferentes condições ambientais, visando determinar sua adaptabilidade e potencial de aplicação em campo.

CAPÍTULO 2 - Análise genômica e química de *Streptomyces* spp. amazônicos: identificação de metabólitos bioativos com potencial biotecnológico

1. Validar a identidade taxonômica das linhagens *Streptomyces* APUR 32.5 (sp. nov.) e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 por meio da análise comparativa do genoma completo;
2. Analisar o potencial biossintético das linhagens *Streptomyces* sp. APUR 32.5 (sp. nov.) e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, com ênfase na predição e caracterização de clusters gênicos biossintéticos (BGCs);

3. Determinar o perfil de metabólitos secundários produzidos pelas linhagens sob diferentes condições de cultivo, visando a otimização da produção;
4. Avaliar a eficácia antifúngica dos metabólitos secundários brutos e purificados contra fitopatógenos agrícolas de relevância econômica;
5. Elucidar a estrutura química dos metabólitos secundários de interesse por meio de análises espectrométricas avançadas (e.g., RMN, EM de alta resolução); (caracterizar o perfil químico dos extratos por meio de análises espectrométricas).
6. Integrar os dados genômicos e os perfis químicos, estabelecendo correlações entre os *clusters* gênicos biossintéticos (BGCs) preditos e os metabólitos secundários estruturalmente elucidados.

CAPÍTULO 3 - Potencial biotecnológico de *Bacillus* spp. amazônicos como bioinoculantes para agricultura sustentável

1. Realizar a análise genômica de três linhagens de *Bacillus* isoladas de sedimentos amazônicos.
2. Identificar genes associados à produção de metabólitos secundários, enzimas hidrolíticas e mecanismos de promoção de crescimento vegetal.
3. Avaliar o potencial antifúngico das linhagens contra fitopatógenos de importância agrícola.
4. Caracterizar o perfil enzimático das linhagens e sua relação com o potencial de biocontrole.
5. Verificar os efeitos das linhagens na promoção do crescimento de *Capsicum chinense*.
6. Avaliar a eficácia das linhagens no controle pós-colheita de doenças em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*).

CAPÍTULO I - Linhagens de *Streptomyces* isoladas de sedimentos amazônicos como promotoras do crescimento vegetal e agentes de biocontrole da antracnose em pós-colheita de *Capsicum chinense*

RESUMO

Doenças pós-colheita representam um desafio crítico para a agricultura global, resultando em perdas econômicas substanciais e ameaçando a segurança alimentar mundial. Espécies do gênero *Colletotrichum* destacam-se entre os principais fitopatógenos por serem responsáveis por até 40% das perdas pós-colheita em diversas culturas, incluindo espécies de *Capsicum*. Este estudo avaliou a atividade antifúngica de duas estirpes de *Streptomyces* isoladas de sedimentos amazônicos contra diferentes espécies de *Colletotrichum*, com foco em *C. scovillei*, o agente causal da antracnose em frutos de *Capsicum chinense*. Análises filogenéticas multilocus indicaram que a estirpe APUR 32.5 possivelmente representa uma nova espécie, enquanto MPUR 40.3 foi identificada como *Streptomyces murinus*. Ambas as estirpes exibiram atividade antifúngica *in vitro* contra sete espécies de *Colletotrichum*, com porcentagens de inibição variando de 56,3% a 88,6%. Em bioensaios com frutos, *S. murinus* MPUR 40.3 reduziu a incidência de antracnose em 95%, enquanto *Streptomyces* sp. APUR 32.5 alcançou uma redução de 39,25%. A microscopia eletrônica de varredura revelou mecanismos complementares de ação antifúngica, com MPUR 40.3 atuando durante os estágios iniciais da infecção por meio da lise do tubo germinativo, enquanto APUR 32.5 teve como alvo estruturas miceliais estabelecidas por meio da degradação hifal. Adicionalmente, ambas as estirpes demonstraram capacidade de promoção do crescimento de plantas e exibiram características biotecnologicamente relevantes, incluindo produção de enzimas hidrolíticas, sideróforos e capacidade de solubilização de fosfato. Esses resultados destacam a promessa biotecnológica desses isolados amazônicos como agentes multifuncionais para o manejo sustentável da antracnose em pimentas *Capsicum*.

Palavras-chave: biocontrole; *Streptomyces*; *Colletotrichum scovillei*; agricultura sustentável; bacia amazônica

ABSTRACT

Postharvest diseases represent a critical challenge for global agriculture, resulting in substantial economic losses and threatening worldwide food security. Species of the genus *Colletotrichum* stand out among the main phytopathogens for being responsible for up to 40% of postharvest losses in various crops, including *Capsicum* species. This study evaluated the antifungal activity of two *Streptomyces* strains isolated from Amazonian sediments against different *Colletotrichum* species, with a focus on *C. scovillei*, the causal agent of anthracnose

in *Capsicum chinense* fruits. Multilocus phylogenetic analyses indicated that strain APUR 32.5 possibly represents a new species, while MPUR 40.3 was identified as *Streptomyces murinus*. Both strains exhibited in vitro antifungal activity against seven *Colletotrichum* species, with inhibition percentages ranging from 56.3% to 88.6%. In fruit bioassays, *S. murinus* MPUR 40.3 reduced the incidence of anthracnose by 95%, while *Streptomyces* sp. APUR 32.5 achieved a 39.25% reduction. Scanning electron microscopy revealed complementary mechanisms of antifungal action, with MPUR 40.3 acting during the early infection stages through germination tube lysis, while APUR 32.5 targeted established mycelial structures through hyphal degradation. Additionally, both strains demonstrated plant growth-promoting capacity and exhibited biotechnologically relevant characteristics, including production of hydrolytic enzymes, siderophores, and phosphate solubilization ability. These results highlight the biotechnological promise of these Amazonian isolates as multifunctional agents for the sustainable management of anthracnose in *Capsicum* peppers.

Keywords: biological control; *Streptomyces*; *Colletotrichum scovillei*; sustainable agriculture; amazon basin

1. INTRODUÇÃO

As doenças pós-colheita representam uma séria ameaça à segurança alimentar global, ocasionando perdas anuais superiores a 1,3 bilhão de toneladas e gerando aproximadamente US\$ 200 bilhões em prejuízos econômicos em escala mundial [1,2]. Em países em desenvolvimento, onde a infraestrutura de armazenamento e o manejo fitossanitário são frequentemente insuficientes, as reduções de produtividade podem atingir 78% em frutas, 54% em hortaliças e 32% em cereais, afetando diretamente a subsistência dos agricultores e a disponibilidade de alimentos [3,4]. Nesse cenário, os fitopatógenos configuram um dos principais fatores limitantes da produção agrícola global, sendo responsáveis por perdas estimadas entre 30% e 40% do rendimento potencial das culturas.

O gênero *Colletotrichum* inclui diversas espécies fitopatogênicas capazes de causar doenças antes e após a colheita, afetando um amplo espectro de plantas de relevância econômica [5–7]. Esses patógenos apresentam mecanismos genéticos que favorecem a seleção de genótipos resistentes sob pressão de fungicidas, o que dificulta o controle a longo prazo [8–10]. A aplicação contínua e intensiva de fungicidas exerce forte pressão seletiva direcional, constituindo um dos maiores entraves para o manejo sustentável e evidenciando a necessidade de estratégias integradas que reduzam o desenvolvimento de resistência, sem comprometer a eficácia das medidas de controle [11].

A antracnose destaca-se entre as doenças mais devastadoras que acometem a cultura da pimenta (*Capsicum* spp.) em regiões tropicais e subtropicais, ocasionando prejuízos expressivos tanto no campo quanto durante o armazenamento pós-colheita [12]. Entre as espécies do complexo, *Colletotrichum scovillei* é atualmente reconhecida como o principal agente causal dessa doença em cultivares de pimenta. Embora seu primeiro registro oficial no Brasil date de 2014, evidências recentes indicam subnotificação sistemática da sua ocorrência em importantes regiões produtoras [13,14]. Esse quadro é agravado pela crescente detecção de isolados com sensibilidade reduzida a fungicidas, resultado do uso intensivo de compostos químicos [12,15]. Assim, o atual cenário epidemiológico, marcado pela ampla distribuição do patógeno e pela emergência de populações resistentes, reforça a urgência no desenvolvimento de estratégias alternativas, eficazes e ambientalmente sustentáveis para o manejo da antracnose [16].

Entre os agentes microbianos com potencial para o manejo sustentável de doenças de plantas, destacam-se bactérias do gênero *Streptomyces*, reconhecidas por sua elevada

capacidade biossintética e pela versatilidade ecológica. Essas espécies produzem vastos repertórios de metabólitos secundários bioativos e enzimas extracelulares com ação antimicrobiana, respondendo por cerca de 75% a 80% dos compostos naturais utilizados comercialmente, incluindo mais de 100.000 antibióticos descritos [17,18]. A identificação de 279 novos metabólitos naturais entre 2015 e 2020 reforça o potencial do gênero como fonte de inovação biotecnológica para a agricultura [18].

Além da atividade antimicrobiana, *Streptomyces* desempenha funções essenciais na promoção do crescimento vegetal e na manutenção da saúde do solo, contribuindo para processos como ciclagem de nutrientes, decomposição de resíduos orgânicos complexos e produção de biofertilizantes [19–22]. Sua multifuncionalidade é evidenciada por produtos comerciais já consolidados, como os biofungicidas baseados em *S. griseoviridis* e *S. lydicus* [23,24].

Considerando o uso crescente de agroquímicos e os impactos ambientais associados, torna-se imperativo desenvolver alternativas sustentáveis que possam ser incorporadas de forma eficiente às práticas agrícolas [1,2,14]. Nesse contexto, a Bacia Amazônica, reconhecida como um dos maiores “hotspots” de biodiversidade do planeta, apresenta condições ecológicas singulares que favorecem a evolução de microrganismos com elevada diversidade metabólica. Essas pressões seletivas podem estimular linhagens de *Streptomyces* a produzirem compostos inéditos e altamente potentes, com potencial aplicação no controle de fitopatógenos [25,26].

Dessa forma, formulamos a hipótese de que linhagens de *Streptomyces* isoladas de sedimentos amazônicos subexplorados apresentam mecanismos de biocontrole distintos ou aprimorados, bem como capacidades superiores de promoção de crescimento vegetal. Esses atributos podem representar alternativas promissoras para o manejo sustentável de fitopatógenos como *Colletotrichum scovillei*.

O presente estudo avaliou a atividade antifúngica e as propriedades promotoras de crescimento vegetal de duas linhagens amazônicas de *Streptomyces* (APUR 32.5 e MPUR 40.3) contra espécies de *Colletotrichum*, com ênfase em *C. scovillei*, agente etiológico predominante da antracnose em frutos de pimenta após a colheita. Para isso, foram conduzidos ensaios antifúngicos *in vitro*, testes de biocontrole pós-colheita em frutos de *Capsicum chinense*, análises mecanísticas por microscopia eletrônica de varredura e avaliações do potencial de promoção de crescimento vegetal. Características de interesse biotecnológico, como produção de enzimas hidrolíticas, secreção de sideróforos, solubilização de fosfato e versatilidade

ecofisiológica, também foram investigadas, visando uma caracterização abrangente das linhagens estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e Isolamento

A coleta de amostras foi realizada em dezembro de 2018, a partir de sedimentos do rio Purus, localizado na margem direita do rio Amazonas, no estado do Amazonas, Brasil. A partir dessas amostras, o isolamento foi conduzido utilizando a técnica de diluição seriada na concentração de 10^{-3} . A inoculação foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura AIA ou ISP2 (Tabela S1), suplementados com ácido nalidíxico (50 µg/mL) e cicloheximida (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 28 °C por 7 a 15 dias. Para obtenção de culturas puras, empregou-se a técnica de estriamento. O isolado APUR 32.5 (*Streptomyces* sp., 06°39'54.0" S, 064°33'36.5" W, 5,5 m de profundidade) foi obtido em meio AIA, enquanto o isolado MPUR 40.3 (*Streptomyces* sp., 05°39'31.9" S, 063°38'53.7" W, 4,5 m de profundidade) foi isolado em meio ISP2. Ambos integram atualmente a coleção microbiológica do Laboratório Amazon MicroBiotech – Embrapa Amazônia Ocidental, preservados em glicerol a 15% (v/v) e mantidos a -80 °C [27].

2.2. Caracterização morfológica

As características fenotípicas dos isolados foram avaliadas em diferentes meios de cultura (Tabela S1), em pH 7 e temperatura controlada de 28 °C. Os parâmetros analisados incluíram crescimento das colônias, formação de hifas aéreas, desenvolvimento de micélio vegetativo e produção de pigmentos solúveis. As observações foram realizadas durante um período de 10 dias, seguindo os protocolos estabelecidos pelo *International Streptomyces Project* [28]. A intensidade do crescimento foi classificada conforme o desenvolvimento morfológico: crescimento ótimo (+++), com micélio vegetativo abundante e formação de hifas aéreas ao longo de toda a linha de inoculação; crescimento moderado (++) , com formação parcial de micélio aéreo; crescimento reduzido (+), caracterizado pela predominância de micélio vegetativo e ausência ou escassez de hifas aéreas; e ausência de crescimento (-).

2.3. Extração de DNA

Os isolados foram cultivados por 4 dias em tubos Falcon de 50 mL contendo 20 mL de meio ISP2 líquido, sob agitação a 180 rpm e 28 °C. A extração do DNA total foi realizada utilizando detergente catiônico CTAB a 2% [29]. A quantificação do DNA foi feita por

espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v).

2.4 Amplificação da PCR

As reações de PCR foram conduzidas utilizando cinco pares de primers direcionados às sequências parciais dos genes *atpD* (subunidade beta da ATP sintase F1), *gyrB* (subunidade B da DNA girase), *trpB* (subunidade beta da triptofano sintase), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase) e *recA* (recombinase A). As sequências dos primers e suas temperaturas de anelamento estão descritas na Tabela S2. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, composto por 2,5 µL de tampão EasyTaq® 10X (TransGen Biotech), 10 µM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase EasyTaq®, 0,5 µM de cada primer, 1 µL de DNA total (50 ng) e água destilada esterilizada para completar o volume. As condições de amplificação compreenderam: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 15 s, anelamento específico por 30 s e extensão a 72 °C por 1,5 min; e extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio, e registrados em sistema de imagem molecular (Locus Biotechnology L-Pix Chemi, São Paulo, Brasil). O peso molecular foi comparado ao marcador 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

2.5 Sequenciamento do genoma completo

Os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP-IT (Applied Biosystems, 15819906, Foster City, CA, EUA). Para isso, 5 µL do produto de PCR foram incubados com 2 µL de ExoSAP-IT a 37 °C por 15 min, seguidos da inativação enzimática a 80 °C por 15 min. Os produtos purificados foram utilizados na reação com BigDye Terminator v3.1 em volume total de 10 µL, contendo 2 µL de água ultrapura, 1,5 µL de tampão 5X, 0,5 µL de BigDye, 1 µL de cada primer e 5 µL dos produtos de PCR. As condições de ciclismo foram: 96 °C por 60 s; 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. As reações foram analisadas por eletroforese capilar em analisador genético 3500 (Thermo Fisher).

2.6 Análise filogenética

As sequências consenso foram obtidas por inspeção manual dos eletroferogramas. Com base no conjunto de dados gerado [30], foram recuperadas sequências do gene *atpD* de 335 linhagens de *Streptomyces*, permitindo a construção de árvore filogenética por neighbor-joining para identificação de espécies relacionadas aos isolados APUR 32.5 e MPUR 40.3. A matriz multilocus final incluiu 40 linhagens de *Streptomyces* e os dois isolados deste estudo (Tabela

S3). As sequências de cada locus foram alinhadas individualmente no MAFFT e posteriormente concatenadas manualmente. O arquivo foi submetido ao IQ-TREE para análise de máxima verossimilhança (ML) com 1000 pseudorreplicações. A topologia final foi visualizada no iTOL e editada manualmente no software CorelDRAW 2020.

2.7 Atividade antifúngica *in vitro*

A capacidade inibitória dos *Streptomyces* frente a sete espécies de *Colletotrichum* foi avaliada por pareamento em cultura dupla [31]. Discos de micélio (0,8 cm de diâmetro) dos fitopatógenos foram posicionados no centro de placas contendo PDA, e estrias dos isolados foram realizadas lateralmente, a 2 cm das bordas. As placas foram incubadas a 28 °C. Os fitopatógenos utilizados pertencem à coleção microbiológica da Embrapa Amazônia Ocidental (Tabela S4). Os ensaios foram conduzidos em triplicata, e a inibição foi calculada após 15 dias utilizando: $\% \text{ inibição} = \left[\frac{C-T}{C} \right] \times 100$, onde C = média do controle e T = média do tratamento. O controle positivo consistiu apenas do fitopatógeno no meio de cultura.

2.8. Atividade de Biocontrole Pós-Colheita

2.8.1. Preparo dos Frutos e Inóculo do Patógeno

Frutos de *Capsicum chinense* foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% por 5 min, lavados três vezes em água destilada estéril e rapidamente imersos em etanol 70%. O inóculo de *C. scovillei* foi obtido de culturas de 3 dias em meio batata-dextrose. Os conídios foram suspensos em água destilada estéril e ajustados para 10⁸ conídios/mL em câmara de Neubauer.

2.8.2. Preparo e Padronização da Suspensão de Esporos de *Streptomyces*

Os isolados foram cultivados em ISP2 por 7 dias a 28 °C. Os esporos foram raspados do ágar e suspensos em água destilada estéril. A suspensão foi padronizada para 10⁸ UFC/mL a partir da leitura de OD 0,1 a 600 nm [32].

2.8.3. Inoculação e Tratamentos

Os frutos foram inicialmente inoculados por imersão por 5 s na suspensão de *C. scovillei* (10⁸ conídios/mL) e incubados por 24 h a 28 °C. Em seguida, foram imersos por 5 s na suspensão de *Streptomyces* (10⁸ UFC/mL).

2.8.4. Controle e Avaliação

Foram utilizados controles negativo (água estéril) e positivo (apenas patógeno). Após 7 dias a 28 °C, calcularam-se o índice de doença (ID) e a eficiência de controle (EC):

$$ID (\%) = (\text{área lesionada} / \text{área total do fruto}) \times 100$$

$EC (\%) = [(IC - IT) / IC] \times 100$, em que IC = índice do controle positivo e IT = índice do tratamento. O experimento foi conduzido em triplicata, com 10 frutos por repetição.

2.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos *Streptomyces* e suas interações antagônicas com *C. scovillei* foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-IT500HR). Para análise morfológica, microculturas foram crescidas em ISP2 e incubadas por 5 dias. Após 7 dias, interações in vitro e pós-colheita foram avaliadas removendo-se fragmentos das margens ativas das colônias. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4%, desidratadas em série crescente de etanol (30% a 100%), com repetição no etanol absoluto. A secagem ocorreu em ponto crítico (Leica EM CPD300) e as amostras foram metalizadas com ouro para obtenção das imagens.

2.10. Avaliação de Mecanismos de Promoção de Crescimento

2.10.1. Solubilização de Fosfato e Produção de Sideróforos

A solubilização de $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$ e $FePO_4$ e a produção de sideróforos foram avaliadas em meios seletivos (Tabela S5). As placas foram incubadas por 5 dias a 28 °C, e a atividade foi inferida pela formação de halos ao redor das colônias. Ensaios conduzidos em triplicata [33].

2.10.2. Produção de Enzimas Extracelulares

A produção de amilase, celulase, quitinase, lipase e protease foi avaliada por meio do índice enzimático (IE) em meios diferenciais (Tabela S6). Os isolados foram incubados por 7 dias a 25, 30 e 35 °C, e pH 4, 7 e 10. O IE foi calculado como:

$$IE = dh/dc,$$

em que dh = diâmetro do halo e dc = diâmetro da colônia [34]. Ensaios realizados em triplicata.

2.10.3. Tolerância a pH e Temperatura

A tolerância foi avaliada em ISP2 ajustado para pH 6, 7 e 8, incubado a 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C. O crescimento foi monitorado ao longo de 7 dias, conforme metodologia descrita na Seção 2.2.

2.11. Promoção de Crescimento em *Capsicum chinense*

2.11.1. Preparo e Cultivo das Plantas

As sementes foram esterilizadas em etanol 70% (2 min), hipoclorito de sódio 2% (5 min) e lavadas quatro vezes com água estéril. Foram semeadas em bandejas e cultivadas por 30 dias, sendo posteriormente transplantadas para vasos de 1000 mL contendo substrato Vivato Plus. A irrigação foi realizada duas vezes ao dia. A cada 20 dias, adicionou-se 50 mL da solução nutritiva de Sarruge [34].

2.11.2. Preparo e Aplicação do Inóculo

As linhagens foram cultivadas por 5 dias em ISP2 líquido a 28 °C e 120 rpm. A suspensão bacteriana foi padronizada para 10^8 UFC/mL (OD 0,1 a 600 nm). Sete dias após o transplante, 20 mL da suspensão foram aplicados diretamente ao solo.

2.11.3. Delineamento Experimental e Avaliação

O experimento incluiu tratamentos com APUR 32.5, MPUR 40.3 e controle, com 10 vasos por tratamento. As plantas controle receberam 20 mL de ISP2 estéril. No 75º dia após o transplante, avaliou-se comprimento da parte aérea, do sistema radicular e massa seca, após secagem a 50 °C até peso constante [34].

2.12. Análise Estatística

Os dados dos ensaios de antagonismo (*in vitro* e *in planta*), análises enzimáticas e testes de promoção de crescimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no software R v4.1.3 (R Core Team, 2022). Para comparação de médias, aplicou-se o teste Scott-Knott para antagonismo *in vitro* e o teste de Dunn para pós-colheita. Adotou-se nível de significância de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Aspectos Morfológicos e Identificação Molecular

3.1.1. Caracterização Morfológica

Os isolados *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 foram caracterizados em doze meios de cultura distintos e apresentaram características morfológicas típicas do gênero *Streptomyces*. Variações fenotípicas foram observadas em função do meio de cultivo utilizado (Figura 1A, B).

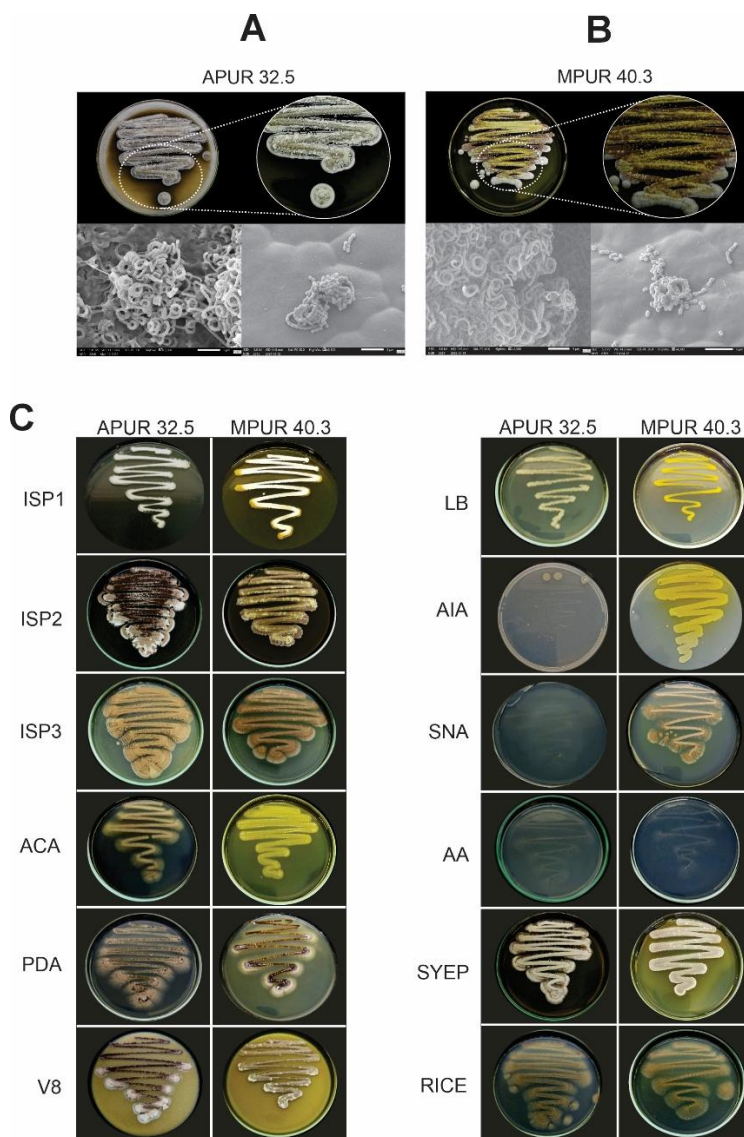


Figura 1. Características morfológicas e micromorfológicas dos isolados de *Streptomyces* em diferentes meios de cultivo. (A) Aspecto colonial macroscópico de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 cultivado em meio ISP2 (pH 7, 40

°C, 7 dias) e sua micromorfologia correspondente (cadeias de esporos espiraladas com esporos cúbicos e enrugados). (B) Aspecto colonial macroscópico de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 cultivado em meio ISP2 (pH 7, 30 °C, 7 dias) e sua micromorfologia correspondente (micélio vegetativo e aéreo bem desenvolvido, formando cadeias de esporos em espiral fechada, com esporos cúbicos e lisos). (C) Visão comparativa das características morfológicas dos isolados *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 cultivados em doze diferentes meios de cultura após 7 dias de incubação a 28 °C, evidenciando variações na coloração micelial e na produção de pigmentos difusíveis.

Para o isolado *Streptomyces* sp. APUR 32.5, o crescimento ótimo (+++) foi registrado nos meios ISP2, ISP3, SYEP, V8 e ágar arroz. Crescimento moderado (++) foi observado em ISP1, ACA e PDA, enquanto crescimento limitado (+) ocorreu nos meios LB, SNA, AA e AIA. A coloração do micélio colonial variou predominantemente entre branco e marrom. Notavelmente, um pigmento difusível preto foi produzido especificamente no meio SYEP. A análise microscópica do isolado APUR 32.5 revelou cadeias de esporos em espiral, cujos esporos apresentaram forma cúbica, superfície enrugada e tamanho aproximado de 0,13 µm (Figura 1A, B).

O isolado *S. murinus* MPUR 40.3 apresentou crescimento ótimo (+++) nos meios ISP2, ISP3, V8, SYEP, SNA e ágar arroz. Crescimento moderado (++) foi observado em ISP1 e PDA, e crescimento limitado (+) em ACA, LB, AIA e AA. Uma característica marcante de MPUR 40.3 foi a proeminente produção de um pigmento difusível amarelo em oito dos doze meios testados (ISP1, ISP2, ACA, PDA, LB, AIA, V8 e SYEP). O micélio aéreo exibiu colorações variadas — incluindo tonalidades marrom, amarela, lilás e branca — dependendo do meio de cultivo. A avaliação microscópica revelou micélio vegetativo e aéreo bem desenvolvidos, formando cadeias de esporos em espiral fechada, com esporos cúbicos, superfície lisa e tamanho aproximado de 0,15 µm (Figura 1A, B).

3.1.2. Identificação Molecular e Análise Filogenética

A identificação molecular dos isolados foi realizada por meio de análise filogenética multilocus baseada no alinhamento concatenado de cinco genes constitutivos (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*) de 40 espécies de *Streptomyces* filogeneticamente próximas a APUR 32.5 e MPUR 40.3. O alinhamento final totalizou 2529 caracteres, incluindo lacunas, distribuídos entre os genes *atpD* (496 pb), *gyrB* (417 pb), *recA* (504 pb), *rpoB* (541 pb) e *trpB* (541 pb).

Os modelos evolutivos mais adequados aos dados segundo o critério AIC foram GTR + F + I + G4 para os genes *atpD*, *recA* e *trpB*; GTR + F + G4 para *gyrB*; e K3Pu + F + I + G4 para *rpoB*. A árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança, com 1000 réplicas de

bootstrap, revelou que o isolado MPUR 40.3 se agrupa com alto suporte (99% bootstrap) no clado que inclui *S. murinus* DSM 40091^T, confirmando sua identificação como pertencente a essa espécie (Figura 2).

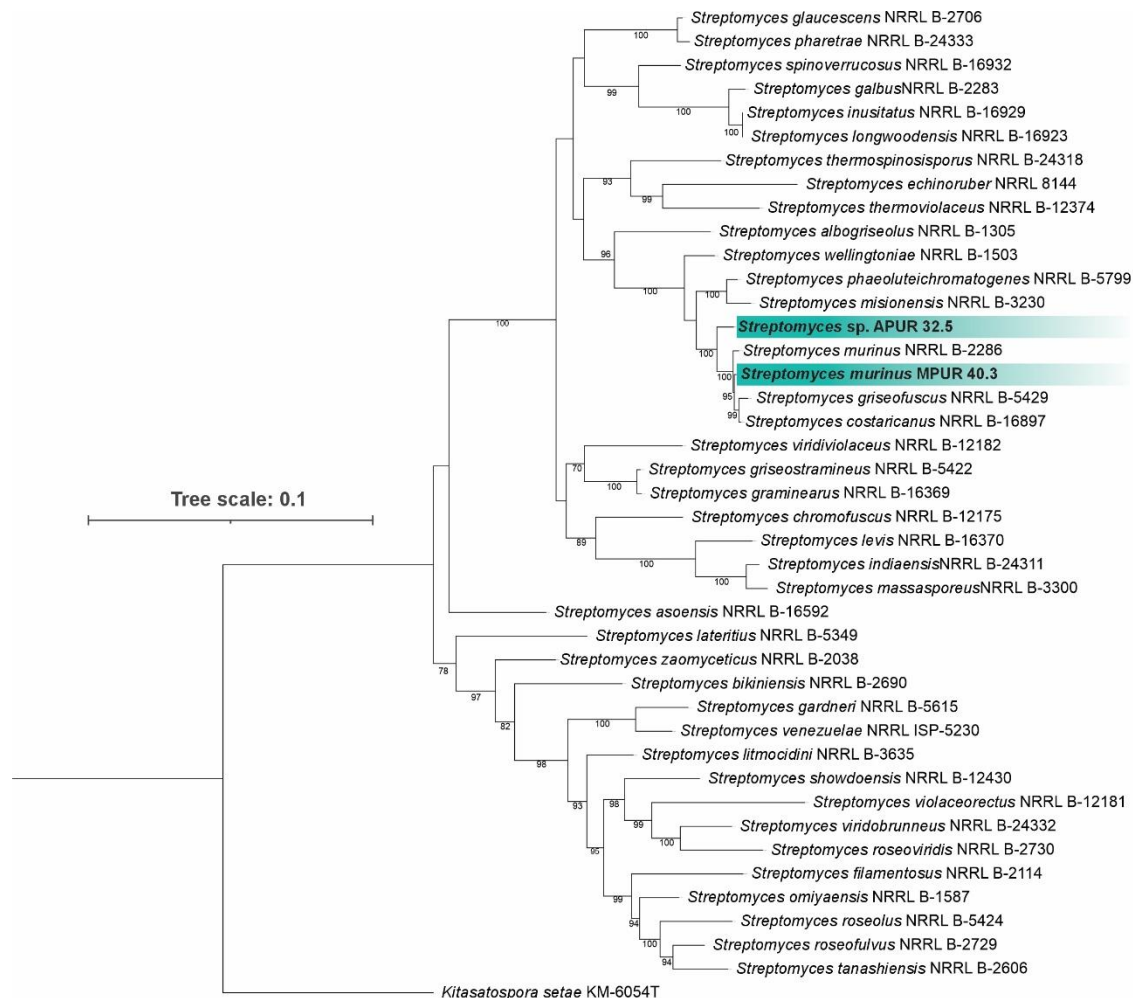


Figura 2. Árvore filogenética baseada na análise multilocus (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*) de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 (destacados em verde) e espécies relacionadas. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, com 1000 réplicas de bootstrap, empregando *Kitasatospora setae* KM-6054^T como grupo externo (*outgroup*). Os números nos nós indicam os valores de suporte de bootstrap (%).

O isolado APUR 32.5 formou um ramo distinto, embora próximo ao clado que inclui *S. murinus*, *S. griseofuscus* e *S. costaricanus* (atualmente considerados sinônimos heterotípicos de *S. murinus*), sugerindo que esse isolado representa uma possível nova espécie para o gênero.

3.2. Atividade Antifúngica

Os resultados indicaram que ambas as linhagens de *Streptomyces* apresentaram atividade antifúngica contra as sete espécies de *Colletotrichum* analisadas, com percentuais de inibição variando entre 56,3% e 88,6% (Figura 3A,B). *Streptomyces* sp. APUR 32.5 apresentou os maiores índices de inibição contra *C. guaranicola* (INPA 2939), atingindo $86,7 \pm 0,2\%$; *Colletotrichum* sp. (INPA 2973), com $83,3 \pm 0,17\%$; e *C. brevisporum* (INPA 2787), com $75,6 \pm 0,1\%$. Por sua vez, *S. murinus* MPUR 40.3 demonstrou maior eficiência na inibição do crescimento micelial de *C. guaranicola* (INPA 2939), com $88,5 \pm 0,05\%$; *C. scovillei* (INPA 2910), com $85,6 \pm 0,43\%$; e *Colletotrichum* sp. (INPA 2973), com $85,2 \pm 0,3\%$ (Figura 3B). Todos os isolados testados apresentaram percentuais de inibição superiores a 50%, confirmando o amplo espectro de ação dessas linhagens contra as espécies avaliadas.

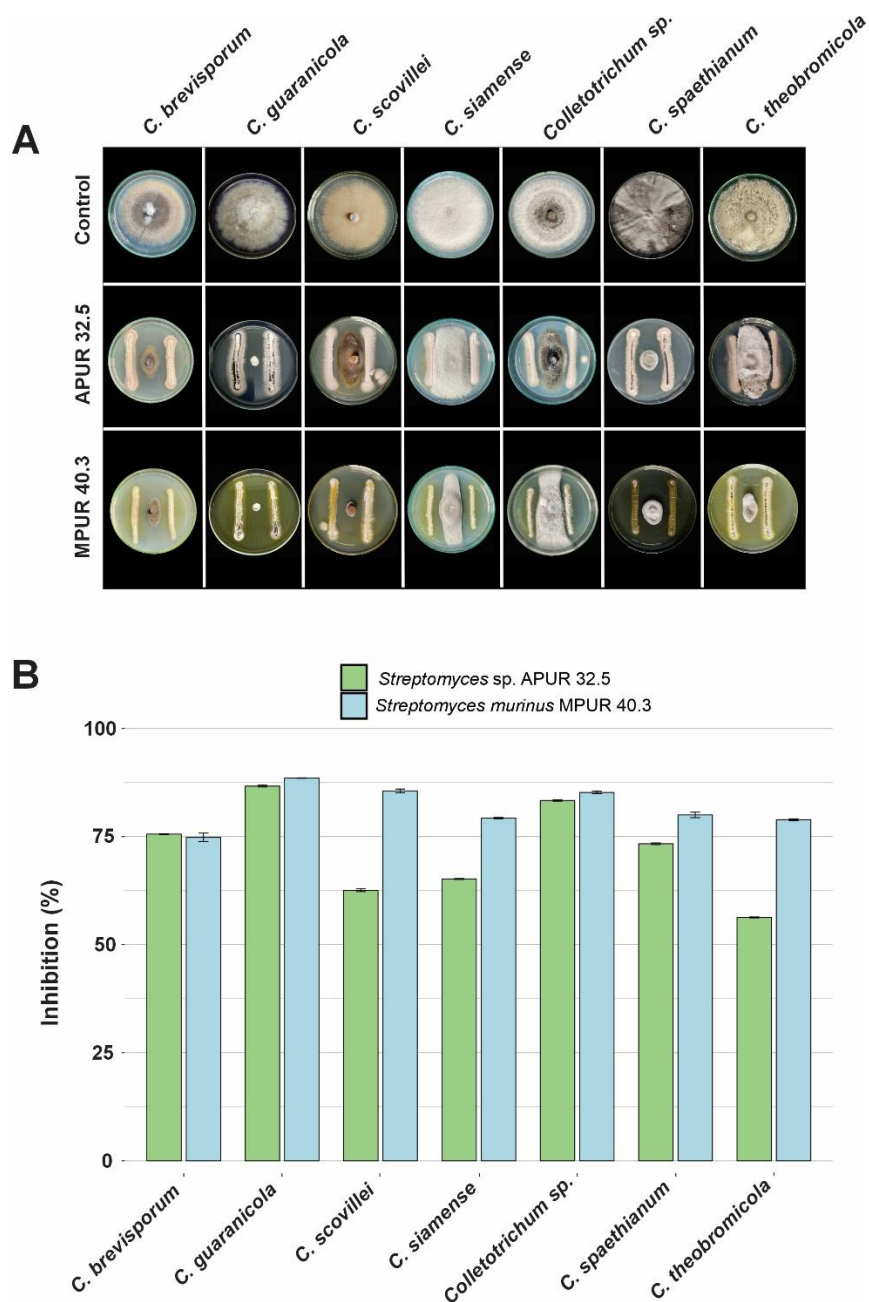


Figura 3. Atividade antifúngica in vitro de isolados de *Streptomyces* contra espécies de *Colletotrichum*. (A) Imagens representativas dos ensaios de antagonismo direto em placas de Petri, evidenciando a inibição do crescimento micelial de sete espécies de *Colletotrichum* pelos isolados *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) dos fitopatógenos testados após 7 dias de cultivo a 28 °C. As barras indicam os valores médios, e as barras de erro representam o desvio-padrão de três repetições.

As análises por microscopia eletrônica de varredura revelaram os efeitos morfológicos diferenciais das linhagens de *Streptomyces* sobre as estruturas de *C. scovillei*. As culturas-controle contendo apenas o fitopatógeno (Figura 4A–C) apresentaram redes hifais íntegras, com

diâmetro uniforme e superfície lisa. Nas culturas duais com *Streptomyces* sp. APUR 32.5 (Figura 4D–F), as hifas de *C. scovillei* exibiram alterações morfológicas que parecem estar associadas à proximidade com a zona de interação. As hifas mais próximas das colônias bacterianas apresentaram rupturas da parede celular e afinamento irregular (seta amarela, Figura 4E), enquanto aquelas em regiões mais distantes mantiveram morfologia relativamente normal (seta vermelha, Figura 4E), sugerindo um efeito concentração-dependente dos compostos difusíveis.

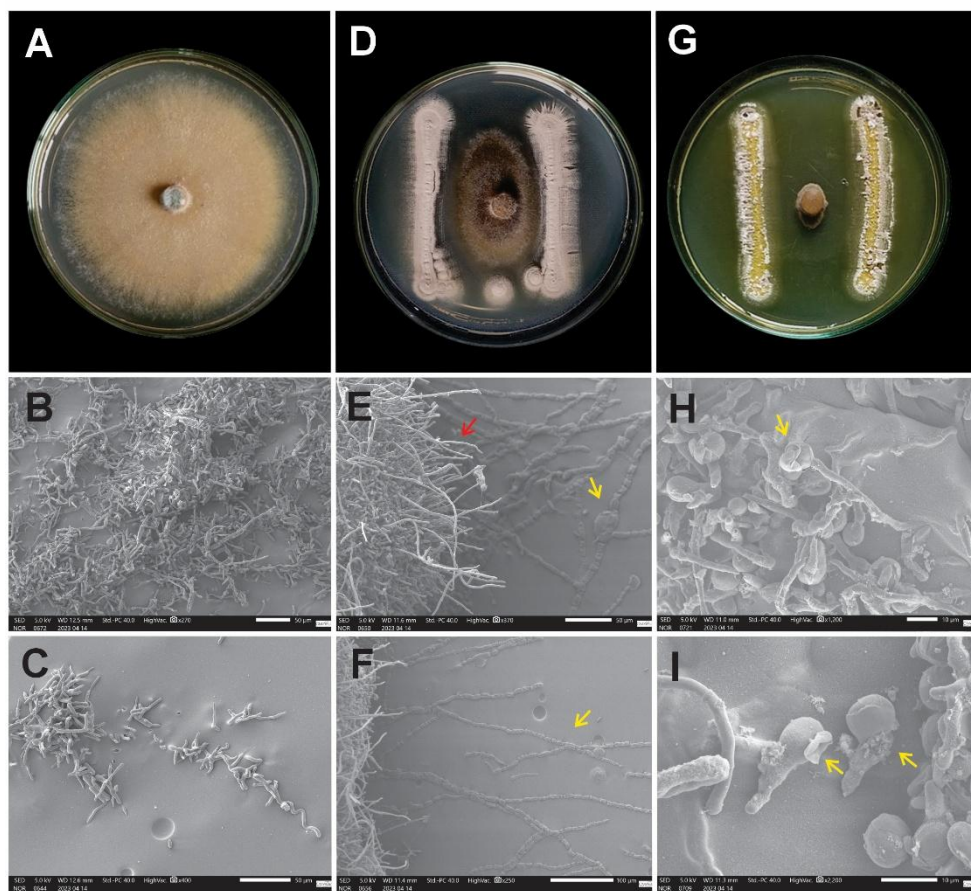


Figura 4. Imagens da interação entre *Streptomyces* spp. e *Colletotrichum scovillei* obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A–C) Controle: cultura pura de *C. scovillei* apresentando crescimento normal e micélio com estruturas preservadas, hifas contínuas, de diâmetro uniforme e superfície lisa. (D–F) Interação entre *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *C. scovillei*: são evidentes as alterações morfológicas no micélio do fitopatógeno, com afinamento irregular das hifas e ruptura da parede celular (seta amarela), enquanto algumas hifas mantêm morfologia semelhante ao controle (seta vermelha). (G–I) Interação entre *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 e *C. scovillei*: observa-se lise celular dos conídios de *C. scovillei* durante a fase de germinação, resultando em colapso estrutural (setas amarelas) e inibição da germinação. Barras de escala estão indicadas nas imagens de MEV.

Co-cultivos com *S. murinus* MPUR 40.3 (Figura 4G–I) exibiram padrões morfológicos distintos, com conídios de *C. scovillei* apresentando colapso estrutural e sinais evidentes de lise (Figura 4H,I). Embora os padrões de dano tenham diferido daqueles observados para APUR 32.5, essas observações indicam que ambos os isolados inibem o fitopatógeno por meio de antibiose. Essa inferência é corroborada pela ausência de contato direto entre o antagonista e as estruturas fúngicas, associada à presença de fatores difusíveis capazes de provocar perturbações celulares visíveis. Embora não seja possível identificar, a partir das imagens de MEV, os metabólitos específicos responsáveis por tais efeitos, os resultados demonstram claramente que MPUR 40.3 exerce um efeito inibitório mais pronunciado, impedindo que as hifas fúngicas se aproximem da colônia bacteriana.

3.3. Efeito dos isolados de *Streptomyces* no controle de *Colletotrichum scovillei* em frutos de *Capsicum chinense*

3.3.1. Avaliação da incidência da doença

Após sete dias de incubação (a 28 °C), os frutos do controle negativo (tratados com água estéril) permaneceram completamente sadios, com superfície íntegra e ausência de qualquer sinal de colonização microbiana, conforme confirmado pela MEV (Figura 5A–E). Em contraste, os frutos do controle positivo (inoculados apenas com *C. scovillei* INPA 2010) desenvolveram sintomas severos de antracnose (Figura 5B), caracterizados por lesões necróticas deprimidas e abundante esporulação, alcançando um índice de doença de 97,79% (Figura 5F).

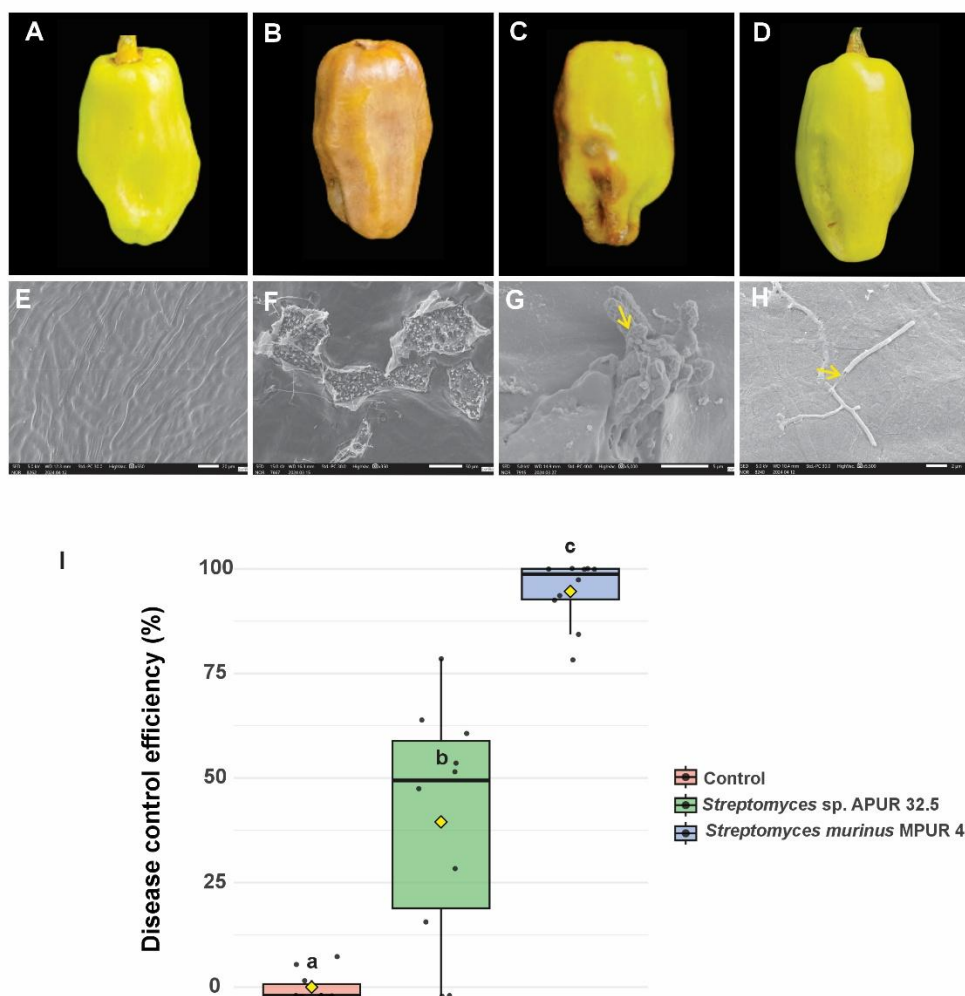


Figura 5. Avaliação da interação entre *Streptomyces* e *Colletotrichum scovillei* em frutos de pimenta e análise ultraestrutural das superfícies dos tecidos infectados. Imagens macroscópicas dos frutos: (A–E) Controle negativo, mostrando o epicarpo íntegro do fruto. (B–F) Controle positivo, evidenciando colonização fúngica e ruptura da superfície do fruto. (C–G) Fruto tratado com *Streptomyces* sp. APUR 32.5, apresentando redução das lesões e aderência de esporos do antagonista aos conídios do patógeno (seta amarela indicando esporos de *Streptomyces*). (D–H) Fruto tratado com *S. murinus* MPUR 40.3, com preservação dos tecidos e colapso estrutural das hifas de *C. scovillei* (seta amarela indicando micélio rompido). (I) Boxplot mostrando a eficiência (%) no controle da doença nos diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

A aplicação dos agentes de biocontrole resultou em proteção significativa, embora com eficiência distinta entre as linhagens. Os frutos tratados com *S. murinus* MPUR 40.3 apresentaram elevada proteção, com índice de infecção de apenas 4,86%, correspondendo a 95% de eficiência de controle em relação ao grupo controle positivo (Figura 5D–H). Os frutos tratados com *Streptomyces* sp. APUR 32.5 exibiram proteção intermediária, com incidência da

doença de 49,41% (Figura 5C–G).

A análise estatística confirmou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos, demonstrando o desempenho superior de *S. murinus* MPUR 40.3 como agente de biocontrole (Figura 5I). Importante destacar que controles adicionais, nos quais os frutos foram tratados exclusivamente com as linhagens de *Streptomyces* (sem o patógeno), não apresentaram alterações morfológicas nem danos teciduais.

3.3.2. Análise Ultraestrutural das Interações Patógeno–Antagonista

A microscopia eletrônica de varredura permitiu elucidar os mecanismos de ação dos antagonistas e sua interação com o patógeno nos tecidos do hospedeiro. Nos frutos do controle positivo, a MEV revelou danos severos na superfície tecidual, com extensa colonização fúngica e ruptura da integridade celular (Figura 5D). Em maiores ampliações, observaram-se hifas do patógeno penetrando ativamente nos tecidos do fruto (Figura 5C, seta amarela), caracterizando o processo infeccioso típico da antracnose.

Nos frutos tratados com *Streptomyces* sp. APUR 32.5, as lesões nas superfícies dos tecidos vegetais foram menos intensas e menos extensas em comparação ao controle positivo, embora ainda fossem observáveis danos ao fruto. As micrografias evidenciaram interação direta entre o antagonista e o patógeno, com esporos de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 aderidos aos conídios (Figura 5E, seta amarela indicando conídio com esporos de *Streptomyces* em sua superfície), confirmando o contato físico entre os microrganismos. Entretanto, alguns conídios apresentaram alterações morfológicas com aparente comprometimento da integridade da parede celular (Figura 5F, seta amarela), sugerindo que a linhagem de *Streptomyces* pode também produzir compostos capazes de danificar a parede celular do fitopatógeno.

O tratamento com *S. murinus* MPUR 40.3 resultou em proteção significativamente superior, com a superfície tecidual do fruto predominantemente preservada. Embora a análise macroscópica tenha revelado sintomas mínimos, a MEV detectou pequenas lesões localizadas, provavelmente decorrentes do período inicial de 24 horas de exposição ao patógeno antes da aplicação do antagonista. Nas áreas de interação, observaram-se alterações morfológicas nas hifas de *C. scovillei*, caracterizadas por desestruturação e desintegração micelial (Figura 5H, seta amarela), demonstrando a forte atividade antifúngica direta de *S. murinus* MPUR 40.3.

Esses resultados ultraestruturais corroboram os dados obtidos nos ensaios in vitro (Seção 3.2), nos quais *S. murinus* MPUR 40.3 também demonstrou maior atividade antagonista contra *C. scovillei*, e sugerem que os mecanismos de biocontrole envolvem tanto interação

direta quanto a provável produção de compostos antifúngicos capazes de comprometer a integridade estrutural do patógeno.

3.4. Promoção de Crescimento Vegetal

A avaliação do potencial de promoção de crescimento pelas linhagens de *Streptomyces* foi realizada por meio da análise de múltiplos parâmetros biométricos em plantas de *Capsicum chinense* cultivadas sob condições controladas por 45 dias após a inoculação bacteriana. Os resultados demonstraram que a inoculação com *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 promoveu alterações significativas no desenvolvimento do sistema radicular, enquanto os parâmetros da parte aérea não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 6). A análise da massa seca de raízes revelou aumentos substanciais nos tratamentos com ambas as linhagens bacterianas em comparação ao controle não inoculado.

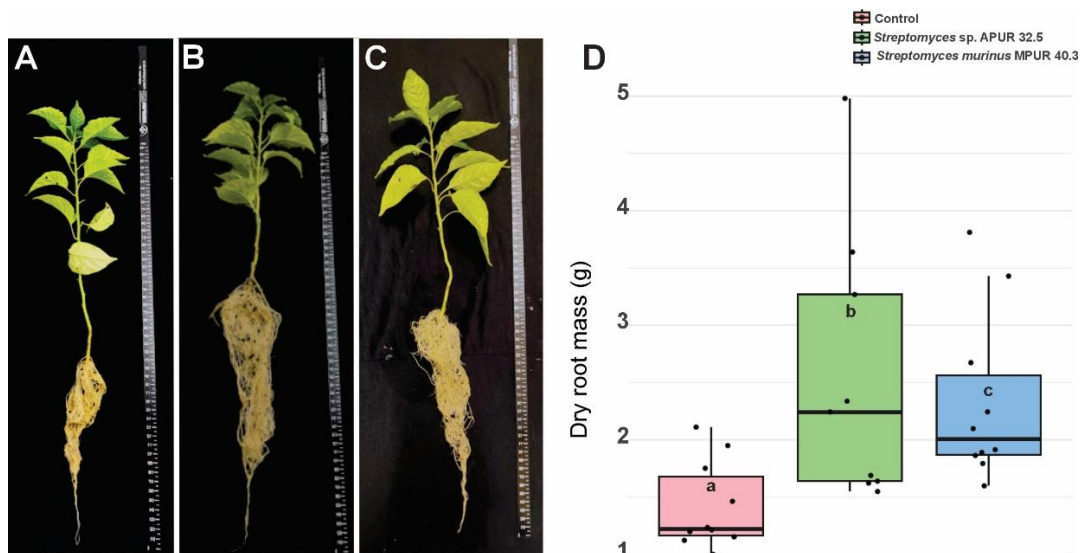


Figura 6. Efeito dos isolados de *Streptomyces* no desenvolvimento do sistema radicular de *Capsicum chinense* após 45 dias de cultivo. (A) Sistema radicular de plantas controle (não inoculadas); (B) Sistema radicular de plantas inoculadas com *Streptomyces* sp. APUR 32.5; (C) Sistema radicular de plantas inoculadas com *Streptomyces murinus* MPUR 40.3; (D) Massa seca média das raízes (g) por tratamento. As barras representam média $\pm$ desvio padrão (n = 10). Diferentes letras acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p < 0.05).

As plantas tratadas com *Streptomyces* sp. APUR 32.5 apresentaram o maior incremento na massa seca de raízes, com um aumento de 79,58% em relação ao controle (p < 0,05), alcançando média de $0,87 \pm 0,12$ g por planta, enquanto o controle apresentou $0,48 \pm 0,09$ g

(Figura 6D). O tratamento com *S. murinus* MPUR 40.3 também resultou em aumento significativo, com incremento de 64,08% na massa seca radicular ($0,79 \pm 0,11$ g) em comparação ao controle.

A análise morfológica do sistema radicular (Figura 6A–C) evidenciou não apenas o aumento na biomassa, mas também alterações na arquitetura radicular, com maior ramificação e desenvolvimento de raízes laterais nas plantas tratadas com *Streptomyces*, especialmente com a cepa APUR 32.5. Essas modificações na arquitetura radicular podem contribuir para maior eficiência na absorção de água e nutrientes, representando um benefício adicional além do incremento em biomassa.

Embora não tenham sido detectadas diferenças estatisticamente significativas na altura das plantas, no diâmetro do caule ou na massa seca da parte aérea, o expressivo desenvolvimento radicular observado nas plantas tratadas com *Streptomyces* sugere a aplicabilidade desses isolados como inoculantes promotores de crescimento em *C. chinense*, sobretudo em condições nas quais o desenvolvimento do sistema radicular constitui um fator limitante para a produtividade.

3.5. Ensaio Enzimáticos

3.5.1. Atividades Enzimáticas Hidrolíticas

Ambos os isolados demonstraram capacidade de produzir diferentes enzimas hidrolíticas, com variações significativas nos índices enzimáticos (IE) em função das condições de temperatura e pH (Figura 7A–C). *Streptomyces* sp. APUR 32.5 apresentou atividades amilolítica (IE = $16,0 \pm 3,46$) e lipolítica (IE = $10,0 \pm 2,36$) expressivas, especialmente em pH 7,0 e 28 °C (Figura 7A). Em contraste, *S. murinus* MPUR 40.3 exibiu atividade amilolítica superior (IE = $19,0 \pm 0,00$) sob as mesmas condições, além de atividade celulolítica moderada (IE = $5,9 \pm 1,18$) e lipolítica (IE = $5,8 \pm 0,70$) (Figura 7B).

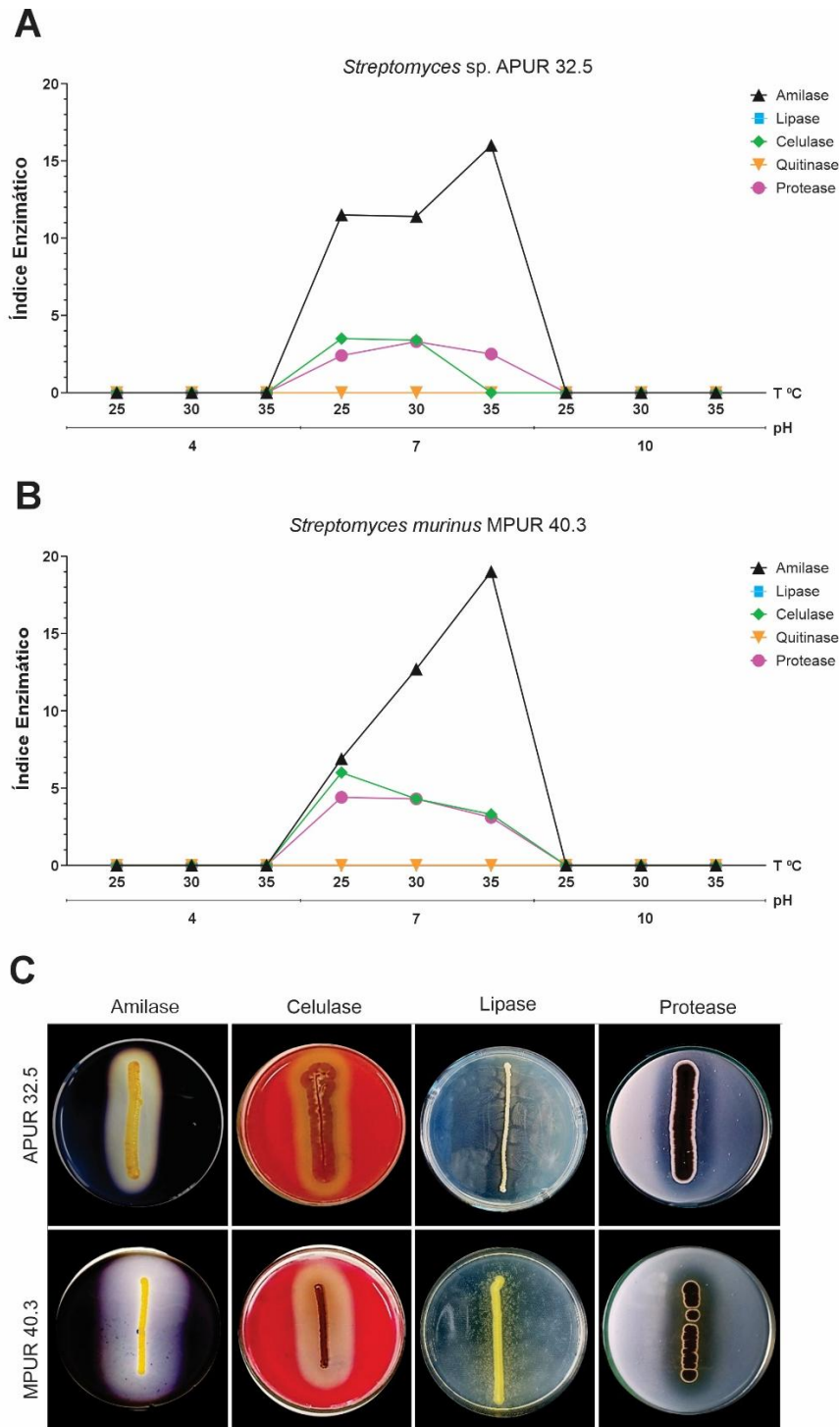


Figura 7. Atividades enzimáticas hidrolíticas de isolados de *Streptomyces* em diferentes condições de temperatura e pH. (A) Índices enzimáticos (IE) de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 para amilase, celulase e lipase sob diferentes combinações de temperatura. (B) Índices enzimáticos de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 nas mesmas condições. (C) Visualização representativa dos halos de degradação enzimática.

A análise comparativa das atividades enzimáticas sob diferentes condições revelou que ambos os isolados mantiveram atividade hidrolítica significativa em uma ampla faixa de pH (5,0–9,0) e de temperatura (25–37 °C), com atividade ótima em condições neutras a levemente alcalinas (pH 7,0–8,0) e temperaturas mesofílicas (28–30 °C). Essa versatilidade sugere adaptabilidade a diferentes microssistemas da rizosfera e aplicação em diversas condições edafoclimáticas.

3.5.2. Produção de Sideróforos e Solubilização de Fosfato

A capacidade de mobilizar nutrientes essenciais foi avaliada por meio de ensaios qualitativos para a produção de sideróforos e a solubilização de diferentes fontes de fosfato. Ambos os isolados, *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3, demonstraram resultados positivos para a produção de sideróforos, conforme evidenciado pela formação do halo característico em meio CAS (*chrome azurol S*).

Em relação à solubilização de fosfato, ambos os isolados exibiram a capacidade de mobilizar fósforo a partir de diversas fontes inorgânicas, incluindo fosfato de alumínio (AlPO₄), fosfato tricálcico [Ca₃(PO₄)₂] e fosfato férrico (FePO₄). Essa versatilidade na solubilização de diferentes formas de fosfato insolúvel é particularmente relevante, considerando que o fósforo frequentemente representa um fator limitante para o crescimento de plantas em solos tropicais.

A capacidade combinada de produzir sideróforos e solubilizar fosfatos constitui um importante mecanismo de promoção do crescimento de plantas, contribuindo para o aumento da disponibilidade de nutrientes essenciais na rizosfera. Adicionalmente, a produção de sideróforos pode atuar como um mecanismo indireto de biocontrole, por meio do qual os fitopatógenos competem por ferro.

3.6. Tolerância a pH e Temperatura

A capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais é um parâmetro crucial para a avaliação da aplicação de microrganismos como agentes de biocontrole e promotores de crescimento de plantas no campo. Nesse contexto, a caracterização da tolerância dos isolados de *Streptomyces* a diferentes temperaturas e valores de pH foi realizada, visando determinar sua versatilidade ecofisiológica. Os isolados *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 foram avaliados quanto ao crescimento em meio ISP2 sob diferentes combinações de temperatura (25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C) e pH (6,0, 7,0 e 8,0).

Streptomyces sp. APUR 32.5 demonstrou ser um mesófilo moderadamente termotolerante, com crescimento ótimo (+++) a 35 °C em todas as faixas de pH testadas. Em temperaturas mais baixas (25–30 °C), apresentou crescimento moderado (++) independentemente do pH. A 40 °C, exibiu crescimento ótimo (+++) em pH 6,0, reduzindo para moderado (++) em condições neutras a alcalinas (pH 7,0–8,0). Em temperatura elevada (45 °C), o crescimento foi reduzido (+) em todos os valores de pH e, a 50 °C, não foi observado crescimento, indicando seu limite superior de tolerância térmica.

S. murinus MPUR 40.3 apresentou um perfil de crescimento ligeiramente distinto, com preferência por condições mais alcalinas em temperaturas mais baixas. A 25 °C, demonstrou crescimento ótimo (+++) em pH 8,0 e crescimento moderado (++) em pH 6,0–7,0. Em temperaturas de 30–35 °C, exibiu crescimento ótimo (+++) em pH 7,0–8,0 e crescimento moderado (++) em pH 6,0. A 40 °C, o crescimento foi moderado (++) em todas as condições de pH. De forma similar ao isolado APUR 32.5, demonstrou crescimento reduzido (+) a 45 °C e ausência de crescimento a 50 °C.

Ambos os isolados demonstraram a capacidade de crescer em uma ampla faixa de temperatura (25–45 °C) e de pH (6,0–8,0), com preferências distintas que refletem adaptações ecofisiológicas específicas. *Streptomyces* sp. APUR 32.5 demonstrou maior tolerância a temperaturas elevadas em condições levemente ácidas (pH 6,0), enquanto *S. murinus* MPUR 40.3 demonstrou melhor adaptação a condições alcalinas (pH 8,0) em temperaturas mais baixas.

Essa versatilidade ecofisiológica sugere a aplicação desses isolados em diferentes condições edafoclimáticas, particularmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as temperaturas do solo podem variar significativamente. Adicionalmente, a tolerância a diferentes valores de pH amplia sua aplicação em solos com diversas características químicas.

4. DISCUSSÃO

As estirpes de *Streptomyces* investigadas neste estudo demonstram proximidade filogenética com o clado que inclui *S. murinus*, que é o nome atualmente aceito para esta espécie, enquanto *S. griseofuscus* e *S. costaricanus* são considerados sinônimos heterotípicos de *S. murinus* de acordo com revisões taxonômicas recentes [35]. A estirpe MPUR 40.3 foi identificada como *S. murinus*, ao passo que *Streptomyces* sp. APUR 32.5 representa um grupo irmão distinto, uma nova espécie putativa dentro do gênero. Análises filogenômicas complementares (Tabela S7), incluindo valores de hibridização digital DNA-DNA (dDDH) abaixo do ponto de corte de 70% para delimitação de espécies, apoiam ainda mais os resultados filogenéticos e confirmam a posição taxonômica distinta de APUR 32.5.

S. murinus foi originalmente descrita por Frommer em 1959 e é conhecida por sua capacidade de produzir o metabólito antifúngico pentamicina [36] [37], isolado pela primeira vez em 1958 por Umezawa e colaboradores. Este composto exibe atividade contra vários fungos patogênicos, incluindo espécies de *Candida* e dermatófitos. A estirpe previamente classificada como *S. costaricanus*, descrita em 1995, é reconhecida por suas propriedades antibióticas e anti-nematoides, e é conhecida por produzir avermectina [38], um composto também produzido por *Streptomyces avermitilis* [39]. A reclassificação taxonômica dessas espécies como *S. murinus* não diminui a importância de seus metabólitos bioativos, mas sim ressalta a complexidade da taxonomia de *Streptomyces* e a necessidade de abordagens polifásicas para uma identificação precisa.

No presente estudo, as estirpes *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 demonstraram forte atividade antagonista *in vitro* contra sete espécies distintas de *Colletotrichum*. Entre as espécies testadas, o melhor desempenho foi observado contra *C. guaranicola*, com inibição do crescimento micelial superior a 80%, superando resultados relatados anteriormente, nos quais *Streptomyces griseocarneus* R132 reduziu o crescimento micelial de *C. guaranicola* em 70% [34]. Da mesma forma, taxas de inibição de até 66% foram relatadas contra *C. siamense* usando espécies de *Streptomyces* [40]; enquanto, em nosso estudo, as estirpes APUR 32.5 e MPUR 40.3 inibiram o crescimento de *C. siamense* em 65% e 79%, respectivamente. Esse efeito inibitório pode estar associado à produção de metabólitos secundários, visto que *Streptomyces* é bem conhecido por sua notável capacidade de sintetizar uma ampla gama de compostos bioativos [41] [42] [43].

Além da ação direta dos microrganismos, extratos de *Streptomyces* também demonstraram alta eficácia contra fitopatógenos. *S. murinus* NARZ reduziu o crescimento micelial de *C. scovillei* em até 65%, indicando a presença de metabólitos secundários com atividade antifúngica significativa [44]. Da mesma forma, tanto o extrato quanto a ação direta de *Streptomyces* sp. NEAU-Y11 resultaram em inibição significativa do crescimento micelial de *Colletotrichum orbiculare* [45], reforçando o potencial deste gênero como fonte de moléculas bioativas com propriedades antifúngicas. Além disso, metabólitos produzidos por *Streptomyces amritsarensis* V31 exibiram atividade antifúngica relevante no controle de diferentes fungos fitopatogênicos [46].

Além dos metabólitos bioativos, as enzimas hidrolíticas também representam uma alternativa promissora para o controle de fitopatógenos. Enzimas como amilase, celulase, lipase, glucanase, quitinase e protease desempenham um papel essencial na degradação da parede celular, proteínas e componentes estruturais de fungos fitopatogênicos, estabelecendo um mecanismo de biocontrole eficiente que apoia indiretamente o desenvolvimento da planta [47] [48]. No presente estudo, as estirpes de *Streptomyces* testadas demonstraram atividade amilolítica, celulolítica, lipolítica e proteolítica, sugerindo o envolvimento dessas enzimas na degradação de estruturas fúngicas e na supressão de fitopatógenos.

Os valores do índice enzimático (IE) para amilase atingiram níveis significativos, com *S. murinus* MPUR 40.3 (IE = 19) e *Streptomyces* sp. APUR 32.5 (IE = 16) se destacando. Esses resultados indicam uma alta capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, que está possivelmente associada ao mecanismo de biocontrole dessas estirpes. O papel das enzimas no antagonismo microbiano é apoiado por estudos que demonstram a importância da α -amilase (AmyS) produzida por *Bacillus cereus* 0–9 na inibição de *Rhizoctonia cerealis*. Por meio de edição gênica, os autores observaram que o crescimento do fitopatógeno foi reduzido em 84,7% na presença da estirpe portadora do gene funcional; no entanto, a deleção do mesmo gene (*amyS*) resultou em uma diminuição significativa na eficácia do biocontrole, com a inibição reduzida para apenas 43,8% [49].

O controle pós-colheita da antracnose usando microrganismos e seus metabólitos é cada vez mais reconhecido como uma estratégia de biocontrole eficaz, crucial para reduzir insumos químicos e promover a agricultura sustentável [43]. Nosso estudo contribui significativamente para essa compreensão, demonstrando a forte atividade de biocontrole pós-colheita de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 contra *C. scovillei* em frutos de *C. chinense* (Seção 3.3.1). Especificamente, *S. murinus* MPUR 40.3 alcançou uma redução de 95% na incidência de antracnose, enquanto *Streptomyces* sp. APUR 32.5 apresentou uma redução moderada de 39,25%. Esses achados são altamente encorajadores e se alinham com o crescente corpo de evidências que apoia a eficácia de agentes microbianos para o manejo de doenças pós-colheita. Por exemplo, a eficácia significativa de MPUR 40.3 (95%) é comparável ou até supera alguns relatos anteriores; como compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma agriamazonicum* alcançaram inibição completa contra *C. scovillei* em *C. chinense* [50]. *Streptomyces tuius* AR26 [51], *Streptomyces lactacystinicus* ZZ-84 [52] e *Streptomyces olivoreticuli* ZZ-21 [53] demonstraram inibição do crescimento de *Colletotrichum scovillei* tanto *in vitro* quanto no ensaio de supressão de doenças *in planta*, e são relatados como estirpes promissoras de biocontrole que são capazes de reduzir significativamente a antracnose pós-colheita causada por *C. scovillei*. Isso reforça que diversos grupos microbianos, incluindo *Streptomyces*, são alternativas robustas aos insumos químicos. Nossos resultados, portanto, ressaltam o papel promissor de *Streptomyces* de sedimentos amazônicos como potentes agentes de biocontrole para a antracnose, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis.

As análises de MEV revelaram diferenças marcantes nos mecanismos de ação das estirpes antagonistas contra *Colletotrichum scovillei*, tanto *in vitro* quanto no biocontrole pós-colheita. O tratamento *in vitro* com *Streptomyces* sp. APUR 32.5 resultou em intensa degradação do micélio do patógeno, sugerindo a produção de enzimas líticas que comprometem a integridade da parede celular fúngica. Em contraste, *S. murinus* MPUR 40.3 pareceu liberar substâncias que agiram diretamente nas células germinativas (conídios), promovendo sua destruição e, conseqüentemente, prevenindo a germinação e o estabelecimento da infecção.

Ensaio pós-colheita mostraram que, apesar da redução moderada na severidade da doença proporcionada pela estirpe APUR 32.5, a MEV revelou esporos de *C. scovillei* visivelmente danificados e enrugados na superfície dos frutos tratados. Em contraste, no tratamento com MPUR 40.3, os esporos estavam completamente rompidos, corroborando a maior eficácia desta estirpe. O uso da MEV como ferramenta para visualizar interações entre microrganismos antagonistas e patógenos provou ser fundamental para elucidar os mecanismos de biocontrole, conforme demonstrado em estudos anteriores que revelaram alterações estruturais em diferentes sistemas patógeno–antagonista [54] [55].

As estirpes de *Streptomyces* testadas neste estudo demonstraram atividade multifuncional, atuando não apenas no biocontrole de fitopatógenos, mas também na promoção do crescimento de plantas. Ambos os isolados foram capazes de produzir sideróforos e solubilizar diferentes formas de fosfato (cálcio, ferro e alumínio), além de sintetizar enzimas hidrolíticas que, somadas ao seu efeito protetor contra fitopatógenos, também contribuem para o desenvolvimento da planta. Esses efeitos foram evidenciados nos ensaios de promoção de crescimento, particularmente por meio da estimulação significativa do desenvolvimento do sistema radicular de *C. chinense*.

Os mecanismos de solubilização de fosfato e produção de sideróforos desempenham um papel fundamental na promoção do crescimento de plantas, aumentando a disponibilidade de nutrientes essenciais na rizosfera. A solubilização de fosfatos inorgânicos converte formas insolúveis de fósforo em formas que podem ser prontamente absorvidas pelas plantas, enquanto os sideróforos sequestram ferro em condições de baixa disponibilidade, aumentando a absorção de ferro pelas plantas e limitando a disponibilidade de ferro para os fitopatógenos. Esses mecanismos destacam o papel multifuncional de *Streptomyces*, com aplicações promissoras tanto em biocontrole quanto em biofertilização, conforme demonstrado em estudos recentes [56] [57] [58].

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo reforçam a eficácia de *Streptomyces* no controle de fungos fitopatogênicos e na promoção do crescimento em culturas de *C. chinense*, alinhando-se com vários estudos recentes que demonstram sua capacidade como agentes de biocontrole promissores para a agricultura sustentável. A caracterização de novas estirpes com atividade antifúngica e promotora de crescimento, particularmente aquelas isoladas de ambientes inexplorados como a Amazônia, representa uma contribuição significativa para o desenvolvimento de alternativas biológicas aos agroquímicos convencionais.

5. CONCLUSÃO

Este estudo fornece novos *insights* ao caracterizar minuciosamente o potencial multifuncional de duas estirpes de *Streptomyces*, incluindo uma nova espécie putativa (APUR 32.5) e *S. murinus* (MPUR 40.3), originalmente isoladas dos sedimentos amazônicos de alta biodiversidade. Nossos achados apoiam fortemente a hipótese de que esses ecossistemas inexplorados são fontes ricas de microrganismos que possuem atributos biotecnológicos únicos e potentes, que podem ser aplicáveis em soluções agrícolas sustentáveis. Esses isolados amazônicos demonstraram capacidade inibitória robusta e de amplo espectro contra todas as espécies de *Colletotrichum* testadas *in vitro*. Mais criticamente, eles mostraram eficácia significativa na redução da incidência de antracnose pós-colheita em frutos de *Capsicum chinense*, com *S. murinus* MPUR 40.3 alcançando uma notável redução de 95% e *Streptomyces* sp. APUR 32.5 alcançando uma redução considerável de 39,25%. *Insights* mecanicistas da microscopia eletrônica de varredura revelaram ações antifúngicas distintas, com MPUR 40.3 induzindo primariamente a lise conidial durante a infecção inicial e APUR 32.5 causando degradação hifal. Além do biocontrole, esses isolados exibiram características promotoras do crescimento de plantas, incluindo a produção de enzimas hidrolíticas e sideróforos, bem como a solubilização de fosfato. Sua versatilidade ecofisiológica demonstrada (tolerância a amplas faixas de temperatura e pH) aumenta ainda mais sua aplicabilidade. Coletivamente, esses isolados multifuncionais de *Streptomyces* amazônicos representam candidatos promissores e sustentáveis para o manejo integrado de fitopatógenos e o aumento da produtividade agrícola. Estudos futuros empregando abordagens metabolômicas terão como objetivo elucidar os mecanismos moleculares associados à atividade antifúngica dessas estirpes. Além disso, sua eficácia em condições de campo e seu potencial para o desenvolvimento de formulações comerciais como bioinoculantes e agentes de biocontrole serão avaliados.

REFERÊNCIAS

1. Tudi, M.; Ruan, H.D.; Wang, L.; Lyu, J.; Sadler, R.; Connell, D.; Chu, C.; Phung, D. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 1112.
2. Shahbazi, F.; Golshani, A.; Fattahi, M.; Armin, M. Losses in agricultural produce: A review of causes and solutions, with a specific focus on grain crops. *J. Stored Prod. Res.* 2025, 111, 102547.
3. Nath, B.; Chen, G.; O'sullivan, C.M.; Zare, D. Research and technologies to reduce grain postharvest losses: A review. *Foods* 2024, 13, 1875.
4. Sawicka, B.; Egbuna, C. Pests of agricultural crops and control measures. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 1–16.
5. Zakaria, L. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. *Agriculture* 2021, 11, 297.
6. Salotti, I.; Baroncelli, R.; Sarrocco, S.; Battilani, P. Development of a model for *Colletotrichum* diseases with calibration for phylogenetic clades on different host plants. *Front. Plant Sci.* 2023, 14, 1069092.
7. Thanh, L.T.H.; Minh, P.T.; Trang, P.T.; Duong, V.T. First report of *Colletotrichum* *siamense* and *Colletotrichum* *endophyticum* associated with anthracnose on avocado (*Persea americana* Mill.) in Vietnam. *J. Plant Pathol.* 2025, 107, 633–647.
8. Torres-Calzada, C.; Tapia-Tussell, R.; Higuera-Ciapara, I.; Pérez-Brito, D. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. *Plant Dis.* 2015, 99, 1590–1595.
9. Dowling, M.; Peres, N.A.; Villani, S.M.; Schnabel, G. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. *Plant Dis.* 2020, 104, 2301–2316.
10. Ren, L.; Li, G.Q.; Han, Y.C.; Jiang, D.H.; Huang, H.C. Characterisation of sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici*, causing pepper anthracnose, to picoxystrobin. *J. Plant Dis. Prot.* 2020, 127, 657–666.
11. Karim, M.M.; Wu, C.; Zhang, J.; Li, X.; Liu, P.; Sun, G. Fungicide resistance in *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum siamense* causing peach anthracnose in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2024, 203, 106006.

12. Giacomini, R.M.; Rodrigues, R.; Gonçalves-Vidigal, M.C.; Silva, C.L. Inheritance of anthracnose resistance (*Colletotrichum scovillei*) in ripe and unripe *Capsicum annuum* fruits. *J. Phytopathol.* 2020, 168, 184–192.
13. Caires, N.P.; Félix, C.R.; Tessmann, D.J.; Cardoso, J.E.; Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.G. First report of anthracnose on pepper fruit caused by *Colletotrichum scovillei* in Brazil. *Plant Dis.* 2014, 98, 1437.
14. Giacomini, R.M.; Colletta, G.D.; Gonçalves-Vidigal, M.C.; Rodrigues, R. Post-harvest quality and sensory evaluation of mini sweet peppers. *Horticulturae* 2021, 7, 287.
15. Shi, N.; Zhang, H.; Liu, P.; Sun, G. Resistance risk and resistance-related point mutations in cytochrome b of florylpicoxamid in *Colletotrichum scovillei*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2023, 196, 105617.
16. Law, C.X.; Lim, L.; Yap, S.K.; Chee, H.Y. A review on anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. in fruits and advances in control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 2025, 394, 111397.
17. Chatterjee, K.; Singh, R.; Yadav, A.N. Application of Streptomycetes in medicine. In *Bioeconomy of Streptomyces*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2025; pp. 119–141.
18. Patel, S.; Gupta, R.; Singh, H.B. Diversity of secondary metabolites from marine *Streptomyces* with potential anti-tubercular activity: A review. *Arch. Microbiol.* 2025, 207, 64.
19. Pacios-Michelena, S.; Ríos-Castro, E.; González, M.; Maldonado-Mendoza, I.E. Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. *Front. Sustain. Food Syst.* 2021, 5, 696518.
20. Chouyia, F.E.; Ventrino, V.; Pepe, O. Diversity, mechanisms and beneficial features of phosphate-solubilizing *Streptomyces* in sustainable agriculture: A review. *Front. Plant Sci.* 2022, 13, 1035358.
21. Beroigui, O.; Errachidi, F. *Streptomyces* at the heart of several sectors to support practical and sustainable applications: A review. *Prog. Microbes Mol. Biol.* 2023, 6, a0000345.
22. Wang, M.; Zhang, Y.; Chen, J.; Li, Q.; Liu, G. *Streptomyces* strains and their metabolites for biocontrol of phytopathogens in agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 2024, 72, 2077–2088.
23. Kumar, M.; Singh, V.; Sharma, R. Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries. *Arch. Microbiol.* 2020, 202, 1597–1615.

24. Khushboo; Singh, S.; Mishra, P. Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 2022, 16, 244–264.
25. Pereira, J.O.; Lima, A.L.; Silva, G.C.; Araújo, J.M. Overview on biodiversity, chemistry, and biotechnological potential of microorganisms from the Brazilian Amazon. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*; Moreira, F.M.S., Huising, E.J., Bignell, D.E., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; pp. 71–103.
26. de Oliveira, A.C.F.M.; Santos, E.M.; Silva, C.F.; da Silva e Silva, L.; de Oliveira Veras, A.A.; das Graças, D.A.; Silva, A.; Baraúna, R.A.; Trivella, D.B.B.; Schneider, M.P.C. A metabologenomics approach reveals the unexplored biosynthetic potential of bacteria isolated from an Amazon Conservation Unit. *Microbiol. Spectr.* 2024, 13, e00996-24.
27. Jose, P.A.; Jha, B. Intertidal marine sediment harbours actinobacteria with promising bioactive and biosynthetic potential. *Sci. Rep.* 2017, 7, 10041.
28. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1966, 16, 313–340.
29. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 1990, 12, 13–15.
30. Labeda, D.P.; Dunlap, C.A.; Rong, X.; Huang, Y.; Doroghazi, J.R.; Ju, K.-S.; Metcalf, W.W. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2017, 110, 563–583.
31. Thampi, A.; Bhai, R.S. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biol. Control* 2017, 109, 1–13.
32. Falguera, J.V.T.; Stratton, K.J.; Bush, M.J.; Jani, C.; Findlay, K.C.; Schlimpert, S.; Nodwell, J.R. DNA damage-induced block of sporulation in *Streptomyces venezuelae* involves downregulation of *ssgB*. *Microbiology* 2022, 168, 001198.
33. Ratul, N.; Sharma, G.D.; Madhumita, B. Phosphate solubilization, siderophore production and extracellular enzyme production activities of endophytic fungi isolated from tea (*Camellia sinensis*) bushes of Assam, India. *Res. J. Biotechnol.* 2023, 18, 49–57.
34. Liotti, R.G.; da Silva Figueiredo, M.I.; Soares, M.A. *Streptomyces griseocarneus* R132 controls phytopathogens and promotes growth of pepper (*Capsicum annuum*). *Biol. Control* 2019, 138, 104065.

35. Komaki, H. Reclassification of *Streptomyces costaricanus* and *Streptomyces phaeoigriseichromatogenes* as later heterotypic synonyms of *Streptomyces murinus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021, 71, 004638.
36. Gren, T.; Pahl, A.; Nieselt, K.; Heide, L.; Luzhetskyy, A. Characterization and engineering of *Streptomyces griseofuscus* DSM 40191 as a potential host for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *Sci. Rep.* 2021, 11, 18301.
37. Das, V.; Thomas, L.; Mathew, J.; Joseph, B. Exploration of natural product repository by combined genomics and metabolomics profiling of mangrove-derived *Streptomyces murinus* THV12 strain. *Fermentation* 2023, 9, 576.
38. Esnard, J.; Potter, T.L.; Zuckerman, B.M. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from nematode-suppressive soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995, 45, 775–779.
39. Cerna-Chávez, E.; López-Méndez, B.; Rivera-Morales, J.; Martínez, A. Potential of *Streptomyces avermitilis*: A review on avermectin production and its biocidal effect. *Metabolites* 2024, 14, 374.
40. Evangelista-Martínez, Z.; Torres, M.; Hernández, L.; Reyes, A. Potential of *Streptomyces* sp. strain AGS-58 in controlling anthracnose-causing *Colletotrichum siamense* from post-harvest mango fruits. *J. Plant Pathol.* 2022, 104, 553–563.
41. Alam, K.; Tian, J.; Wu, J.; Zhang, L.; Zhang, C. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 968053.
42. Ciofini, A.; Di Mattia, T.; Rossi, M.; Santini, C. Management of post-harvest anthracnose: Current approaches and future perspectives. *Plants* 2022, 11, 1856.
43. Nguyen, H.T.; Pham, L.D.; Tran, Q.N.; Le, T.A. Biological control of *Streptomyces murinus* against *Colletotrichum* causing anthracnose disease on tomato fruits. *J. Pure Appl. Microbiol.* 2025, 19, 542–557.
44. Song, W.; Yu, X.; Yu, X.; Zhang, H.; Zhang, K.; Guo, L.; Wang, J.-D.; Tian, D.-L.; Yu, Q.; Wang, X.; et al. Antifungal Activity and Potential Mechanisms of Two Bafilomycin Analogues Isolated from *Streptomyces* sp. NEAU-Y11 against *Colletotrichum orbiculare*. *J. Agric. Food Chem.* 2025, 73, 11814–11828.
45. Shahid, M.; Singh, B.N.; Verma, S.; Choudhary, P.; Das, S.; Chakdar, H.; Murugan, K.; Goswami, S.K.; Saxena, A.K. Bioactive antifungal metabolites produced by *Streptomyces amritsarensis* V31 help to control diverse phytopathogenic fungi. *Braz. J. Microbiol.* 2021, 52, 1687–1699.

46. Mishra, P.; Sharma, A.; Singh, V. Microbial enzymes in biocontrol of phytopathogens. In *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 259–285.
47. Riseh, R.S.; Akbarzadeh, A.; Mousavi, S.M.; Hassanzadeh, S. Unveiling the role of hydrolytic enzymes from soil biocontrol bacteria in sustainable phytopathogen management. *Front. Biosci.* 2024, 29, 105–125.
48. Daunoras, J.; Kačergius, A.; Gudiukaitė, R. Role of soil microbiota enzymes in soil health and activity changes depending on climate change and the type of soil ecosystem. *Biology* 2024, 13, 85.
49. Huang, Q.; Li, Y.; Wang, X.; Chen, H.; Zhou, L. Production of extracellular amylase contributes to the colonization of *Bacillus cereus* 0–9 in wheat roots. *BMC Microbiol.* 2022, 22, 205.
50. Sousa, T.F.; Oliveira, R.; Lima, J.C.; Gomes, L.F.; Costa, P.R. *Trichoderma agriamazonicum* sp. nov. (Hypocreaceae), a new ally in the control of phytopathogens. *Microbiol. Res.* 2023, 275, 127469.
51. Renuka, R.; Sathiyabama, M.; Kumar, P. Exploring the potentiality of native actinobacteria to combat the chilli fruit rot pathogens under post-harvest pathosystem. *Life* 2023, 13, 426.
52. Zhong, J.; Bai, X.Y.; Zhang, Z.; Li, X.G.; Zhu, J.Z. Biocontrol potential of *Streptomyces lactacystinicus* producing volatile organic compounds against postharvest anthracnose of chili pepper. *Postharvest Biol. Technol.* 2025, 230, 113758.
53. Zhong, J.; Bai, X.Y.; Li, X.G.; Zhu, J.Z. *Streptomyces olivoreticuli* ZZ-21 act as a potential biocontrol strain against pepper anthracnose caused by *Colletotrichum scovillei*. *Int. J. Food Microbiol.* 2025, 441, 111319.
54. Luan, P.; Li, H.; Zhang, J.; Chen, R.; Wang, S. Biocontrol potential and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DB2 on *Bipolaris sorokiniana*. *Front. Microbiol.* 2023, 14, 1149363.
55. Li, X.; Wang, H.; Zhao, J.; Tang, Y. Biocontrol potential of volatile organic compounds produced by *Streptomyces corchorusii* CG-G2 to strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Chem.* 2024, 437, 137938.
56. Kawicha, P.; Somwang, P.; Runguphan, W.; Supapvanich, S. Evaluation of soil *Streptomyces* spp. for the biological control of *Fusarium* wilt disease and growth promotion in tomato and banana. *Plant Pathol. J.* 2023, 39, 108–119.

57. Al-Quwaie, D.A. The role of *Streptomyces* species in controlling plant diseases: A comprehensive review. *Australas. Plant Pathol.* 2024, 53, 1–14.
58. Nazari, M.T.; Fakhari, M.; Hemmati, R. Using *Streptomyces* spp. as plant growth promoters and biocontrol agents. *Rhizosphere* 2023, 27, 100741.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Composição dos meios de cultura utilizados neste estudo para a caracterização morfológica de linhagens de *Streptomyces* e para as análises de antagonismo.

Culture Media	Composition (per 1 L of distilled water)
ISP1	5 g tryptone; 3 g yeast extract; 20 g agar
ISP2	4 g yeast extract; 10 g malt extract; 4 g dextrose; 20 g agar
ISP3	20 g oatmeal; 18 g agar
LB	10 g peptone; 5 g yeast extract; 5 g NaCl; 20 g agar
ACA	10 g starch; 0.3 g casein; 2 g KNO ₃ ; 2 g NaCl; 2 g K ₂ HPO ₄ ; 0.05 g MgSO ₄ ; 1.02 g CaCO ₃ ; 0.01 g FeSO ₄ ; 15 g agar
SYEP	0.25 g yeast extract; 0.5 g K ₂ HPO ₄ ; 18 g agar
V8	200 mL V8 juice; 4.5 g CaCO ₃ ; 18 g agar; 800 mL distilled water
BDA	200 g potato; 20 g dextrose; 15 g agar
SNA	1 g KH ₂ PO ₄ ; 1 g KNO ₃ ; 0.5 g MgSO ₄ ; 0.5 g KCl; 0.2 g glucose; 0.2 g sucrose; 20 g agar
AA	17 g agar
AIA	2 g sodium caseinate; 0.1 g L-asparagine; 4 g sodium propionate; 0.5 g K ₂ HPO ₄ ; 0.1 g MgSO ₄ ; 0.001 g FeSO ₄ ; 15 g agar; 5 mL glycerol
Rice Agar	40 g rice; 0.04 g yeast extract; 0.02 g K ₂ HPO ₄

Tabela S2. Sequências dos primers utilizados para a amplificação parcial dos genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* e *trpB*, com suas respectivas temperaturas de anelamento e tamanhos esperados dos produtos de PCR.

Gene	Primer	Sequences	Annealing temperature (°C)	Pb
<i>atpD</i>	<i>atpDF</i> <i>atpDR</i>	ACCAAGGGCAAGGTGTTCAA GCCGGGTAGATGCCCTTCTC	63	998
<i>gyrB</i>	<i>gyrBF-1</i> <i>gyrBR-4</i>	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCA CGCTCCTTGTCTCGGCCTC	65	1305
<i>recA</i>	<i>recAF</i> <i>recAR</i>	ACAGATTGAACGGCAATTCG ACCTTGTTCTTGACCACCTT	60	913
<i>rpoB</i>	<i>rpoBF1</i> <i>rpoBR1</i>	TTCATGGACCAGAACAACC CGTAGTTGTGACCCTCCC	65	994
<i>trpB</i>	<i>trpBF</i> <i>trpBR</i>	GGCTCACACAAGATCAACAA TCGATGGCCGGGATGATGCC	65	822

Tabela S3. Dados de sequência e números de acesso no GenBank das linhagens de *Streptomyces* utilizadas neste estudo.

Species	Strain	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>trpB</i>	<i>rpoB</i>	<i>recA</i>
<i>Streptomyces sp.</i>	APUR 32.5	PX502295	PX502296	PX502297	PX502299	PX502298
<i>Streptomyces murinus</i>	MPUR 40.3	PX502290	PX502291	PX502292	PX502293	PX502294

<i>Streptomyces murinus</i>	NRRL B-2286	KT384651.1	KT385001.1	KT389320.1	KT388971.1	KT385352.1
<i>Streptomyces glaucescens</i>	NRRL B-2706	KT384565.1	HQ823590.1	KT389234.1	KT388884.1	KT385263.1
<i>Streptomyces pharetrae</i>	NRRL B-24333	KT384683.1	KT385033.1	KT389353.1	KT389004.1	KT385384.1
<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	NRRL B-16932	KT384725.1	KT385074.1	KT389394.1		KT385426.1
<i>Streptomyces galbus</i>	NRRL B-2283	KT384560.1	KT384909.1	KT389229.1	KT388879.1	KT385258.1
<i>Streptomyces inusitatus</i>	NRRL B-16929	KT384603.1	KT384952.1	KT389272.1	KT388923.1	KT385302.1
<i>Streptomyces longwoodensis</i>	NRRL B-16923	KT384629.1	KT384978.1	KT389298.1	KT388949.1	KT385329.1
<i>Streptomyces thermospinosporus</i>	NRRL B-24318	KT384737.1	KT385086.1	KT389406.1	KT389057.1	KT385439.1
<i>Streptomyces echinoruber</i>	NRRL 8144	KT384540.1	KT384889.1	KT384540.1	KT388859.1	KT385237.1
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	NRRL B-12374	KT384738.1	KT385087.1	KT389407.1	KT389058.1	KT385440.1
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	NRRL B-1305	KT384453.1	KT384802.1	KT389122.1	KT388772.1	KT385150.1
<i>Streptomyces wellingtoniae</i>	NRRL B-1503	KT384761.1	KT385109.1	KT389430.1	KT389081.1	KT385463.1
<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i>	NRRL B-5799	KT384680.1	KT385030.1	HG423654.1	HG423678.1	KT385381.1
<i>Streptomyces misionensis</i>	NRRL B-3230	KT384647.1	KT384996.1	KT389316.1	KT388967.1	KT385347.1
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	NRRL B-5429	KT384579.1	KT384928.1	KT389248.1	KT388898.1	KT385277.1
<i>Streptomyces costaricanus</i>	NRRL B-16897	KT384774.1	KT385122.1	KT389443.1	KT389094.1	KT385476.1
<i>Streptomyces viridiviolaceus</i>	NRRL B-12182	KT384755.1	KT385103.1	KT389424.1	KT389075.1	KT385457.1
<i>Streptomyces griseostramineus</i>	NRRL B-5422	KT384585.1	KT384934.1	KT389254.1	KT388905.1	KT385283.1
<i>Streptomyces gramineus</i>	NRRL B-16369	KT384573.1	KT384922.1	KT389242.1	KT388892.1	KT385271.1
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	NRRL B-12175	KT384509.1	KT384858.1	KT389178.1	KT388828.1	KT385206.1
<i>Streptomyces levis</i>	NRRL B-16370	KT384621.1	KT384970.1	HG423660.1	HG423682.1	KT385320.1
<i>Streptomyces indiaensis</i>	NRRL B-24311	KT384601.1	KT384950.1	KT389270.1	KT388921.1	KT385300.1
<i>Streptomyces massaporeus</i>	NRRL B-3300	KT384636.1	KT384985.1	KT389305.1	KT388956.1	KT385336.1
<i>Streptomyces asoensis</i>	NRRL B-16592	KT384493.1	KT384842.1	KT389162.1	KT388812.1	KT385190.1

<i>Streptomyces lateritius</i>	NRRL B-5349	KT384616.1	KT384965.1	KT389285.1	KT388936.1	KT385315.1
<i>Streptomyces zaomyceticus</i>	NRRL B-2038	KT384771.1	KT385119.1	KT389440.1	KT389091.1	KT385473.1
<i>Streptomyces bikiniensis</i>	NRRL B-2690	KT384486.1	KT384835.1	KT389155.1	KT388805.1	KT385183.1
<i>Streptomyces gardneri</i>	NRRL B-5615	KT384562.1	KT384911.1	KT389231.1	KT388881.1	KT385260.1
<i>Streptomyces venezuelae</i>	NRRL ISP-5230	KT384746.1	KT385094.1	KT389415.1	KT389066.1	KT385448.1
<i>Streptomyces litmocidini</i>	NRRL B-3635	KT384625.1	KT384974.1	KT389294.1	KT388945.1	KT385325.1
<i>Streptomyces showdoensis</i>	NRRL B-12430	KT384722.1	KT385071.1	KT389391.1	KT389043.1	KT385423.1
<i>Streptomyces violaceorectus</i>	NRRL B-12181	KT384750.1	KT385098.1	KT389419.1	KT389070.1	KT385452.1
<i>Streptomyces viridobrunneus</i>	NRRL B-24332	KT384753.1	KT385101.1	KT389422.1	KT389073.1	KT385455.1
<i>Streptomyces roseoviridis</i>	NRRL B-2730	KT384711.1	KT385061.1	KT389380.1	KT389032.1	KT385412.1
<i>Streptomyces filamentosus</i>	NRRL B-2114	KT384547.1	KT384896.1	KT389216.1	KT388866.1	KT385245.1
<i>Streptomyces omiyaensis</i>	NRRL B-1587	KT384671.1	KT385021.1	KT389340.1	KT388991.1	KT385372.1
<i>Streptomyces roseolus</i>	NRRL B-5424	KT384707.1	KT385057.1	KT389376.1	KT389028.1	KT385408.1
<i>Streptomyces roseofulvus</i>	NRRL B-2729	KT384706.1	KT385056.1	KT389375.1	KT389027.1	KT385407.1
<i>Streptomyces tanashiensis</i>	NRRL B-2606	KT384656.1	KT385006.1	KT389325.1	KT388976.1	KT385357.1
<i>Streptomyces netropsi</i>	NRRL B-1831	KT384609.1	KT384958.1	KT389278.1	KT388929.1	KT385308.1

Tabela S4. Fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* utilizados nos ensaios de antagonismo com *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3.

Nº	Phytopathogen	Strain	Host
1	<i>Colletotrichum siamense</i>	Coll 2N	<i>Synedrella nodiflora</i>
2	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	1809	<i>Allium schoenoprasum</i>
3	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	2787	<i>Capsicum chinense</i> (fruit)
4	<i>Colletotrichum spaethianum</i>	2908	<i>Allium schoenoprasum</i>
5	<i>Colletotrichum scovillei</i>	2910	<i>Capsicum chinense</i> (fruit)
6	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	2939	<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> (leaf)
7	<i>Colletotrichum</i> sp.	2973	<i>Carica papaya</i> (fruit)

Tabela S5. Composição dos meios de cultura seletivos utilizados para avaliar a capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato e a produção de sideróforos por isolados de *Streptomyces*.

Activity evaluated	Culture media	Composition (g/L)	Indicator of solubilization/production	References
Calcium phosphate solubilization	NBRIP medium	Glucose (10,0); Ca ₃ (PO ₄) ₂ (5,0); MgCl ₂ ·6H ₂ O (5,0); MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,25); KCl (0,2); (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,1); Ágar (15,0); pH 7	Formation of a clear halo around the colony	Nautiyal (1999)
Aluminum phosphate solubilization	Modified NBRIP medium	Glucose (10.0 g); FePO ₄ (5.0 g); MgCl ₂ ·6H ₂ O (5.0 g); MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.25 g); KCl (0.2 g); (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.1 g); Agar (15.0 g); pH 7	Formation of a clear halo around the colony	Adaptado de Nautiyal (1999)
Iron phosphate solubilization	Modified NBRIP medium	Glucose (10,0); FePO ₄ (5,0); MgCl ₂ ·6H ₂ O (5,0); MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,25); KCl (0,2); (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,1); Ágar (15,0); pH 7	Formation of a clear halo around the colony	Adaptado de Nautiyal (1999)
Siderophore production	Meio CAS-ágar	CAS solution (100 mL); PIPES (30.24); Trace element solution* (10 mL); Casamino acids (0.5 g); Asparagine (0.5 g); Agar (15.0 g); pH 6.8**	Formation of an orange halo around the colony	Schwyn & Neilands (1987)

Tabela S6. Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios de atividade enzimática e os métodos para detecção dos halos de hidrólise.

Activity evaluated	Culture media	Detection	References
Amylase	5 g peptone; 5 g NaCl; 5 g meat extract; 10 g dextrose; 2 g starch; 20 g agar; 1 L distilled water	10 mL of 0.3% (v/v) Lugol's solution for 5 min. Formation of halos around the isolate.	Hankin & Anagnostakis (1975)
Cellulase	1 g KH ₂ PO ₄ ; 0.5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0.5 g NaCl; 0.01 g FeSO ₄ ·7H ₂ O; 0.01 g MnSO ₄ ·H ₂ O; 0.3 g NH ₄ NO ₃ ; 10 g carboxymethylcellulose; 12 g agar; 1 L distilled water	10 mL of Congo Red (0.1% v/v) for 15 min, followed by 10 mL of 1 M NaCl for an additional 15 min. Formation of halos around the bacterium.	Ariffin et al. (2006)
Chitinase	10 g colloidal chitin; 0.2 g KCl; 0.2 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 1 g NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 1 L distilled water	Formation of halos around the colony.	Roberts & Selitrennikoff (1988)
Lipase	10 g peptone; 5 g NaCl; 0.1 g CaCl ₂ ·2H ₂ O; 20 g agar; 10 mL Tween 20; 1 L distilled water	Formation of whitish halos around the colony.	Sierra (1957)
Protease	2 g skim milk powder; 5 g peptone; 3 g yeast extract; 15 g agar; 1 L distilled water	Formation of halos around the colony.	Hankin & Anagnostakis (1975)

Tabela S7. Percentuais de hibridização digital DNA–DNA (dDDH), calculados pela fórmula d4, entre os genomas das linhagens MPUR 40.3 e APUR 32.5 em comparação com as espécies de *Streptomyces* filogeneticamente mais próximas, utilizando o Type Strain Genome Server (TYGS).

Query strain	Subject strain	d4	C.I. (d4, in %)	G+C content difference (in %)
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 41827	84.5	[81.8 - 86.9]	0.04
MPUR 40.3	<i>Streptomyces gramineus</i> JCM 6923	75.2	[72.2 - 78.0]	0.04

MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> NRRL B-5429	71.6	[68.5 - 74.4]	0.07
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40710	71.5	[68.5 - 74.4]	0.08
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40191	71.5	[68.4 - 74.3]	0.14
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 41827	55.1	[52.3 - 57.8]	0.53
APUR 32.5	<i>Streptomyces</i> sp. MPUR40.3	55.0	[52.3 - 57.7]	0.49
APUR 32.5	<i>Streptomyces graminearus</i> JCM 6923	54.1	[51.4 - 56.8]	0.46
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> NRRL B-5429	53.8	[51.1 - 56.5]	0.57
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40710	53.7	[51.0 - 56.4]	0.57
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40191	53.6	[50.9 - 56.3]	0.64

**CAPÍTULO II - Análise genômica e química de duas linhagens de
Streptomyces amazônicas: anotação de metabólitos bioativos com potencial
biotecnológico**

RESUMO

A biodiversidade amazônica representa uma fonte promissora de microrganismos com potencial biotecnológico pouco explorado. Neste contexto, este estudo investigou o potencial biotecnológico de duas linhagens amazônicas, *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, por meio de uma abordagem integrada envolvendo identificação filogenômica, mineração genômica e caracterização química. Os genomas foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina, montados com SPAdes e analisados por inferência filogenômica baseada em genoma completo, empregando TYGS e dDDH. As análises confirmaram a afiliação de MPUR 40.3 à espécie *S. murinus*, enquanto APUR 32.5 apresentou valores inferiores ao limiar de delimitação de espécies, sugerindo tratar-se potencialmente de uma nova espécie. A mineração genômica realizada com antiSMASH, PRISM, BAGEL, RAST, Bakta e ARTS revelou amplo repertório biossintético em ambas as linhagens. A cepa APUR 32.5 apresentou mais de 50 clusters de genes biossintéticos, incluindo PKS, NRPS, sideróforos, terpenos e RiPPs, associados a metabólitos como ectoína, tetracenomicina, pentamicina, hopenoides e albaflavenona. Já MPUR 40.3 apresentou aproximadamente 45 regiões biossintéticas, incluindo clusters relacionados à produção de actinomicina D, leupeptinas, desferrioxamina e outros compostos bioativos, além de genes associados a autorresistência, aquisição de ferro e potencial antifúngico. Por fim, a caracterização química foi conduzida após cultivo das linhagens em diferentes meios sob estratégia OSMAC, seguida de extração com acetato de etila e análise por UPLC-MS/MS e redes moleculares no GNPS, mostrou a produção de compostos compatíveis com tetracenomicinas na linhagem *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 e actinomicinas (incluindo actinomicina D e análogos) em *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, evidenciando concordância entre potencial genético e expressão metabólica. Com isto, os resultados demonstram que as linhagens amazônicas analisadas constituem fontes promissoras de metabólitos secundários bioativos, com potencial aplicação em biotecnologia agrícola e farmacêutica, reforçando a importância da biodiversidade microbiana amazônica na prospecção de novos produtos naturais.

Palavras-chave: microrganismos; bactéria; metabólitos secundários; Amazônia.

ABSTRACT

Amazonian biodiversity represents a promising source of microorganisms with underexplored biotechnological potential. In this context, this study investigated the biotechnological potential of two Amazonian strains, *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 and *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, through an integrated approach involving phylogenomic identification, genome mining, and chemical characterization. The genomes were sequenced using the Illumina platform, assembled with SPAdes, and analyzed by whole-genome-based phylogenetic inference using TYGS and digital DNA–DNA hybridization (dDDH). The analyses confirmed the affiliation of MPUR 40.3 to the species *S. murinus*, whereas APUR 32.5 showed values below the species delimitation threshold, suggesting it potentially represents a novel species. Genome mining performed with antiSMASH, PRISM, BAGEL, RAST, Bakta, and ARTS revealed a broad biosynthetic repertoire in both strains. Strain APUR 32.5 presented more than 50 biosynthetic gene clusters, including PKS, NRPS, siderophores, terpenes, and RiPPs, associated with metabolites such as ectoine, tetracenomycin, pentamycin, hopanoids, and albaflavenone. In contrast, MPUR 40.3 exhibited approximately 45 biosynthetic regions, including clusters related to the production of actinomycin D, leupeptins, desferrioxamine, and other bioactive compounds, as well as genes associated with self-resistance, iron acquisition, and antifungal potential. Finally, chemical characterization was conducted after cultivating the strains in different media under the OSMAC strategy, followed by ethyl acetate extraction and analysis by UPLC–MS/MS and molecular networking on GNPS. This approach revealed the production of compounds consistent with tetracenomycins in *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 and actinomycins (including actinomycin D and analogs) in *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, demonstrating agreement between genetic potential and metabolic expression.

Overall, the results demonstrate that the analyzed Amazonian strains constitute promising sources of bioactive secondary metabolites with potential applications in agricultural and pharmaceutical biotechnology, reinforcing the importance of Amazonian microbial biodiversity for the discovery of new natural products.

Keywords: microorganisms; bacteria; secondary metabolites; Amazon.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alternativas sustentáveis para diminuir a utilização de agroquímicos convencionais têm impulsionado a busca por agentes de biocontrole e compostos naturais com atividade antimicrobiana, principalmente para o manejo de fitopatógenos que causam significativas perdas econômicas na agricultura (NEWMAN e CRAGG, 2020). Com isto, o gênero *Streptomyces* destaca-se como uma fonte proeminente de metabólitos bioativos, sendo responsável pela produção de aproximadamente dois terços dos antibióticos naturais conhecidos, além de diversos compostos com aplicações agrônômicas, farmacêuticas e industriais (BÉRDY, 2012; VAN DER MEIJ et al., 2017; BARANOVA et al., 2023; QUINN e DYSON; 2024).

A biodiversidade microbiana da Amazônia, ainda permanece inexplorada quanto ao seu potencial biotecnológico, especialmente quando se trata de *Streptomyces* spp. de sedimentos aquáticos (THOMPSON et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2025). Estes ambientes, caracterizados por condições físico-químicas peculiares e intensa competição microbiana, podem abrigar linhagens produtoras de metabólitos secundários únicos, adaptados às pressões seletivas locais (THOMPSON et al., 2023).

Os avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) têm revolucionado a descoberta de produtos naturais microbianos, permitindo a identificação de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) e a predição de seus produtos metabólicos, mesmo antes de sua detecção química (BLIN et al., 2023; MULLOWNEY et al. 2023). Esta abordagem, conhecida como mineração genômica, têm revelado que o potencial biossintético de *Streptomyces* é substancialmente maior do que o anteriormente estimado, com numerosos BGCs silenciosos ou crípticos que podem ser ativados sob condições específicas de cultivo (QUINN e DYSON, 2024).

As estratégias como OSMAC (One Strain Many Compounds) também têm sido empregadas para induzir a expressão de vias biossintéticas silenciosas, através da manipulação das condições de cultivo (ROMANO et al., 2018). Quando associada a técnicas analíticas avançadas, como a espectrometria de massas de alta resolução acoplada à cromatografia líquida (UPLC-MS/MS) e à análise por redes moleculares, esta abordagem permite a rápida desreplcação e identificação de metabólitos conhecidos e potencialmente inéditos (WANG et al., 2016; QUINN et al., 2017).

No capítulo anterior, demonstramos que duas linhagens de *Streptomyces* isoladas de sedimentos amazônicos, designadas como *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, apresentaram significativa atividade antagonista contra múltiplas espécies de *Colletotrichum*, especialmente contra *C. scovillei*, agente causal da antracnose em pimenta de cheiro (*Capsicum chinense*), bem como capacidade de promover o crescimento vegetal. Estes resultados preliminares indicam o potencial biotecnológico destas linhagens, justificando uma investigação mais aprofundada de seus perfis genômicos e químicos.

Neste contexto, o presente capítulo tem como objetivo caracterizar o potencial biossintético de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *S. murinus* MPUR 40.3 através de uma abordagem integrada de genômica e metabolômica. Especificamente, buscamos: (i) sequenciar e analisar os genomas completos destas linhagens, com ênfase na identificação de BGCs; (ii) confirmar o status taxonômico de APUR 32.5 como nova espécie através de análises filogenômicas; (iii) extrair e caracterizar os metabólitos secundários produzidos sob diferentes condições de cultivo; (iv) avaliar a atividade antifúngica dos extratos contra fitopatógenos de interesse agrícola; e (v) caracterizar o perfil químico dos extratos bioativos através de UPLC-MS/MS e redes moleculares.

Os resultados desta investigação contribuirá para o conhecimento da diversidade funcional e química de *Streptomyces* amazônicas e poderão identificar novos compostos bioativos com potencial aplicação no controle biológico de fitopatógenos, alinhando-se às demandas contemporâneas por práticas agrícolas mais sustentáveis e à valorização da biodiversidade brasileira como fonte de inovação biotecnológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem da linhagem

As linhagens foram isoladas do rio Purus, no estado do Amazonas, e atualmente pertencem à coleção microbiológica do Laboratório Amazon MicroBiotech, da Embrapa Amazônia Ocidental. Os isolados encontram-se preservados em glicerol a 15% (v/v) e mantidos a -80 °C, conforme descrito em trabalho anterior (SILVA et al., 2025).

2.2 Extração de DNA e Sequenciamento do Genoma

Os isolados foram cultivados em meio de cultura ISP2 e posteriormente crescidos em caldo do mesmo meio. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo

descrito por Doyle e Doyle (1989). A quantificação e a avaliação da pureza do DNA extraído foram realizadas por espectrofotometria em NanoDrop™, considerando-se adequadas amostras com razões A260/A280 entre 1,8 e 2,0 e A260/A230 entre 2,0 e 2,2. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

O genoma completo das linhagens *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 foi sequenciado utilizando a plataforma Illumina, com leituras pareadas de 150 pb (paired-end). A montagem genômica foi conduzida com o software SPAdes (PRJIBELSKI et al., 2020), alcançando uma cobertura média de 103×.

2.3 Análise filogenética baseada no genoma completo

Para determinar o posicionamento taxonômico das duas linhagens de *Streptomyces* (APUR 32.5 e MPUR 40.3) com base nas sequências genômicas, os genomas foram submetidos à plataforma TYGS (Type Strain Genome Server) (<https://tygs.dsmz.de/>). O TYGS utiliza índices genômicos amplamente aceitos para inferência filogenética e classificação taxonômica, como o Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP), que calcula distâncias evolutivas entre genomas com base em comparações de fragmentos genômicos por meio de BLAST, e o digital DNA-DNA Hybridization (dDDH) que simula a hibridização DNA-DNA *in silico* (MEIER-KOLTHOFF et al., 2022; FREESE et al., 2026).

2.4 Mineração Genômica

A prospecção de agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) nos genomas sequenciados foi conduzida por meio da plataforma computacional antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell), em sua versão 8.0. Para maximizar a sensibilidade na detecção de BGCs, a análise foi executada com o parâmetro de rigor de detecção configurado como relaxed, além da ativação de todas as funcionalidades de análise adicionais. As predições automatizadas geradas pelo antiSMASH foram subsequentemente submetidas a um rigoroso processo de curadoria manual. Esta etapa de validação e refinamento foi realizada por meio de análises comparativas com a base de dados MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) e da utilização da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), visando aprimorar a anotação dos genes constituintes dos clusters identificados (BLIN et al., 2025).

Como etapa complementar, os genomas foram submetidos a uma anotação funcional automatizada utilizando os pipelines Bakta (<https://bakta.computational.bio/submit>) e RAST

(Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<https://rast.nmpdr.org/>) (AZIZ et al., 2008; SCHWENGERS et al., 2021; NGUYEN et al., 2025 e SEDEEK et al., 2025). Esses procedimentos permitiram a identificação padronizada de sequências codificadoras de proteínas, RNAs estruturais e outros elementos funcionais associados a diversas vias metabólicas. As informações provenientes dessas anotações foram sistematicamente integradas aos dados de predição de BGCs, o que permitiu a validação cruzada e a contextualização funcional dos genes implicados nas vias biossintéticas de interesse

Para aprofundar a caracterização do potencial biossintético, foram empregadas ferramentas especializadas de mineração genômica. O software PRISM 4 (Prediction Informatics for Secondary Metabolomes) (<https://prism.kapoosecreek.com/>) foi utilizado para prever as estruturas químicas e inferir os metabólitos secundários potencialmente produzidos a partir dos BGCs identificados (SKINNIDER et al., 2020). Além disso, a ferramenta BAGEL 4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) foi especificamente aplicada para a prospecção de clusters relacionados à biossíntese de bacteriocinas e outros peptídeos ribossomais e pós-traducionalmente modificados (RiPPs), compostos de grande interesse biotecnológico (VAN HEEL et al., 2018; HANDAYANI et al., 2022).

A presença de genes de resistência a antibióticos, frequentemente associados a BGCs como mecanismo de autoproteção, foi investigada com o auxílio da ferramenta ARTS (Antibiotic Resistance Target Seeker) (<https://arts.ziemertlab.com/analyze>) (MUNGAN et al. 2020 e MUNGAN et al., 2022). Esta análise permitiu a identificação de potenciais mecanismos de autorresistência vinculados aos agrupamentos gênicos, fortalecendo a hipótese de produção de compostos com atividade antimicrobiana.

Para finalizar, a caracterização funcional detalhada dos genes pertencentes às vias biossintéticas foi complementada por meio de buscas e alinhamentos com as bases de dados públicas GenBank, UniProt, Pfam e PDB (Protein Data Bank), consolidando a confiabilidade das anotações e a inferência do potencial biossintético das linhagens em estudo.

2.5 Extração de Metabólitos Secundários

Os isolados foram cultivados em diferentes meios de cultura com o objetivo de estimular a expressão de clusters crípticos ou silenciados, seguindo a estratégia OSMAC (One Strain Many Compounds) (ROMANO et al., 2018; PINEDO-RIVILLA et al., 2022; ZHANG et al., 2024). As linhagens foram cultivadas nos meios ISP2 (4 g extrato de levedura; 10 g extrato de malte; 4 g dextrose; 20 g ágar), BDA (200 g batata; 20 g dextrose; 15 g ágar) e ágar aveia (20

g aveia; 18 g ágar). Frascos Erlenmeyer contendo 500 mL de meio foram incubados a 28 °C e 150 rpm por cinco dias. Em seguida, os cultivos foram filtrados, e o caldo obtido foi utilizado para a extração dos metabólitos secundários.

A extração foi realizada com acetato de etila, na proporção de 1:1 (v/v), em um processo de três lavagens consecutivas. As frações orgânicas obtidas foram combinadas e concentradas em evaporador rotativo, a 40 °C e 100 rpm, até completa remoção do solvente. O resíduo seco foi ressuspensionado novamente com acetato de etila e transferido para tubos de penicilina previamente pesados e esterilizados, permitindo a determinação da massa total de extrato obtido.

2.6 Perfil químico

A caracterização do perfil químico dos extratos foi conduzida por meio de análises em UPLC-MS/MS (Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry), realizadas no Centro de Análises Químicas da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), com o intuito de identificar e anotar classes de metabólitos secundários produzidos pelas linhagens selecionadas.

Para tal, as amostras foram injetadas em um sistema cromatográfico acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, operando no modo de ionização por eletrospray (ESI – Electrospray Ionization) em ambas as polaridades (positiva e negativa).

2.6.1 Rede Molecular Clássica (MN) utilizando a plataforma GNPS

Para a construção da rede molecular clássica (MN), os arquivos brutos de espectrometria de massas (MS) foram inicialmente convertidos para o formato mzML utilizando o software MSConvert. A análise da MN foi conduzida inteiramente na plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking- <http://gnps.ucsd.edu>), onde os espectros MS² foram alinhados entre si e comparados com a biblioteca espectral do GNPS. Esse alinhamento foi realizado baseado na similaridade dos padrões de fragmentação dos íons precursores nos espectros MS/MS, resultando na formação de nós que representam espectros de consenso MS² (et al., 2016; ARON et al., 2020). As conexões entre os nós (arestas) foram definidas por meio do escore de similaridade consenso, que varia de 0 (sem similaridade) a 1 (espectros idênticos). Cada espectro de consenso foi posteriormente comparado com a biblioteca espectral do GNPS, permitindo a atribuição putativa a moléculas conhecidas (WANG et al., 2016). A rede molecular obtida a partir dos extratos de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* APUR 40.3 foi visualizada com o software Cytoscape.

Para a criação da rede molecular clássica, os dados foram inicialmente filtrados para remover todos os íons fragmentos MS/MS localizados dentro de uma janela de ± 17 Da em relação ao m/z do íon precursor. Em seguida, os espectros MS/MS foram filtrados por janela, sendo selecionados apenas os seis principais íons fragmentos em uma faixa de ± 50 Da ao longo de todo o espectro. A tolerância de massa para os íons precursores foi estabelecida em 0,02 Da, e a tolerância para os íons fragmentos MS/MS também foi fixada em 0,02 Da.

A rede foi construída considerando apenas conexões (arestas) com escore cosseno superior a 0,7 e com, no mínimo, quatro picos coincidentes. Além disso, as conexões entre dois nós foram mantidas na rede apenas se cada nó estivesse entre os dez nós mais similares do outro. O tamanho máximo permitido para cada família molecular foi definido como 100 nós; arestas com escores mais baixos foram progressivamente removidas até que esse limite fosse respeitado. Por fim, os espectros presentes na rede foram comparados com as bibliotecas espectrais do GNPS. As bibliotecas foram submetidas ao mesmo processo de filtragem aplicado aos dados experimentais, sendo considerados apenas os espectros que apresentaram escore superior a 0,7 e pelo menos quatro picos coincidentes para que a correspondência fosse mantida (WANG et al., 2016)

3. RESULTADOS

3.1. Análise filogenômica

O genoma de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 apresentou tamanho total de 8.219.677 pares de bases (pb) e elevado conteúdo de G+C (72,3%), característica típica de espécies do gênero *Streptomyces*. A anotação genômica previu 7.780 genes, dos quais 7.247 correspondem a sequências codificadoras (CDSs). A análise de hibridização DNA–DNA digital (dDDH) revelou valor de 55,1% (fórmula d4) em comparação com *Streptomyces costaricanus* DSM 41827^T, abaixo do limiar de 70% estabelecido para delimitação de espécies bacterianas, indicando que a linhagem APUR 32.5 pode representar uma nova espécie (Tabela Suplementar S1).

De forma semelhante, o genoma de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 apresentou tamanho de 8.362.828 pb e conteúdo de G + C de 71,8%. A anotação genômica identificou 7.547 sequências codificadoras (CDSs), evidenciando a complexidade genética e o elevado potencial metabólico dessa linhagem. A análise de dDDH demonstrou valor elevado de similaridade genômica (84,5% pela fórmula d4) em relação a *Streptomyces costaricanus* NBRC 100773^T, (sinônimo taxonômico relacionado de *Streptomyces murinus*), superando o limiar de

70% adotado para a delimitação de espécies, corroborando com sua afiliação taxonômica (Tabela Suplementar S1).

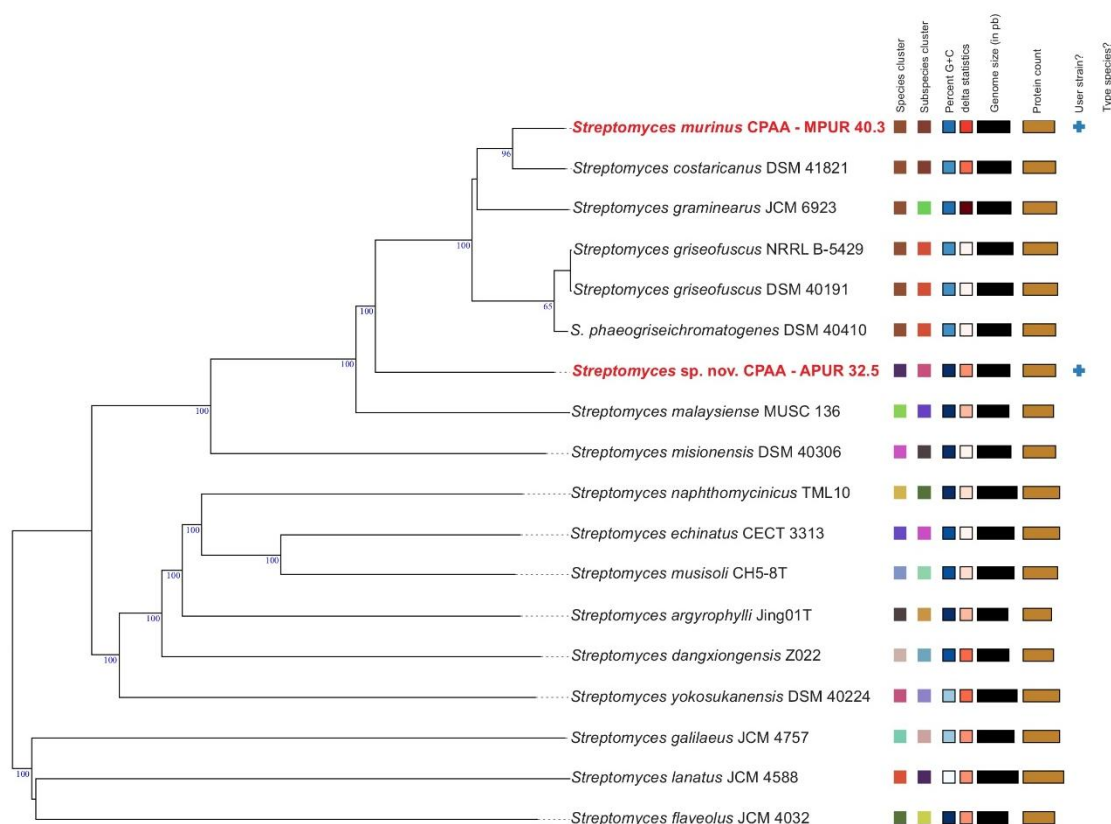


Figura 1. Árvore filogenômica inferida para linhagens do gênero *Streptomyces*, destacando as cepas *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 e *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 (em vermelho).

3.2 Anotação genômica e integração das ferramentas de predição de BGCs

3.2.1 *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5

A integração das plataformas antiSMASH, PRISM e Bakta da linhagem *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5, permitiu uma caracterização abrangente e complementar do seu potencial biossintético. Embora baseadas em abordagens analíticas distintas, essas ferramentas convergiram na identificação de um amplo, diverso e funcionalmente coerente repertório de clusters de genes biossintéticos (BGCs), reforçando o elevado potencial metabólico da linhagem.

A análise genômica realizada com o antiSMASH revelou a presença de mais de 50 regiões correspondentes a clusters de genes biossintéticos (BGCs), incluindo PKS, NRPS,

terpenos, sideróforos e outras classes (Figura 2A). Entre os BGCs identificados, destacam-se clusters altamente conservados e amplamente descritos na literatura, associados à biossíntese de ectoína, geosmina, A-factor (butirolactona), tetracenomicina C, pentamicina/filipina, hopenoides e albaflavenona.

Esses clusters apresentaram elevada similaridade com BGCs depositados em bases de dados de referência, indicando a conservação de rotas metabólicas fundamentais, relevantes tanto para a fisiologia e adaptação ecológica da linhagem quanto para a produção de metabólitos secundários bioativos. A caracterização detalhada desses BGCs encontra-se descrita na Tabela Suplementar S2.

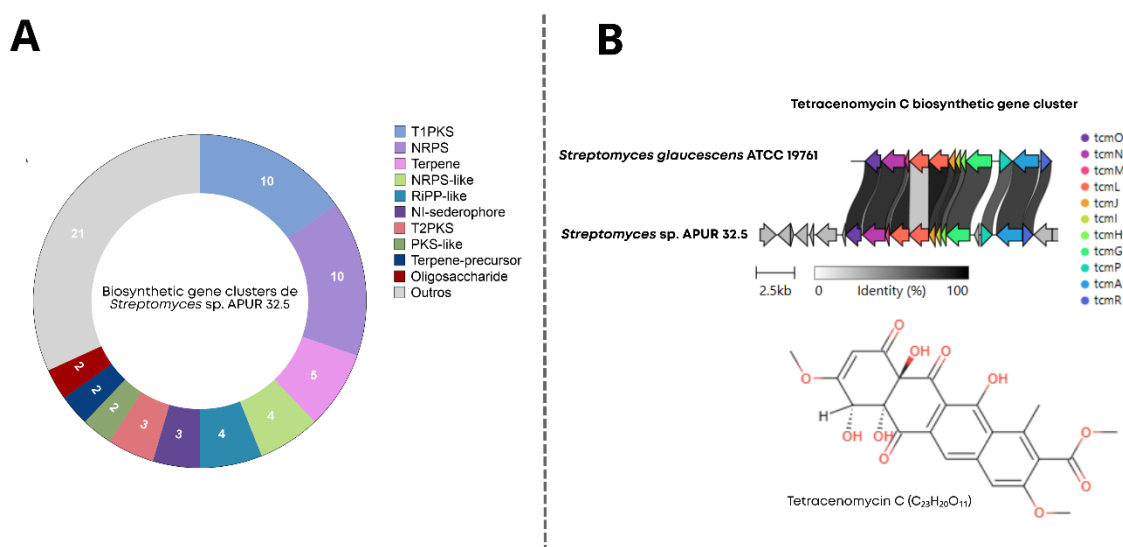


Figura 2. (A) Distribuição das classes de clusters de genes biossintéticos (BGCs) identificados no genoma de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 por meio da análise com antiSMASH. O gráfico em anel representa o número de clusters preditos por classe, incluindo PKS, NRPS, híbridos, terpenos, RiPPs e outras categorias. (B) Comparação de sintenia do cluster gênico biossintético de tetracenomicina C entre *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *Streptomyces glaucescens* ATCC 19761. As setas coloridas representam genes homólogos organizados de acordo com suas funções preditas, enquanto as conexões em cinza indicam a identidade pareada de aminoácidos entre proteínas ortólogas. A escala em gradiente representa a porcentagem de identidade. A estrutura química da tetracenomicina C ($C_{23}H_{20}O_{11}$) é apresentada abaixo.

Além disso, a plataforma PRISM identificou 33 clusters de genes biossintéticos, com ênfase na predição estrutural dos metabólitos potencialmente produzidos. Os clusters preditos abrangem policetídeos (PKS), peptídeos não ribossomais (NRPS), sistemas híbridos PKS–NRPS, RiPPs, sideróforos e moléculas regulatórias. Destacam-se a predição de policetídeos aromáticos estruturalmente complexos, como um policetídeo polifenólico pentangular e um composto do tipo tetracenomicina, corroborando os clusters de PKS do tipo II previamente

identificados pelo antiSMASH. O PRISM também indicou clusters associados à biossíntese de NRPs contendo motivos estruturais específicos, bem como RiPPs, incluindo lasso peptídeos, tiopeptídeos e lantipeptídeos das classes II, III e IV. A visão geral dos clusters preditos pelo PRISM encontra-se apresentada na Tabela Suplementar S3.

Com o objetivo de aprofundar a caracterização do cluster associado à biossíntese de tetracenomicina C, foi realizada uma análise de sintenia comparativa entre o BGC identificado na linhagem APUR 32.5 e clusters de referência previamente descritos para a produção desse antibiótico aromático policíclico. A análise revelou elevada conservação na organização gênica e na orientação dos principais genes biossintéticos, incluindo aqueles codificadores das subunidades da policetídeo sintase do tipo II (tcmA e tcmB), bem como genes acessórios envolvidos em etapas de ciclização, aromatização e modificação do esqueleto policíclico (tcmG, tcmP, tcmM, tcmN e tcmO) (Figura 2B). A alta identidade de sequência e a conservação sintênica desses genes reforçam a robustez das predições obtidas pelo antiSMASH e PRISM e indicam que o cluster identificado em *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 é funcionalmente equivalente aos BGCs clássicos de tetracenomicina C.

A anotação funcional realizada pelo Bakta forneceu suporte molecular direto às predições baseadas em clusters, ao identificar, em nível gênico, os principais elementos enzimáticos associados às vias biossintéticas detectadas. Foram anotados múltiplos genes codificadores de policetídeo sintase (PKS) e Peptídeos não ribossomais (NRPS), incluindo sistemas modulares de PKS do tipo I e genes associados à biossíntese de policetídeos aromáticos. Adicionalmente, foram identificados genes relacionados à biossíntese de bacteriocinas, lantibióticos e enzimas hidrolíticas, como quitinases, reforçando o potencial da linhagem para aplicações em biocontrole. A lista completa dos genes biossintéticos anotados pelo Bakta está apresentada na Tabela Suplementar S4.

A anotação automática realizada pelo RAST corroborou de forma independente com o elevado potencial biossintético da linhagem APUR 32.5, ao evidenciar a ampla representação de subsistemas genômicos associados ao metabolismo secundário (Figura 3). Foram também identificados genes relacionados à biossíntese de policetídeos, incluindo módulos de policetídeo sintase, fatores de comprimento de cadeia (*chain length factors* – CLF), ciclases e hidroxilases típicas de sistemas PKS do tipo II, bem como reguladores transcricionais associados à expressão de genes biossintéticos. O RAST ainda anotou genes envolvidos na biossíntese de sideróforos dependentes e independentes de NRPS, proteínas acessórias do tipo

MbtH e componentes de sistemas de transporte ABC para a captação de complexos Fe^{3+} -sideróforo (Tabela Suplementar S5).

Por fim, a plataforma BAGEL identificou sete Áreas de Interesse (AOIs) associadas à biossíntese de RiPPs, classificadas como sactipeptídeos, lasso peptídeos, LAPs, botromicina e lantipeptídeos da classe IV. Todos os clusters apresentaram status indefinido, sugerindo potencial para a produção de RiPPs ainda não caracterizados e/ou anotados (Tabela Suplementar S5).

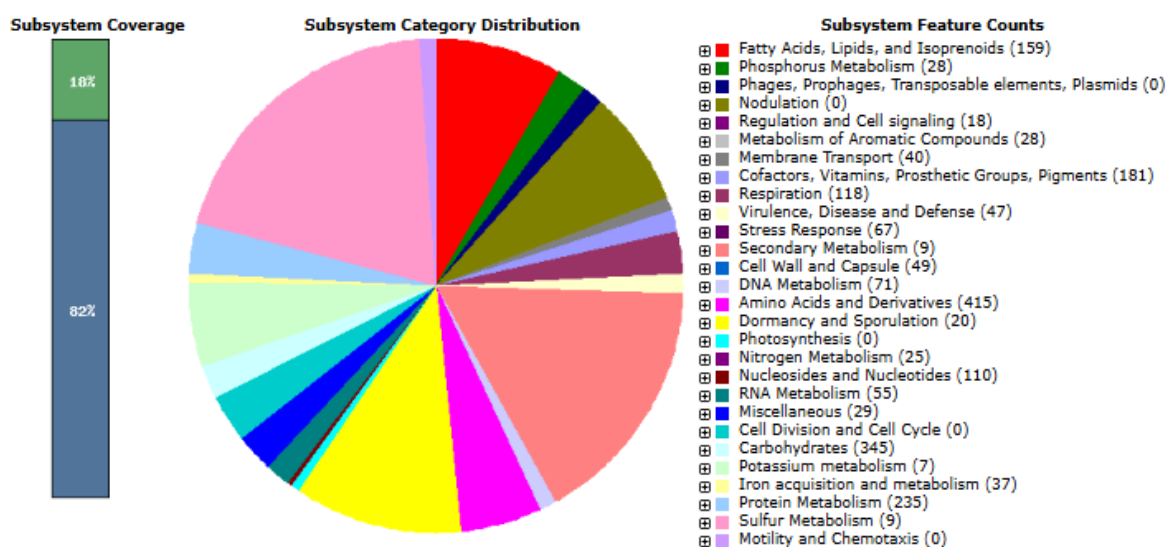


Figura 03. Classificação funcional baseada em subsistemas das proteínas de *Streptomyces* sp. APUR 32.5. As categorias de subsistemas foram anotadas utilizando o servidor RAST e visualizadas por meio do SEED Viewer. No painel de cobertura dos subsistemas, a barra verde representa a porcentagem de genes atribuídos a subsistemas (18%), enquanto a barra azul indica os genes não atribuídos a subsistemas (82%). O gráfico de setores central ilustra a distribuição das categorias de subsistemas com base na contagem de genes, apresentada na listagem à direita. Os números entre parênteses indicam o total de genes associados a cada categoria funcional.

3.2.2 *Streptomyces murinus* MPUR 40.3

A linhagem *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 apresentou, na análise pelo antiSMASH, aproximadamente 45 regiões biossintéticas preditas, incluindo clusters dos tipos PKS, NRPS, sideróforos e lantipeptídeos (Figura 4A). Entre os metabólitos com alta similaridade a compostos previamente descritos, destacam-se actinomicina D, pentamicina, geosmina, leupeptinas, desferrioxamina, albusnodina, rhizomidas e flaviolina, os quais estão associados a atividades antibióticas, citotóxicas ou siderofóricas (Tabela Suplementar S1).

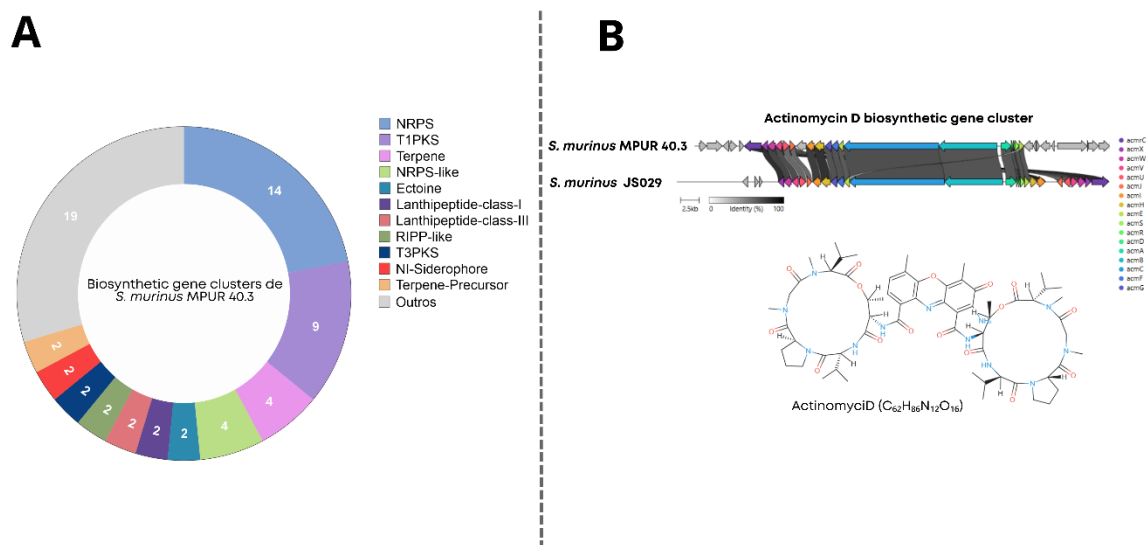


Figura 04. (A) Distribuição das classes de clusters de genes biossintéticos (BGCs) identificados no genoma de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 por meio da análise com antiSMASH. O gráfico em anel representa o número de clusters preditos por classe, incluindo NRPS, PKS, híbridos, terpenos, RiPPs e outras categorias. (B) Comparação de sintenia do cluster gênico biossintético de actinomicina D entre *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 e *Streptomyces murinus* JS029.

A prospecção genômica por meio do PRISM revelou que o isolado MPUR 40.3 possui um arsenal biossintético, totalizando 34 clusters de genes biossintéticos (BGCs), com predomínio de peptídeos não ribossomais (NRPS) e policetídeos (PKS). Foram identificados 11 clusters exclusivos de NRPS, seis de PKS e quatro híbridos PKS/NRPS, indicando uma versatilidade metabólica para a síntese de moléculas complexas associadas à defesa química e à sinalização ecológica. Além disso, no Cluster 4 foi identificado um gene regulador do tipo TetR, localizado na região associada à biossíntese de actinomicina D, mostrando possível papel na regulação da expressão desse metabólito secundário, reforçando as análises do antiSMASH. Também foram detectados clusters relacionados à biossíntese de ectoína, indicando adaptação ao estresse osmótico, e sideróforos independentes de NRPS (NIS), ressaltando estratégias eficientes de aquisição de ferro. A presença de clusters para lantipeptídeos (classes I, II e III/IV), peptídeos lasso e tiopeptídeos, além de vias para melanina e butirolactonas (Tabela Suplementar 7).

A anotação complementar realizada pelo Bakta identificou múltiplos *locus tags* associados a PKS e NRPS, incluindo um complexo sistema de PKS tipo I e genes envolvidos

na biossíntese de policetídeos aromáticos. Também foram detectados genes relacionados à produção de bacteriocinas e lantibióticos, além de múltiplas cópias de quitinases, o que pode estar associado ao potencial antifúngico e nematicida da linhagem. O Bakta identificou ainda genes relacionados à produção de alfa-amilase, numerosas proteases e serino-proteases da família Rhomboid, sugerindo redundância funcional que pode aumentar a eficiência na degradação de matéria orgânica no solo. No contexto da interação planta–microrganismo, foram confirmados sistemas eficientes de transporte de ferro, fosfotransferases envolvidas no metabolismo nutricional e enzimas potencialmente relacionadas à modulação hormonal vegetal, incluindo citocinina ribosídeo 5'-monofosfato fosforibohidrolase (Tabela Suplementar 8).

A anotação funcional realizada com RAST indicou uma forte capacidade para biocontrole, com a identificação de genes essenciais para a síntese de metabólitos secundários e proteínas com atividades antifúngica e nematicida. Destacam-se módulos de *polyketide synthases* (PKS) e *non-ribosomal peptide synthetases* (NRPS), além de transportadores de efluxo de bacteriocinas/lantibióticos, sugerindo a biossíntese ativa de compostos antimicrobianos. A presença de quitinases reforça o potencial de degradação da parede celular de fungos e de estruturas quitinosas de nematoides. O genoma também revelou uma ampla bateria enzimática associada à degradação de polímeros orgânicos, corroborando com as atividades hidrolíticas observadas em trabalhos anteriores. Foram identificados genes relacionados à produção de alfa-amilases, glucoamilases, lipases, diversas proteases e beta-glicosidases, indicando capacidade para degradação eficiente de amido, lipídios, proteínas e celulose no ambiente do solo. Além disso, a linhagem apresenta características genéticas compatíveis com promoção do crescimento vegetal, incluindo sistemas completos de transporte de ferro-sideróforos, genes da via do triptofano associados à produção de ácido indol-acético (AIA) e enzimas relacionadas ao metabolismo de fosfatos, sugerindo capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e aumento da disponibilidade de nutrientes para plantas hospedeiras (Tabela Suplementar 9).

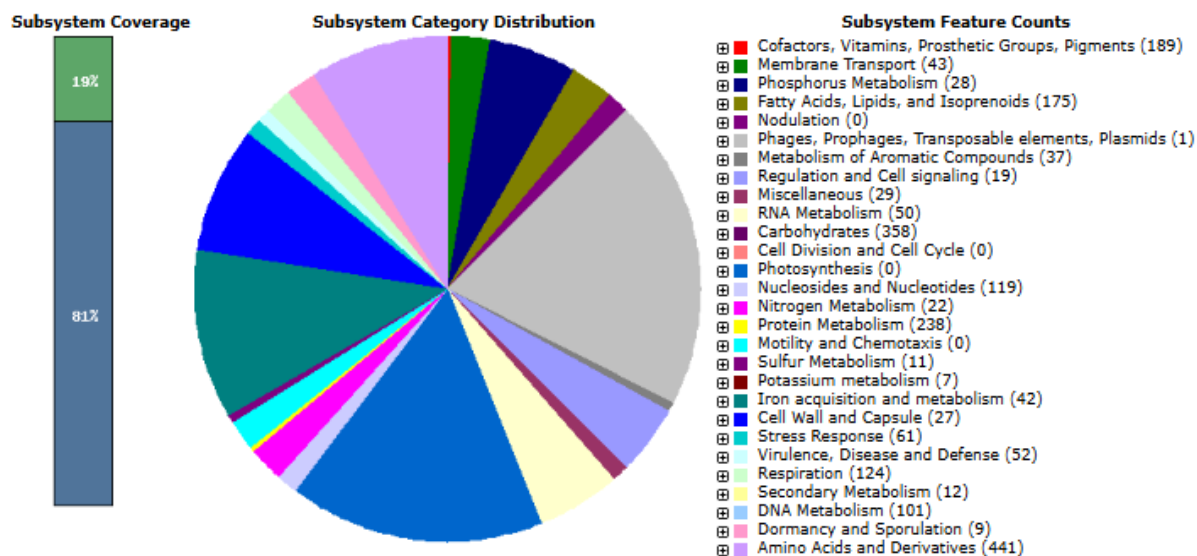


Figura 05. Classificação funcional baseada em subsistemas das proteínas de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3. As categorias de subsistemas foram anotadas utilizando o servidor RAST e visualizadas por meio do SEED Viewer. No painel de cobertura dos subsistemas, a barra verde representa a porcentagem de genes atribuídos a subsistemas (19%), enquanto a barra azul indica os genes não atribuídos a subsistemas (83%). O gráfico de setores central ilustra a distribuição das categorias de subsistemas com base na contagem de genes, apresentada na listagem à direita. Os números entre parênteses indicam o total de genes associados a cada categoria funcional.

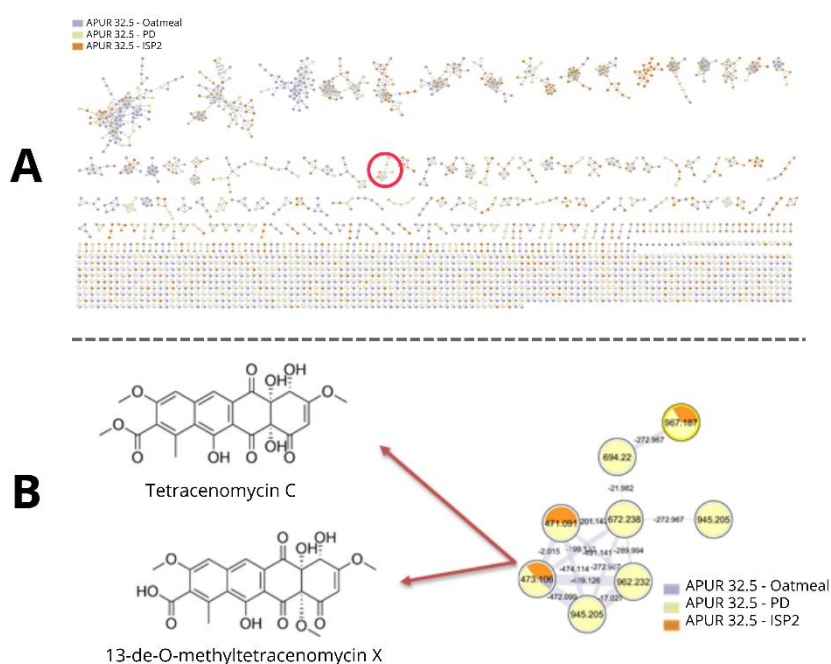
A análise pelo ARTS identificou genes candidatos à resistência associados a regiões biossintéticas do genoma. Entre eles, observou-se correspondência com o Cluster 5.1, classificado pelo antiSMASH como um BGC híbrido contendo domínios T1PKS e lantipeptídeo classe III, sem similaridade detectável com clusters conhecidos na base de dados. A presença de determinantes de resistência na mesma região sugere um possível mecanismo de autoproteção associado a esse cluster biossintético.

Além disso, a análise específica de RiPPs por meio da ferramenta BAGEL identificou 10 Áreas de Interesse (AOIs) dedicadas à biossíntese de peptídeos modificados pós-traducionalmente. Observou-se abundância de lantipeptídeos da classe IV (4 AOIs), sugerindo uma especialização em bacteriocinas estruturalmente complexas e estáveis. A identificação de um cluster para Botromicina no NODE_15 é de alto valor biotecnológico, dado o seu potencial contra patógenos multirresistentes através da inibição do sítio A do ribossomo bacteriano.

3.3 Perfil químico

3.3.1 Rede molecular de *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5

Foi construída uma rede molecular clássica a partir da análise de MS/MS dos extratos de *Streptomyces* sp. nov. APUR32.5 cultivado em três meios distintos (Aveia, BD e ISP2). Entre as redes obtidas, destaca-se um cluster específico, presente em todos os extratos brutos analisados (Figura 6A). As análises por LC–HRMS corroboram esse agrupamento, evidenciando no cluster destacado (Figura 6B) o íon m/z 473.1065 ($[M+H]^+$), com tempo de retenção (RT) de 7,7 min, detectado em todos os meios de cultivo avaliados (Aveia, BD e ISP2).

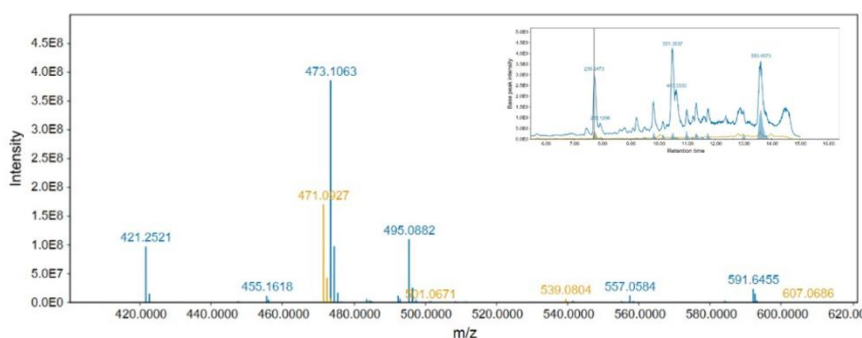


A observação simultânea dos íons protonado e desprotonado, juntamente com o aduto sodiado, todos com erros inferiores a 5 ppm, é compatível com medições de alta resolução em Orbitrap e sustenta a anotação putativa baseada em massa exata (Figura 7A).

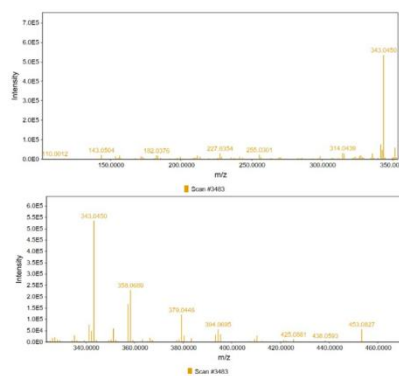
A fragmentação MS² do precursor m/z 471.0927 (ESI⁻) revelou um padrão característico de policetídeos aromáticos altamente oxigenados, com fragmentos diagnósticos em m/z 453.0827 (perda de H₂O), 438.0593, 425.0881, 394.0695, 379.0446, 358.0689 e um fragmento base em m/z 343.0450, além de fragmentos adicionais em m/z 314.0439, 255.0301, 227.0354, 182.0376, 143.0504 e 110.0012 (Figura 7B).

Esse padrão de fragmentação, incluindo perdas neutras típicas (H₂O e combinações envolvendo CO/CO₂) e a formação de fragmentos aromáticos estáveis, é compatível com o esqueleto quinônico policíclico descrito para tetracenomicinas e seus congêneres, como a tetracenomicina C e a 13-de-O-metil-tetracenomicina X. Embora a ausência de espectros MS² de referência impeça a atribuição inequívoca em nível estrutural, a concordância entre os íons detectados nos modos ESI positivo e negativo, o padrão de fragmentação observado e a coeluição dos adutos reforçam a anotação do composto como um policetídeo do tipo tetracenomicina.

A



B



C

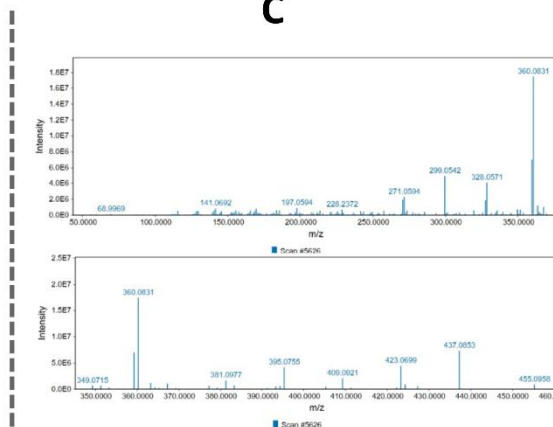


Figura 7. (A) Espectros de LC–HRMS obtidos nos modos de ionização positivo (azul) e negativo (amarelo) no tempo de retenção de 7,7 min, referentes ao extrato de *Streptomyces* sp. nov. APUR32.5 cultivado em meio BD. (B) Espectro de fragmentação MS² do íon precursor m/z 471.0927 (ESI⁻) detectado em *Streptomyces* sp. nov. APUR32.5. (C) Espectro de fragmentação MS² do íon precursor m/z 473.1023 (ESI⁺) detectado em *Streptomyces* sp. nov. APUR32.5.

Além do MS² obtido em modo negativo, também foi adquirido o espectro de fragmentação em modo positivo (ESI⁺) para o precursor associado ao sinal em RT 7,7 min (m/z 473.1063, [M+H]⁺). O espectro MS² em ESI⁺ apresentou fragmentos de alta intensidade em m/z 455.0958, 437.0853, 423.0699, 409.0921, 395.0755 e 381.0977, além de um fragmento base em m/z 360.0831. Também foram observados fragmentos adicionais em m/z 349.0715, 328.0571, 299.0542, 271.0594, 228.2372, 197.0594, 141.0692 e 68.9969 (Figura 7c).

No modo negativo, o precursor correspondente (m/z 471.0927, [M-H]⁻) apresentou um espectro MS² com múltiplos fragmentos distribuídos ao longo do espectro, incluindo íons aromáticos de baixa massa e fragmentos intermediários de maior intensidade, conforme apresentado anteriormente.

Os dados de MS¹ indicaram a detecção do sinal no mesmo tempo de retenção (RT 7,7 min) nos modos positivo e negativo, incluindo os íons [M+H]⁺ (m/z 473.1063), [M+Na]⁺ (m/z 495.0882) e [M-H]⁻ (m/z 471.0927), todos coeluído no mesmo pico cromatográfico.

Além disso, a análise genômica revelou a presença de um cluster biossintético do tipo PKS II no genoma do isolado, cuja organização gênica apresenta alta similaridade com clusters previamente descritos para a biossíntese de tetracenomicinas.

3.3.2 Rede molecular de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3

A rede molecular clássica revelou um agrupamento robusto correspondente à família das actinomicinas. Esta evidência química corrobora perfeitamente a análise de sintenia realizada no Painel B da Figura 4, onde o cluster biossintético da actinomicina D apresentou alta conservação com a linhagem de referência *S. murinus* JS029. A detecção simultânea de análogos como actinomicina X₂ e actinomicina X0β sugere uma flexibilidade enzimática na incorporação de precursores peptídicos, característica comum em sistemas NRPS de *Streptomyces*. Todas as actinomicinas foram detectadas nos três meios de cultivo avaliados

(Aveia, BD e ISP2), conforme indicado pela distribuição dos nós na rede molecular (Figura 8A).

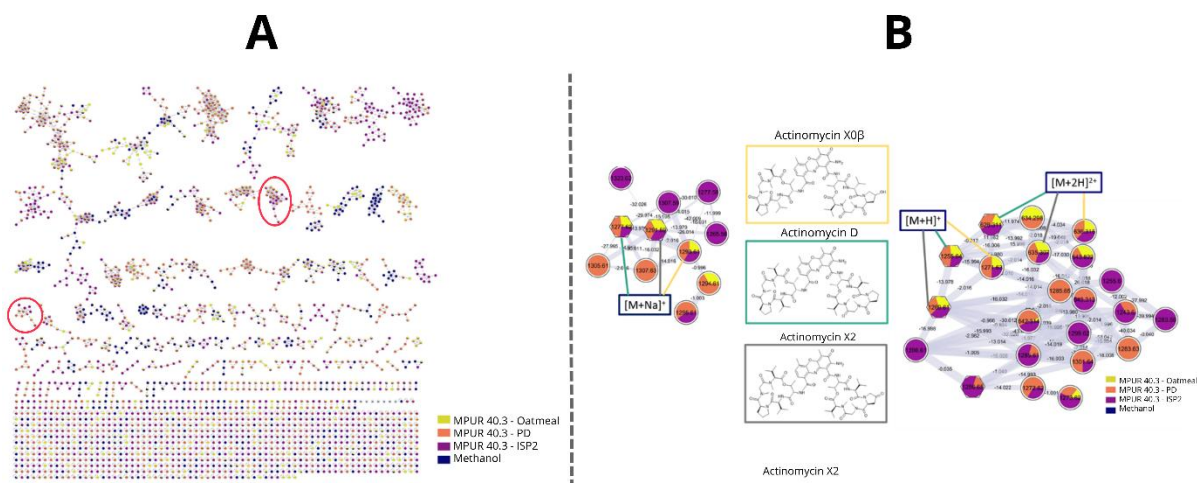


Figura 8. (A) Rede molecular clássica construída no GNPS (modo ESI positivo), obtida a partir dos dados de espectrometria de massas tandem (MS/MS) dos extratos brutos de *Streptomyces murinus* MPUR40.3 cultivados nos meios Aveia (amarelo), BD (laranja) e ISP2 (roxo). Estão destacados dois clusters contendo íons associados às actinomicinas. (B) Ampliação da rede molecular clássica dos extratos de *S. murinus* MPUR40.3, evidenciando o agrupamento das actinomicinas em dois clusters principais: (i) um cluster lateral dominado por adutos sodiados $[M+Na]^+$ e (ii) um cluster contendo predominantemente íons protonados $[M+H]^+$ e seus correspondentes íons duplamente carregados $[M+2H]^{2+}$. A coloração dos nós indica o meio de cultivo de origem (Aveia, BD e ISP2). Os nós correspondentes às actinomicinas X0β, D e X2 estão destacados nas cores amarelo, verde e cinza, respectivamente.

Para a actinomicina D, foram observados os íons m/z 1255.6346 ($[M+H]^+$), 1277.6160 ($[M+Na]^+$) e 628.3210 ($[M+2H]^{2+}$), com tempo de retenção de 9,67 min e fórmula molecular $C_{62}H_{87}N_{12}O_{16}$ (Figura 9A; Tabela Suplementar 11). O espectro MS/MS apresentou fragmentos em m/z 169, 203, 239, 282, 300, 348, 394, 431, 459 e 558, além de sinais na região m/z 829, 857, 875, 902 e 928 (Figura 9A). Os espectros exibiram altos valores de similaridade no GNPS, com MQScores de 0.87741 para $m/z \sim 1255.64$, 0.8799 para $m/z \sim 1277.62$ e 0.770221 para $m/z \sim 628.31$.

Para a actinomicina X₂, foram detectados os íons m/z 1269.6130 ($[M+H]^+$), 1291.5945 ($[M+Na]^+$) e 635.3107 ($[M+2H]^{2+}$), com tempo de retenção de 9,67 min e fórmula molecular $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$ (Figura 9B; Tabela S1). O GNPS indicou alta similaridade espectral para esse

análogo, com MQScores de 0.8637 para $m/z \sim 1269.61$ e 0.8143 para $m/z \sim 1291.59$. O espectro MS/MS revelou fragmentos em m/z 203, 300, 348, 394, 431, 459, 530, 558 e 657, além de sinais na região m/z 829–928 (Figura 9B).

Um terceiro nodo foi atribuído à actinomicina X0 β , apresentando precursor em m/z 1271.6301 ($[M+H]^+$), aduto sodiado em m/z 1293.6119 ($[M+Na]^+$) e íon duplamente carregado em m/z 636.3188 ($[M+2H]^{2+}$), com tempo de retenção de 9,43 min e fórmula molecular C₆₂H₈₆N₁₂O₁₇ (Figura 9C; Tabela Sx1). O espectro MS/MS exibiu fragmentos em m/z 437 e 274, além de sinais de maior massa em m/z 829, 857, 873, 900, 928, 944, 956 e 972 (Figura 9C).

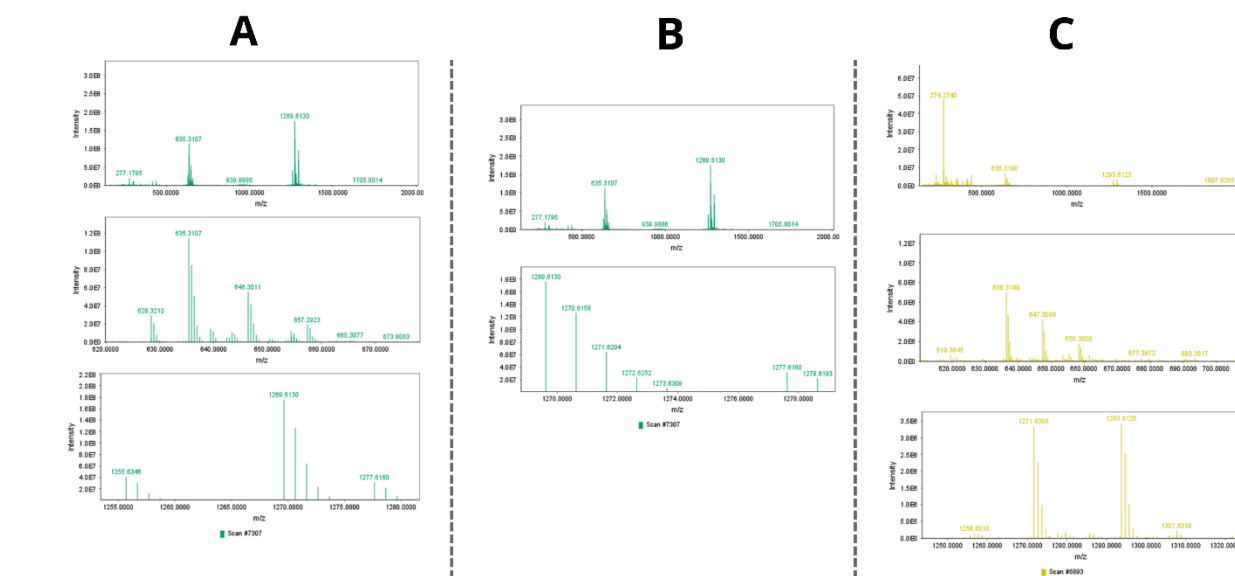


Figura 9. (A) Espectros de LC–HRMS do composto anotado como actinomicina D, detectado no extrato de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 cultivado em meio BD. (B) Espectros de LC–HRMS do composto anotado como actinomicina X₂, detectado no extrato de *S. murinus* MPUR 40.3 cultivado em meio BD. (C) Espectros de LC–HRMS do composto anotado como actinomicina X0 β , detectado no extrato de *S. murinus* MPUR 40.3 cultivado em meio Aveia.

Em todos os três compostos, foi observado um fragmento dominante em $m/z \sim 857$, com desvios entre $-2,2$ e $-3,9$ ppm em relação ao valor de referência. Também foram detectadas microvariações nesse íon e em fragmentos relacionados, incluindo $m/z \sim 871$, ~ 873 e ~ 875 (Figura 10). Esses sinais apresentaram alta similaridade espectral entre os compostos e contribuíram para o agrupamento em um único cluster na rede molecular do GNPS.

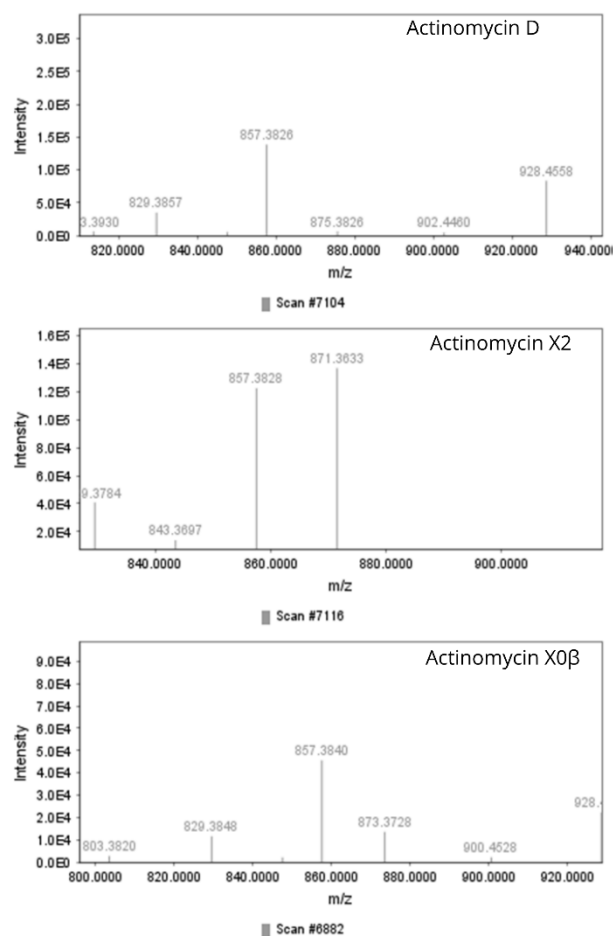


Figura 10. Espectros de LC-HRMS-MS de actinomicinas de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 em meio de aveia.

4. DISCUSSÃO

O gênero *Streptomyces* é conhecido como biofábrica de metabólitos secundários, amplamente reconhecido como uma das principais fontes de metabólitos secundários bioativos, incluindo antibióticos, antifúngicos, imunossupressores e outros compostos com aplicações agrícolas e farmacêuticas (ALAM et al., 2022; DONALD et al., 2022; LACEY e RUTLEDGE, 2022; HOSHINO, 2025). Estudos genômicos demonstram que espécies desse gênero apresentam genomas extensos, ricos em GC e contendo dezenas de clusters de genes biossintéticos (BGCs), muitos dos quais permanecem criptos ou pouco expressos em condições laboratoriais, evidenciando um potencial químico ainda subexplorado (KOMAKI, 2023; HOSHINO, 2025; SHIL et al., 2026).

A análise filogenômica mostrou a distinção taxonômica entre as linhagens, indicando que APUR 32.5 representa potencialmente uma nova espécie, enquanto MPUR 40.3 apresenta alta similaridade com *Streptomyces murinus*. Essa espécie é reconhecida como produtora de metabólitos secundários bioativos, incluindo actinomicinas e outros compostos típicos de actinomicetos, como inibidores de protease e sideróforos, estando também associada à produção de substâncias com atividade antifúngica (Barka et al., 2016; Das et al., 2023; Nguyen et al., 2025).

A prospecção genômica revelou um repertório biossintético amplo em ambas as linhagens, incluindo clusters PKS, NRPS, híbridos PKS–NRPS, terpenos, sideróforos e RiPPs. Esse padrão concorda com estudos comparativos demonstrando que genomas de *Streptomyces* frequentemente contêm mais BGCs do que metabólitos detectados experimentalmente, reforçando a importância da mineração genômica para descoberta de produtos naturais (LEE et al., 2020; ALAM et al., 2023).

No caso da linhagem *Streptomyces* APUR 32.5, a análise integrada por antiSMASH e PRISM mostrou a concordância entre a arquitetura genética dos clusters biossintéticos e as classes químicas previstas. Enquanto o antiSMASH permitiu a classificação baseada na organização gênica e similaridade com clusters conhecidos, o PRISM refinou essas inferências ao prever características estruturais dos produtos finais, incluindo policetídeos aromáticos pentangulares, tetracenomicinas e peptídeos não ribossômicos contendo motivo furânico.

A correspondência entre o cluster do tipo “tetracenomycin-type polyketide” previsto pelo PRISM e o BGC T2PKS identificado pelo antiSMASH, com alta similaridade ao cluster de tetracenomicina C, fortalece a associação entre potencial genético e biossíntese prevista. Essa convergência entre as ferramentas independentes exemplifica como abordagens complementares podem reduzir ambiguidades na associação entre genes e metabólitos (TAMANG et al., 2024).

A relevância dessa predição é reforçada pelos dados metabolômicos obtidos por LC–HRMS/MS e redes moleculares, nos quais foi detectado um metabólito compatível com a família das tetracenomicinas. A integração entre genômica e metabolômica tem sido amplamente reconhecida como estratégia robusta para estabelecer conexões entre vias biossintéticas e produtos detectados experimentalmente, aumentando a confiabilidade das anotações estruturais mesmo na ausência de padrões autênticos (ARON et al., 2020; SCHMID et al., 2023). A presença do mesmo cluster molecular nos diferentes meios de cultivo indica que

a produção do metabólito associado ao íon m/z 473.1065 é consistente na linhagem APUR 32.5, sugerindo biossíntese relativamente estável sob as condições avaliadas. A anotação putativa desse composto como pertencente à família das tetracenomicinas é sustentada pela concordância entre massa exata, coeluição dos adutos $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M-H]^-$ e pelos espectros MS^2 obtidos em modos positivo e negativo. Fragmentos aromáticos estáveis e perdas neutras típicas envolvendo H_2O , CO e CO_2 são compatíveis com o comportamento de fragmentação descrito para policetídeos quinônicos policíclicos altamente oxigenados, incluindo tetracenomicina C e congêneres (LIU et al., 2018; ALFEROVA et al., 2022).

Além disso, a identificação de um cluster PKS tipo II altamente similar ao envolvido na biossíntese de tetracenomicina C fornece suporte independente para a produção desse tipo de policetídeo pela linhagem APUR 32.5. Sistemas PKS tipo II são classicamente associados à biossíntese de policetídeos aromáticos policíclicos e apresentam organização genética conservada entre espécies de *Streptomyces* (van der HEUL et al., 2018; ALFEROVA et al., 2022).

Para *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, a presença de clusters associados à biossíntese de actinomicinas e a detecção metabolômica de actinomicina D e análogos demonstram correspondência entre potencial genômico e expressão metabólica. As actinomicinas constituem uma classe clássica de cromopeptídeos antibióticos produzidos por *Streptomyces* sp., caracterizados por núcleo fenoxazinônico ligado a cadeias peptidolactônicas cíclicas, responsáveis por sua potente atividade antimicrobiana e citotóxica (QURESHI et al., 2021; NUANJOHN et al., 2023).

A integração das análises por antiSMASH, PRISM, BAGEL, RAST e ARTS permitiu aqui, identificar relações entre clusters biossintéticos e possíveis determinantes genéticos de autorresistência. Essas estratégias que combinam múltiplas ferramentas de mineração genômica têm sido amplamente utilizadas para aumentar a precisão na predição de metabólitos secundários e priorização de BGCs candidatos para validação experimental (TAMANG et al., 2024). Entre os BGCs detectados, o Cluster 5.1 destacou-se por apresentar uma arquitetura híbrida contendo domínios T1PKS e NRPS-like, além da associação com genes de resistência preditos pelo ARTS. A análise por essa plataforma mostrou uma assinatura genômica de autorresistência altamente específica para este cluster. A presença de uma cópia adicional do gene GAPDH-I (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) inserida no interior do BGC sugere que o metabólito potencialmente produzido, possivelmente um composto híbrido envolvendo

módulos T1PKS e peptídicos, possa ter como alvo a via glicolítica. Este mecanismo de gene-alvo duplicado é uma estratégia evolutiva clássica em microrganismos para evitar a autotoxicidade (YUAN et al., 2025).

A robustez adaptativa de *S. murinus* MPUR 40.3 é destacada pela integração entre seu metabolismo secundário e sistemas de destoxificação. A identificação de genes associados à homeostase de metais, como o operon *copZA* e reguladores da família MerR, nos sugere que esta linhagem evoluiu para prosperar em sedimentos amazônicos sob pressão seletiva química. Notavelmente, a produção de melanina (identificada via PRISM) e de sideróforos como a desferrioxamina (confirmada via ARTS/antiSMASH) pode atuar como uma estratégia de defesa passiva, quelando metais pesados e reduzindo o estresse oxidativo intracelular, permitindo que a célula direcione energia para a biossíntese de antibióticos complexos como as actinomicinas .

De forma geral, os resultados obtidos demonstram que *Streptomyces* sp. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 possuem genomas ricos e funcionalmente coerentes em clusters biossintéticos. APUR 32.5 destaca-se pela diversidade de BGCs associados a policetídeos aromáticos, enquanto MPUR 40.3 apresenta metabolismo secundário diversificado incluindo BGCs clássicos, sistemas híbridos e múltiplos RiPPs.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as linhagens amazônicas *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 possuem um potencial biotecnológico abrangente, fundamentado em genomas vastos e funcionalmente especializados. A integração de ferramentas de mineração genômica (antiSMASH, PRISM, BAGEL4, ARTS) com a análise metabolômica (GNPS) permitiu a anotação putativa de alta confiança e forneceu fortes evidências da expressão de metabólitos secundários de alto valor, como as tetracenomicinas , actinomicinas e, cujos perfis de fragmentação MS/MS foram consistentes com os clusters biossintéticos identificados.

A convergência entre mecanismos de resistência a metais pesados (operon *copZA* e redutase mercúrica *merA*) e a biossíntese de compostos protetores, como melanina e ectoína, evidencia uma especialização evolutiva para a sobrevivência em sedimentos amazônicos sob pressão seletiva química da linhagem *Streptomyces murinus* MPUR 40.3. Esta característica,

aliada à presença de genes para promoção de crescimento vegetal e biocontrole (quitinases e bacteriocinas), posiciona o isolado como um candidato ideal para o desenvolvimento de bioinsumos agrícolas resilientes.

Além disso, a identificação de clusters biossintéticos com baixa similaridade em bancos de dados e a presença de assinaturas de autorresistência (como a duplicação do gene GAPDH-I) apontam para um vasto potencial de descoberta de novas moléculas bioativas. Em resumo, este trabalho reforça a importância da biodiversidade amazônica como fonte de inovação biotecnológica e fornece uma base sólida para futuras aplicações em agricultura sustentável e prospecção de novos agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ALAM, Khorshed et al. Comparative genomics with evolutionary lineage in *Streptomyces* bacteria reveals high biosynthetic potentials. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 2, p. 64, 2023.
- ALFEROVA, Vera A. et al. Biological evaluation and spectral characterization of a novel tetracenomycin X congener. *Biochimie*, v. 192, p. 63–71, 2022.
- ARON, Allegra T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.
- AZIZ, Ramy K. et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.
- BARANOVA, Anna A. et al. Modern trends in natural antibiotic discovery. *Life*, v. 13, n. 5, p. 1073, 2023.
- BÉRDY, János. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*, v. 65, n. 8, p. 385–395, 2012.
- BLIN, Kai et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. W1, p. W46–W50, 2023.
- BLIN, Kai et al. antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic Acids Research*, v. 53, n. W1, p. W32–W38, 2025.
- DAS, Vineetha et al. Exploration of natural product repository by combined genomics and metabolomics profiling of mangrove-derived *Streptomyces murinus* THV12 strain. *Fermentation*, v. 9, n. 6, p. 576, 2023.
- DE FRANÇA, Í. W. L. et al. Biosynthetic pathways of specialized metabolites in actinobacteria: a mini-review. *Metabolites*, v. 13, n. 2, p. 230, 2023. DOI: 10.3390/metabo13020230.
- DONALD, Lavinia et al. *Streptomyces*: still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. *Microbiology Research*, v. 13, n. 3, p. 418–465, 2022.

FREESE, Heike M. et al. TYGS and LPSN in 2025: a global core biodata resource for genome-based classification and nomenclature of prokaryotes within DSMZ digital diversity. *Nucleic Acids Research*, v. 54, n. D1, p. D884–D891, 2026.

HANDAYANI, Desy Putri et al. Genome mining untaps the antibiotics biosynthetic gene cluster of *Pseudoalteromonas xiamenensis* STKMTI.2 from mangrove soil sediment. *Marine Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 190–202, 2022.

HOSHINO, Shotaro. Exploring new natural products by utilizing untapped secondary metabolic pathways in actinomycetes. *Journal of Natural Medicines*, v. 79, n. 3, p. 465–476, 2025.

LACEY, Heather J.; RUTLEDGE, Peter J. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. *Molecules*, v. 27, n. 3, p. 887, 2022.

LEE, Namil et al. Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 18, p. 1548–1556, 2020.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P. et al. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D801–D807, 2022.

MULLOWNEY, Michael W. et al. Artificial intelligence for natural product drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 22, n. 11, p. 895–916, 2023.

MUNGAN, Mehmet Direnç et al. ARTS 2.0: feature updates and expansion of the antibiotic resistant target seeker for comparative genome mining. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. W1, p. W546–W552, 2020.

MUNGAN, Mehmet Direnç; BLIN, Kai; ZIEMERT, Nadine. ARTS-DB: a database for antibiotic resistant targets. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D736–D740, 2022.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over nearly four decades. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NGUYEN, Hien Trang et al. Biological control of *Streptomyces murinus* against *Colletotrichum* causing anthracnose disease on tomato fruits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 19, n. 1, 2025.

NGUYEN, Trung Thanh et al. In silico and in vitro analyses reveal the potential use of *Streptomyces parvulus* VNUA74 as bioagent for sustainable banana production. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 7049, 2025.

NUANJOHN, T. et al. Actinomycins from soil-inhabiting *Streptomyces* as sources of antibacterial pigments for silk dyeing. *Molecules*, v. 28, 2023.

OLIVEIRA, Ana Carolina Favacho Miranda et al. A metabologenomics approach reveals the unexplored biosynthetic potential of bacteria isolated from an Amazon conservation unit. *Microbiology Spectrum*, v. 13, n. 1, p. e00996-24, 2025.

PINEDO-RIVILLA, Cristina; ALEU, Josefina; DURÁN-PATRÓN, Rosa. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches. *Marine Drugs*, v. 20, n. 2, p. 84, 2022.

PRJIBELSKI, Andrey et al. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 70, n. 1, p. e102, 2020. DOI: 10.1002/cpbi.102.

QUINN, Gerry A.; DYSON, Paul J. Going to extremes: progress in exploring new environments for novel antibiotics. *npj Antimicrobials and Resistance*, v. 2, n. 1, p. 8, 2024.

QUINN, Robert A. et al. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism and precision medicine strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.

QURESHI, Kamal A. et al. Isolation, characterization, anti-MRSA evaluation and in silico multi-target antimicrobial validations of actinomycin X2 and actinomycin D produced by novel *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ_23. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 14539, 2021.

ROMANO, Stefano et al. Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*, v. 16, n. 7, p. 244, 2018.

SCHMID, Robin et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature Biotechnology*, v. 41, n. 4, p. 447–449, 2023.

SCHWENGERS, Oliver et al. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 11, p. 000685, 2021.

SEDEEK, Abdelrahman M. et al. Genomic insights into biosynthesis and adaptation in the bioactive marine bacterium *Streptomyces albidoflavus* VIP-1 from the Red Sea. *BMC Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 372, 2025.

SHIL, Riyanka et al. Synthetic biology strategies for activating cryptic BGCs in *Streptomyces*: engineering native and synthetic promoters for antibiotic discovery. *ACS Omega*, 2026.

SILVA, Ingrid Jarline Santos et al. *Streptomyces* strains from Amazonian sediments as plant growth promoters and biocontrol agents of anthracnose in postharvest *Capsicum chinense*. *Microorganisms*, v. 13, n. 12, p. 2713, 2025.

SKINNIDER, Michael A. et al. Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 6058, 2020.

TAMANG, Prabin et al. Mining biosynthetic gene clusters of *Pseudomonas vancouverensis* utilizing whole genome sequencing. *Microorganisms*, v. 12, n. 3, p. 548, 2024.

THOMPSON, Cristiane C. et al. Diversity of microbiomes across a 13,000-year-old Amazon sediment. *Microbial Ecology*, v. 86, n. 3, p. 2202–2209, 2023.

VAN DER MEIJ, Anne et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 3, p. 392–416, 2017.

VAN HEEL, Auke J. et al. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W278–W281, 2018.

WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WATVE, Milind G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, v. 176, n. 5, p. 386–390, 2001.

YUAN, Yujie et al. Self-resistance-gene-guided high-throughput automated genome mining of bioactive natural products from *Streptomyces*. *Cell Systems*, v. 16, n. 3, 2025.

ZHANG, H. et al. Unlocking microbial natural product diversity through the OSMAC strategy. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1357539, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1357539.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Percentuais de hibridização digital DNA–DNA (dDDH), calculados pela fórmula d4, entre os genomas das linhagens MPUR 40.3 e APUR 32.5 em comparação com as espécies de *Streptomyces* filogeneticamente mais próximas, utilizando o Type Strain Genome Server (TYGS).

Query strain	Subject strain	d4	C.I. (d4, in %)	G+C content difference (in %)
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 41827	84.5	[81.8 - 86.9]	0.04
MPUR 40.3	<i>Streptomyces graminearus</i> JCM 6923	75.2	[72.2 - 78.0]	0.04
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> NRRL B-5429	71.6	[68.5 - 74.4]	0.07
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40710	71.5	[68.5 - 74.4]	0.08
MPUR 40.3	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40191	71.5	[68.4 - 74.3]	0.14
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 41827	55.1	[52.3 - 57.8]	0.53
APUR 32.5	<i>Streptomyces</i> sp. MPUR40.3	55.0	[52.3 - 57.7]	0.49
APUR 32.5	<i>Streptomyces graminearus</i> JCM 6923	54.1	[51.4 - 56.8]	0.46
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> NRRL B-5429	53.8	[51.1 - 56.5]	0.57
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40710	53.7	[51.0 - 56.4]	0.57
APUR 32.5	<i>Streptomyces murinus</i> DSM 40191	53.6	[50.9 - 56.3]	0.64

Tabela 2. Anotações dos agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) preditos pela ferramenta *antiSMASH* nos genomas dos isolados *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 e *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, incluindo as classes biossintéticas identificadas.

<i>Streptomyces</i> sp. nov. APUR 32.5						<i>Streptomyces murinus</i> MPUR 40.3					
Region	Type	From	To	Similarity (%)	Most similar known cluster	Region	Type	From	To	Similarity (%)	Most similar known cluster
2.1	T2PKS, T1PKS	16,952	89,757	High	spore pigment	1.1	Lanthipeptide-class-III	678,39	701,08	-	-
6.1	T2PKS, azoxy-crosslink, PKS-like	1	49,63	-	-	1.2	Melanin	930,543	941,154	Medium	Melanin
7.1	PKS-like, lassopeptide	27,606	79,491			2.1	Terpene	23,26	63,945	-	-
8.1	NRPS	1	43,397	Low	friulimicin A/friulimicin B/friulimicin C/friulimicin D	2.2	NRPS	447,406	508,005	High	actinomycin D
9.1	Lanthipeptide-class-iii, RiPP-like	15,913	38,384			3.1	Polyne	1	26,616	Low	cepacin A
10.1	NI-siderophore	49,787	79,799	Low	kinamycin	3.2	Hydrogen-cyanide, lanthipeptide-class-iv, other	38,708	84,211	-	-
13.1	transAT-PKS-like, NRPS-like, T1PKS	1	38,767	Low	cinnabaramide A	3.3	Terpene	129,771	151,045	-	-
19.1	Terpene	54,944	70,592			3.4	NRPS-like, NRPS, T1PKS	153,41	237,674	-	-
21.1	NRPS, T1PKS	1	69,918	Medium	pentamycin/filipin	3.5	RiPP-like	407,379	417,594	Low	informatipeptin
22.1	T1PKS	43,116	68,77			3.6	T1PKS	479,709	524,244	-	-
35.1	T1PKS	1	40,61			5.1	T1PKS, lanthipeptide-class-III	116,312	185,536	-	-
36.1	NRPS, terpene-precursor	1	43,034			5.2	NRPS	189,214	233,557	Medium	SF2768
37.1	azole-containing-RiPP, RRE-containing, terpene	1	40,946	High	hopene	5.3	NRPS, T1PKS, Lanthipeptide-class-IV	265,984	437,925	High	pentamycin
38.1	T2PKS	1	45,998	High	tetracenomycin C	6.1	NRPS, NAPAA	270,627	313,878	-	-

42.1	NRPS	23,218	45,787			6.2	T3PKS	317,188	358,252	High	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene
46.1	T3PKS	1	39,555	High	flaviolin/1,,6,8-tetrahydroxynaphthalene	6.3	T1PKS, hgIE-KS	399,327	451,249	-	-
50.1	NRPS-like, T1PKS	1	27,249			8.1	Terpene	197,564	218,604	Low	julichrome Q3-3/julichrome Q3-5
51.1	NRPS, NAPP	1	31,908			8.2	Terpene-precursor	219,644	240,78	-	-
57.1	Lanthipeptide-class-iii, polyne	2,114	34,262	Low	cepacin A	9.1	RRE-containing, NI-siderophore, NRPS	1	83,593	Low	omnipeptin
66.1	Terpene	1	14,547	High	geosmin	9.2	NRPS, NRPS-like, Betalactone, Phosphonate	343,642	436,349	High	leupeptin Pr/leupeptin Ac
66.2	RiPP-like	24,468	31,89			10.1	T1PKS, T2PKS	106,946	179,552	High	spore pigment
70.1	NI-siderophore	13,29	31,029			11.1	NI-siderophore	65,961	95,73	High	desferrioxamin B/deferrioxamine E
77.1	NRPS	1	28,573			11.2	Lasso peptide	240,777	263,33	High	albusnodin
82.1	T1PKS, hgIE-KS	1	28,082			12.1	Azoxy-crosslink, T1PKS, PKS-like	10,604	68,801	-	-
88.1	other	1	24,046			12.2	RiPP-like	128,967	140,271	-	-
89.1	Terpene-precursor	1	13,445			12.3	Terpene	150,438	172,6	High	geosmin
90.1	Furan	11,471	26,249	Low	asukamycin	13.1	Crocagin	31,584	59,67	-	-
92.1	NRPS	1	22,833			13.2	Ectoine, NRPS	211,694	262,499	-	-
93.1	NI-siderophore	3,208	25,784	High	desferrioxamin B/deferrioxamin E	14.1	Lanthipeptide-class-I	154,616	181,042	-	-
97.1	T1PKS	1	25,269	Low	4-hexadecanoyl-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2H-furan-5-one	15.1	Terpene, RRE-containing, Azole-containing-RiPP	95,781	148,568	-	-

106.1	T1PKS	1	2,387			16.1	Lanthipeptide-class-I, NRPS, Lanthipeptide-class-II	29,403	93,995	-	-
111.1	Phenazine	1	19,675			19.1	NRPS	1	25,363	-	-
114.1	Oligosaccharide	1	21,9	Low	arixanthomycin A/arixanthomycin B/ arixanthomycin C	19.2	T1PKS, NI-siderophore, NRPS	79,221	159,271	Low	kinamycin
116.1	Butyrolactone	11,344	21,35	High	A-factor	20.1	Amglyccycl, Butyrolactone	17,834	44,734	Low	pyralomicin
120.1	Terpene	1	11,497	High	albaflavenone	21.1	NRPS-like, T1PKS	77,084	126,926	Low	cinnabaramide
137.1	NRPS	1	18,711			22.1	Ectoine	76,26	82,621	High	ectoine
138.1	T1PKS	1	18,535	Low	gargantulide B/gargantulide C	23.1	T3PKS, NRPS, NRPS-like	1	29,308	Low	A-47934
156.1	T2PKS, other	1	16,744	Low	xantholipin	27.1	Triceptide	10,924	32,307	-	-
165.1	RiPP-like	2,351	12,566	Low	informatipeptin	28.1	T1PKS, NRPS	1	42,314	-	-
190.1	T1PKS	1	1,235	Medium	filipin	29.1	Terpene-precursor	4,171	25,19	-	-
191.1	NRPS-like, betalactone	1	13,118			31.1	NRPS	1	12,519	-	-
194.1	Melanin	1	8,105	Medium	melanin	33.1	NRPS	1	7,486	-	-
211.1	NRPS	1	11,082			38.1	NRPS	1	2,617	-	-
244.1	RiPP-like	2,168	8,908			39.1	NRPS	1	2,391	-	-
284.1	Ectoine	1	7,348	High	ectone	45.1	NRPS-like	1	1,116	High	rhizomide A/rhizomide B/ rhizomide C
328.1	NRPS	1	5,181								
346.1	Terpene	1	4,277								
379.1	Oligosaccharide	1	2,767								
380.1	NRPS	1	2,732								
386.1	Lanthipeptide-class- ii	1	2,483								
425.1	NRPS-like	1	1,547								

Tabela 3. Clusters de Genes Biossintéticos (BGCs) identificados pela plataforma PRISM em *Streptomyces* sp. APUR 32.5.

Cluters	Tipo de Metabólito/BGCs
1	polyketide pentangular polyphenol
2	polyketide
3	lasso peptide
4	nonribosomal peptide
5	class III/IV lantipeptide
6	polyketide, nonribosomal peptide
7	polyketide, nonribosomal peptide
8	polyketide
9	polyketide
10	nonribosomal peptide
11	thiopeptide
12	tetracenomycin-type polyketide
13	nonribosomal peptide
14	nonribosomal peptide
15	class III/IV lantipeptide
16	nonribosomal peptide
17	polyketide
18	furan nonribosomal peptide
19	nonribosomal peptide
20	NRPS-independent siderophore synthase
21	polyketide, nonribosomal peptide
22	polyketide
23	butyrolactone
24	polyketide
25	nonribosomal peptide

26	polyketide
27	polyketide
28	melanin
29	nonribosomal peptide
30	ectoine
31	nonribosomal peptide
32	nonribosomal peptide
33	class II lantipeptide

Tabela 4. Caracterização funcional de genes e clusters biossintéticos identificados no genoma de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 associados ao controle biológico, promoção de crescimento e síntese de enzimas de interesse industrial, conforme anotação automatizada e curadoria via Bakta.

Categoria	Gene/Produto	Locus Tag	Papel Biológico Potencial
Síntese de Antifúngicos e Antibióticos	ATP-grasp-modified RiPP	FAJFBM_00028	Biossíntese de peptídeos ribossomais modificados (RiPPs) com potencial atividade antimicrobiana.
	Thioesterase (Secondary metabolite)	FAJFBM_00702	Enzima envolvida na liberação de cadeias de peptídeos/policetídeos em vias biossintéticas.
	Phenazine biosynthesis protein PhzF-like	FAJFBM_02307*	Produção de fenazinas, potentes agentes antifúngicos e antibacterianos.
Controle Biológico e Defesa	Chitinase	FAJFBM_00928	Hidrólise de quitina, componente essencial da parede celular de fungos patogênicos.
	Superoxide dismutase (sodA)	FAJFBM_00953	Proteção contra estresse oxidativo e sobrevivência em ambientes competitivos.
	Dye decolorizing peroxidase	FAJFBM_02494	Enzima envolvida na degradação de compostos recalcitrantes e resposta a estresse.
	Protease production enhancer protein	FAJFBM_00760, FAJFBM_00918	Proteínas que otimizam a secreção de proteases extracelulares para degradação de proteínas de patógenos.
	Serine protease / Peptidase	FAJFBM_00021, FAJFBM_00763	Degradação enzimática de estruturas proteicas de competidores.
Promoção de Crescimento Vegetal	Alkaline phosphatase family	FAJFBM_02357, FAJFBM_02452	Solubilização de fosfato orgânico, tornando-o disponível para a absorção pela planta.
	Iron uptake transporter (peroxidase subunit)	FAJFBM_02707	Sistema de aquisição de ferro (efeB), essencial para a competição por nutrientes no solo.
	Amidase	FAJFBM_00002, FAJFBM_00031	Envolvida no metabolismo de compostos nitrogenados e potencial precursora de fitohormônios.

Enzimas de Interesse Biotecnológico	D-alanine--D-alanine ligase	FAJFBM_00019	Enzima chave na síntese de peptideoglicano e alvo de estudos de resistência.
	ATP-dependent Clp protease	FAJFBM_00990	Regulação proteolítica intracelular e adaptação a estresses ambientais.
	Haloperoxidase domain protein	FAJFBM_02258	Potencial envolvimento na síntese de metabólitos secundários halogenados.

Tabela 5. Anotação dos principais genes e clusters identificados na linhagem de *Streptomyces* sp. APUR 32.5 com potencial para aplicações em agricultura e biotecnologia, com base nas anotações do RAST.

Categoria de Interesse	Função/Cluster Identificado	Exemplos de Genes (Feature ID do RAST)	Relevância Biotecnológica/Agrícola
Biocontrole (Antifúngico e Nematicida)	Polyketide Synthases (PKS)	peg.87 , peg.88 , peg.140	Produção de compostos antifúngicos (ex: polienos) e outros metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.
	Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS)	peg.146 (chaperona MbtH-like)	Biossíntese de peptídeos bioativos com potencial antimicrobiano ou nematicida.
	Bacteriocinas/Lantibióticos	peg.110 , peg.111 (transportadores de efluxo)	Produção de peptídeos antimicrobianos que inibem o crescimento de patógenos.
	Quitinasas	peg.2946	Degradação da quitina (componente da parede celular de fungos e exoesqueleto de nematóides), conferindo atividade antifúngica e nematicida.
Enzimas Hidrolíticas	Alfa-amilase	peg.1214	Degradação de amido, útil na indústria alimentícia e de biocombustíveis.
	Glucoamilase	peg.602 , peg.1566	Produção de glicose a partir de amido, importante para fermentação e adoçantes.
	Lipases	peg.308 , peg.556 , peg.643	Hidrólise de lipídios, com aplicações em detergentes, alimentos, biocombustíveis e biorremediação.
	Proteases	peg.42 , peg.101 , peg.638 , peg.1240	Degradação de proteínas, com uso em detergentes, alimentos, farmacêutica e biorremediação.
	Beta-glucosidase	peg.1100	Degradação de celulose e hemicelulose, essencial para a produção de biocombustíveis e ração animal.
Promoção de Crescimento de Plantas (PGP)	Sideróforos	peg.590 , peg.591 , peg.592 (sistema de transporte de Fe ³⁺)	Sequestro de ferro do ambiente, tornando-o disponível para a planta e inibindo patógenos que dependem de ferro.
	Biossíntese de Auxinas (via Triptofano)	peg.170 , peg.171 (enzimas da via do Triptofano)	Produção de Ácido Indol Acético (AIA), um hormônio vegetal que promove o crescimento radicular e o desenvolvimento da planta.

Solubilização de Fosfatos	<u>peg.105</u> , <u>peg.189</u> (transportadores e enzimas relacionadas ao fosfato)	Liberação de fosfato inorgânico de compostos orgânicos ou minerais, aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas.
---------------------------	---	---

Tabela 6. Clusters de genes biossintéticos preditos no genoma de *Streptomyces* sp. nov. APUR 32.5 por meio da ferramenta BAGEL, destacando regiões genômicas associadas à biossíntese de peptídeos ribossomais e pós-traducionalmente modificados (RiPPs).

Áreas de Interesse (AOIs)	Início	Fim	Classe	Situação
APUR32_5_NODE_67_length_31736_cov_32822794.167.AOI_01	-7399	12601	Sactipeptídeos	indefinido
APUR32_5_NODE_361_length_3656_cov_35267761.17.AOI_01	-8296	11704	Lasso_peptídeo	indefinido
APUR32_5_NODE_37_length_53179_cov_31449016.197.AOI_01	-2233	17767	LAPs	indefinido
APUR32_5_NODE_37_length_53179_cov_31449016.197.AOI_02	13484	33484	Botromicina	indefinido
APUR32_5_NODE_9_length_87406_cov_37807294.213.AOI_01	16565	36565	Lanthipeptídeo_classe_IV	indefinido
APUR32_5_NODE_7_length_97266_cov_40321794.316.AOI_01	57353	77353	Lasso_peptídeo	indefinido
APUR32_5_NODE_57_length_34262_cov_27896951.368.AOI_01	2504	22504	Lanthipeptídeo_classe_IV	indefinido

Tabela 7. Clusters de Genes Biossintéticos (BGCs) identificados pela plataforma PRISM em *Streptomyces murinus* MPUR 40.3.

Clusters	Tipo de Metabólito/BGCs
1	polyketide
2	class III/IV lantipeptide
3	melanin
4	nonribosomal peptide
5	polyketide/ nonribosomal peptide
6	polyketide
7	nonribosomal peptide
8	polyketide/ nonribosomal peptide
9	class III/IV lantipeptide
10	nonribosomal peptide

11	polyketide/ nonribosomal peptide
12	polyketide
13	nonribosomal peptide
14	nonribosomal peptide
15	nonribosomal peptide
16	polyketide pentangular polyphenol
17	NRPS-independent siderophore synthase
18	lasso peptide
19	polyketide
20	ectoine/ nonribosomal peptide
21	class I lantipeptide
22	thiopeptide
23	class II lantipeptide/ nonribosomal peptide
24	nonribosomal peptide
25	polyketide
26	nonribosomal peptide
27	butyrolactone
28	polyketide/ nonribosomal peptide
29	ectoine
30	nonribosomal peptide
31	nonribosomal peptide
32	nonribosomal peptide
33	nonribosomal peptide
34	nonribosomal peptide

Tabela 9. Principais genes anotados pela plataforma RAST no genoma de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 relacionados à homeostase e resistência a metais. São apresentados identificador do gene (ID), contig de origem, tipo de sequência (CDS), função predita, subsistema associado e coordenadas genômicas (início, fim e comprimento em pb).

ID	Type	Function	Subsystem	Start	Stop	Length (pb)
fig 33900.69.peg.31	CDS	Repressor CsoR of the copZA operon	Copper Transport System	29545	29201	345
fig 33900.69.peg.194	CDS	Cytoplasmic copper homeostasis protein CutC	Copper homeostasis: copper tolerance	182715	183419	705
fig 33900.69.peg.338	CDS	Copper(I) chaperone CopZ	Copper Transport System	10970	11209	240
fig 33900.69.peg.339	CDS	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase (EC 3.6.3.3) (EC 3.6.3.5); Copper-translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	Copper Transport System, Copper homeostasis	11296	13584	2289
fig 33900.69.peg.805	CDS	Multidrug resistance transporter, Bcr/CflA family	Copper homeostasis	219478	220773	1296
fig 33900.69.peg.1131	CDS	Transcriptional regulator, MerR family	Cobalt-zinc-cadmium resistance	48971	48294	678
fig 33900.69.peg.1150	CDS	ATPase component NikO of energizing module of nickel ECF transporter	ECF class transporters, Transport of Nickel and Cobalt	66663	65842	822
fig 33900.69.peg.1151	CDS	Transmembrane component NikQ of energizing module of nickel ECF transporter	ECF class transporters, Transport of Nickel and Cobalt	67432	66671	762
fig 33900.69.peg.1152	CDS	Substrate-specific component NikM of nickel ECF transporter / Additional substrate-specific component NikN of nickel ECF transporter	ECF class transporters, ECF class transporters, Transport of Nickel and Cobalt, Transport of Nickel and Cobalt	68480	67434	1047
fig 33900.69.peg.1254	CDS	Transcriptional regulator, MerR family	Cobalt-zinc-cadmium resistance	175847	175407	441
fig 33900.69.peg.1339	CDS	Conserved membrane protein in copper uptake, YcnI	Copper Transport System	9148	9858	711
fig 33900.69.peg.1353	CDS	Transcriptional regulator, MerR family	Cobalt-zinc-cadmium resistance	23828	24193	366
fig 33900.69.peg.1394	CDS	Transcriptional regulator, MerR family	Cobalt-zinc-cadmium resistance	68177	67371	807
fig 33900.69.peg.1547	CDS	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase (EC 3.6.3.3) (EC 3.6.3.5); Copper-translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	Copper Transport System, Copper homeostasis	1264	3252	1989
fig 33900.69.peg.1637	CDS	PF00070 family, FAD-dependent NAD(P)-disulphide oxidoreductase	Mercuric reductase	112202	110763	1440
fig 33900.69.peg.5041	CDS	Conserved membrane protein in copper uptake, YcnI	Copper Transport System	129744	130517	774

fig 33900.69.peg.7155	CDS	Transcriptional regulator, MerR family	Cobalt-zinc-cadmium resistance	421629	422114	486
-----------------------	-----	--	--------------------------------	--------	--------	-----

Tabela 10. Clusters de genes biossintéticos preditos no genoma de *Streptomyces murinus* MPUR 40.3 por meio da ferramenta BAGEL, destacando regiões genômicas associadas à biossíntese de peptídeos ribossomais e pós-traducionalmente modificados (RiPPs).

Áreas de Interesse (AOIs)	Início	Fim	Classe	Situação
ING_MPUR403_NODE_16_length_219720_cov_22643242.12.AOI_01	43439	63439	Lanthipeptide_class_II	undefined
ING_MPUR403_NODE_22_length_82621_cov_34409246.16.AOI_01	19082	39082	Sactipeptides	undefined
ING_MPUR403_NODE_11_length_309675_cov_42401412.17.AOI_01	241091	261091	Lasso_peptide	undefined
ING_MPUR403_NODE_14_length_252746_cov_43584737.21.AOI_01	157715	177715	Lanthipeptide_class_I	undefined
ING_MPUR403_NODE_5_length_502848_cov_19149434.24.AOI_01	164492	184492	Lanthipeptide_class_IV	undefined
ING_MPUR403_NODE_5_length_502848_cov_19149434.24.AOI_02	416789	436789	Lanthipeptide_class_IV	undefined
ING_MPUR403_NODE_1_length_946517_cov_39383813.35.AOI_01	680102	700102	Lanthipeptide_class_IV	undefined
ING_MPUR403_NODE_15_length_234865_cov_26900031.6.AOI_01	118922	138922	Thiopeptide	undefined
ING_MPUR403_NODE_15_length_234865_cov_26900031.6.AOI_02	103241	123241	Botromycin	undefined
ING_MPUR403_NODE_3_length_571163_cov_21322284.8.AOI_01	48485	68485	Lanthipeptide_class_IV	undefined

Tabela 11. Dados de HR-ESI-MS¹/MS² e anotação por GNPS das actinomicinas detectadas no isolado *Streptomyces murinus* MPUR 40.3, Comparado com (Qureshi et al., 2021; Nuanjohn et al., 2023).

Composto	Fórmula molecular	Aduto	m/z teórico	m/z observado	Δppm	MQScore (GNPS)	Íons diagnósticos de MS/MS (m/z)	Subcluster GNPS
Actinomycin D	C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	1255.6358	1255.6346	-0.96	0.877	203, 300, 348, 394, 431, 459, 558, 657, 829, 857, 902, 928	Protonado
		[M+Na] ⁺	1277.6177	1277.6160	-1.37	0.880	same fingerprint	Sodiado
		[M+2H] ²⁺	628.3215	628.3210	-0.86	0.770	300, 459, 657, 829-928	Protonado

Actinomycin X₂	C ₆₂ H ₈₄ N ₁₂ O ₁₇	[M+H] ⁺	1269.6150	1269.6130	-1.58	0.864	203, 300, 348, 394, 431, 459, 530, 558, 657, 829-928	Protonado
		[M+Na] ⁺	1291.5969	1291.5945	-1.89	0.814	same fingerprint	Sodiado
		[M+2H] ²⁺	635.3111	635.3107	-0.69	—	300, 459, 657, 829-928	Protonado
Actinomycin X_{0β}	C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₇	[M+H] ⁺	1271.6307	1271.6301	-0.47	—	274, 437, 829, 857, 873, 900, 928, 944, 956, 972	Protonado
		[M+Na] ⁺	1293.6126	1293.6119	-0.58	—	same fingerprint	Sodiado
		[M+2H] ²⁺	636.3190	636.3188	-0.30	—	274, 437, 857-972	Protonado

CAPÍTULO III - Potencial biotecnológico de *Bacillus* spp. amazônicos como bioinoculantes para agricultura sustentável

RESUMO

O desenvolvimento de bioinoculantes microbianos representa uma estratégia fundamental para a transição rumo a sistemas agrícolas mais sustentáveis. Entre os microrganismos mais estudados, destacam-se as espécies do gênero *Bacillus*, amplamente reconhecidas por sua eficácia no controle biológico de fitopatógenos, bem como por sua capacidade de reduzir o uso de defensivos químicos. Neste estudo, estamos avaliando o potencial biotecnológico de três linhagens de *Bacillus* (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1), isoladas de sedimentos amazônicos. A análise dos genomas completos sequenciados via plataforma Illumina revelou que os isolados pertencem às espécies *B. subtilis* e *B. oryzicola* pertencente ao complexo *B. amyloliquefaciens* (*lato sensu*), com tamanho genômico médio de 4,0 a 4,3 Mb. A prospecção genômica revelou um arsenal diversificado de clusters biossintéticos (BGCs) nos genomas analisados, incluindo aqueles relacionados à produção de compostos antimicrobianos de interesse biotecnológico, como lipopeptídeos (surfactina, fengicina), policetídeos (difficidina, macrolactina H), sideróforos (bacillibactina), além de outros metabólitos secundários com potencial atividade bioativa. Os ensaios de antagonismo *in vitro* evidenciaram notável capacidade de inibição contra fitopatógenos de relevância econômica, como antifúngicos biológicos, destacando o controle de *Moniliophthora perniciosa* com percentuais de 83%, 81% e 89% para MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1, respectivamente. A caracterização enzimática revelou perfis distintos de produção de enzimas hidrolíticas entre os isolados, incluindo amilases, celulasas, lipases e proteases. Dentre eles, *Bacillus subtilis* MPUR 44.1 apresentou o perfil mais abrangente, evidenciando maior versatilidade na produção dessas enzimas. Esses resultados são indicativos de que as linhagens amazônicas de *Bacillus* estudadas aqui até o momento, possuem características multifuncionais desejáveis para o desenvolvimento de bioinoculantes comerciais, constituindo alternativas promissoras para a agricultura tropical sustentável.

Palavras-chave: biocontrole; clusters biossintéticos; enzimas extracelulares.

ABSTRACT

The development of microbial bioinoculants represents a fundamental strategy for the transition toward more sustainable agricultural systems. Among the most extensively studied microorganisms, species of the genus *Bacillus* stand out, being widely recognized for their efficacy in the biological control of phytopathogens and their ability to reduce the reliance on chemical pesticides. This study evaluates the biotechnological potential of three *Bacillus* strains (MPUR 33.1, MPUR 35.2, and MPUR 44.1) isolated from Amazonian sediments. Analysis of the complete genomes sequenced via the Illumina platform revealed that the isolates belong to the species *B. subtilis* and *B. oryzicola* (within the *B. amyloliquefaciens* complex sensu lato), with an average genome size ranging from 4.0 to 4.3 Mb. Genomic prospecting identified a diverse arsenal of biosynthetic gene clusters (BGCs), including those related to the production of antimicrobial compounds of biotechnological interest, such as lipopeptides (surfactin, fengycin), polyketides (difficidin, macrolactin H), and siderophores (bacillibactin), in addition to other secondary metabolites with potential bioactive properties. In vitro antagonism assays demonstrated a remarkable inhibitory capacity against economically relevant phytopathogens, highlighting the biological control of *Moniliophthora perniciosa* with inhibition rates of 83%, 81%, and 89% for MPUR 33.1, MPUR 35.2, and MPUR 44.1, respectively. Enzymatic characterization revealed distinct profiles of hydrolytic enzyme production among the isolates, including amylases, cellulases, lipases, and proteases. Among them, *Bacillus subtilis* MPUR 44.1 exhibited the most comprehensive profile, demonstrating superior versatility in enzyme production. These results indicate that the Amazonian *Bacillus* strains studied thus far possess desirable multifunctional characteristics for the development of commercial bioinoculants, constituting promising alternatives for sustainable tropical agriculture.

Keywords: biocontrol; biosynthetic gene clusters; extracellular enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A intensificação sustentável da produção agrícola constitui um dos maiores desafios contemporâneos, exigindo estratégias inovadoras que conciliem produtividade, resiliência ecológica e redução de impactos ambientais negativos (ROCKSTRÖM et al., 2017; NEWMAN et al., 2023). Neste cenário, os bioinoculantes microbianos crescem como tecnologias promissoras, capazes de substituir parcialmente ou complementar insumos químicos sintéticos, contribuindo para sistemas de produção mais sustentáveis e resilientes às mudanças climáticas (MAITRA et al., 2021; ADELEKE et al., 2022).

Dentre os grupos microbianos com potencial aplicação na agricultura, o gênero *Bacillus* destaca-se por apresentar características favoráveis ao desenvolvimento de bioinoculantes comerciais. Tais características incluem a capacidade de formar endósporos resistentes a condições ambientais adversas, a produção de metabólitos secundários bioativos, elevada versatilidade metabólica e segurança para uso ambiental (SERRÃO et al., 2024; SALES e RIGOBELLO, 2024). Esses atributos têm impulsionado a expansão do mercado global de bioinoculantes à base de *Bacillus*. O segmento voltado para *Bacillus subtilis*, por exemplo, foi estimado em US\$ 87,66 milhões em 2024, com previsão de atingir US\$ 165,9 milhões até 2033, refletindo uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 7,4%, impulsionada por suas aplicações crescentes nos setores agrícola, farmacêutico e industrial (MARKET GROWTH REPORTS, 2024).

A eficácia de *Bacillus* como bioinoculante deriva de múltiplos mecanismos de ação, incluindo a produção de fitormônios (auxinas, citocininas, giberelinas), enzimas de solubilização de nutrientes (fosfatases, fitases), sideróforos e compostos antimicrobianos (HASHEM et al., 2019; WU et al., 2025).

O advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas especializadas têm revolucionado a compreensão do potencial biossintético de *Bacillus*, permitindo a identificação e caracterização de clusters gênicos responsáveis pela produção de metabólitos secundários e enzimas de interesse biotecnológico (MEIER-KOLTHOFF et al., 2022; BLIN et al., 2023). Esta abordagem, conhecida como mineração genômica, tem revelado que o repertório biossintético de *Bacillus* é substancialmente mais amplo do que o previamente estimado com base em métodos convencionais de isolamento e caracterização de compostos (PUT et al., 2024; ZHAO et al., 2024; QIN et al., 2025).

Além disso, a crescente preocupação com a resistência de fitopatógenos a fungicidas químicos convencionais tem estimulado a busca por alternativas biológicas eficazes para o

manejo integrado de doenças (ISLAM et al., 2024; BEYARI, 2025; SHAILI et al., 2025; SHEORAN et al., 2025). Neste contexto, espécies do grupo *Bacillus subtilis*, como *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* stricto , têm demonstrado notável eficácia no controle de diversos fitopatógenos, incluindo *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e espécies de *Colletotrichum* (FIRA et al., 2018; CAULIER et al., 2019; SERRÃO et al., 2024).

A biodiversidade microbiana da Amazônia, maior floresta tropical do planeta, representa um vasto e ainda pouco explorado reservatório de recursos genéticos com potencial biotecnológico (PEREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2025). As condições edafoclimáticas peculiares deste bioma, caracterizadas por elevada temperatura, umidade e intensa competição microbiana, podem ter favorecido a evolução de linhagens bacterianas com características adaptativas únicas e mecanismos biossintéticos diferenciados (BUSCARDO et al., 2018; THOMPSON et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2025). Estudos recentes têm revelado que bactérias isoladas de solos e sedimentos amazônicos frequentemente apresentam atividades antimicrobianas e enzimáticas superiores às de isolados de outros ecossistemas, sugerindo seu potencial para aplicações biotecnológicas inovadoras (PEREIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2025).

No entanto, apesar deste potencial, investigações sistemáticas sobre a diversidade funcional e aplicações biotecnológicas de *Bacillus* amazônicos permanecem escassas, particularmente no que concerne à caracterização genômica integrada a ensaios funcionais visando aplicações agrícolas. Esta lacuna é especialmente relevante considerando as particularidades dos agroecossistemas tropicais, que enfrentam desafios específicos relacionados à alta pressão de patógenos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o potencial biotecnológico de três linhagens de *Bacillus* (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1) isoladas de sedimentos amazônicos, empregando uma abordagem integrada de genômica e ensaios funcionais. Especificamente, buscamos: (i) determinar o posicionamento filogenômico das linhagens através do sequenciamento completo de seus genomas; (ii) identificar e caracterizar clusters de genes biossintéticos relacionados à produção de compostos bioativos; (iii) avaliar o potencial antagonista contra fitopatógenos de importância econômica; (iv) caracterizar o perfil de produção de enzimas extracelulares; (v) investigar os efeitos na promoção do crescimento de tomate; e; (vi) determinar a eficácia no controle de doenças pós-colheita em frutos.

Os resultados desta investigação não apenas contribuirão para o conhecimento da diversidade funcional de *Bacillus* amazônicos, mas também identificarão linhagens

promissoras para o desenvolvimento de bioinoculantes adaptados às condições tropicais, alinhando-se às demandas por tecnologias agrícolas sustentáveis e à valorização da biodiversidade brasileira como fonte de inovação biotecnológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Sequenciamento do Genoma

As três linhagens de *Bacillus* (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1) foram submetidas ao sequenciamento genômico completo utilizando a plataforma Illumina, com leituras pareadas de 150 pares de bases (paired-end). A qualidade dos dados brutos foi avaliada com a ferramenta FastQC, assegurando a confiabilidade para as etapas seguintes. A montagem dos genomas foi realizada em parceria com a Embrapa Agricultura Digital, empregando o software SPAdes. Durante o processo de montagem, contigs com baixa cobertura ou indícios de contaminação foram removidos, assegurando maior confiabilidade às sequências finais. A cobertura média obtida foi de aproximadamente 103X, proporcionando uma base robusta para análises genômicas comparativas.

2.2. Análise filogenômica baseada no genoma completo

Para determinar a taxonomia das três linhagens de *Bacillus* (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1) com base em suas sequências genômicas, os genomas foram analisados por meio da plataforma TYGS (Type Strain Genome Server) (<https://tygs.dsmz.de/>). Essa plataforma utiliza índices genômicos amplamente reconhecidos para inferência filogenética e classificação taxonômica, como o Genome BLAST Distance Phylogeny (GBDP), que estima distâncias evolutivas entre genomas por meio de comparações de fragmentos genômicos via BLAST, e o digital DNA-DNA Hybridization (dDDH), uma simulação in silico da hibridização DNA-DNA, considerada o padrão-ouro para a delimitação de espécies bacterianas. Segundo os critérios taxonômicos internacionais, o valor de corte recomendado para o dDDH é $\geq 70\%$ para a delimitação de espécies inéditas (Meier-Kolthoff e Göker, 2019).

2.3. Mineração genômica

A identificação de BGCs (biosynthetic gene clusters) nos genomas sequenciados foram realizadas com o software AntiSMASH v.7.0 (BLIN et al., 2023), utilizando o parâmetro de rigor de detecção configurado como “relaxed” e com todas as funcionalidades

adicionais ativadas (“all on”). As predições automáticas geradas pela ferramenta foram submetidas a uma curadoria manual, empregando a plataforma MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) e análises por BLAST, com o objetivo de validar e refinar a anotação dos clusters identificados (DE FRANÇA et al., 2023). Análises complementares foram conduzidas com o apoio dos bancos de dados GenBank, UniProt, Pfam e PDB (Protein Data Bank), a fim de caracterizar funcionalmente os genes presentes nos BGCs preditos.

2.4. Atividade antagônica contra diferentes fitopatógenos

A capacidade de inibição das linhagens de *Bacillus* MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1 contra sete fitopatógenos de interesse agrícola foi avaliada por meio da técnica de pareamento de cultura dupla (THAMPI e BHAJ, 2017). Os fitopatógenos utilizados pertencem à coleção microbiológica da Embrapa Amazônia Ocidental e estão descritos na Tabela abaixo:

Tabela 1. Fitopatógenos utilizados no ensaio de antagonismo.

Nº	Fitopatógeno	Código	Hospedeiro onde foi isolado
1	<i>Colletotrichum siamense</i>	Coll 2N	<i>Synedrella nodiflora</i>
2	<i>Colletotrichum spaethianum</i>	2908	Cebolinha
3	<i>Corynespora cassiicola</i>	2671	tomate (folha)
4	<i>Fusarium decemcellulare</i>	Fdc 307	Guaranazeiro (superbrotamento da gema)
5	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Mp01	Vassoreiro (EMBRAPA)
6	<i>Pseudopestalotiopsis gilvanii</i>	222	Guaranazeiro (folhas)
7	<i>Rhizoctonia solani</i>	2942	Feijão

As placas foram incubadas a 28 °C por um período de 15 dias, e a atividade antagônica foi avaliada por meio da medição do diâmetro das colônias dos fitopatógenos. Como controle positivo, utilizou-se o crescimento dos fitopatógenos em meio BDA, na ausência das linhagens de *Bacillus*. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada utilizando a fórmula: $\text{Inibição (\%)} = ((C - T)/C) \times 100$, em que *C* representa a média do diâmetro das colônias nas placas-controle e *T* corresponde à média do diâmetro das colônias dos fitopatógenos em cocultivo com as linhagens bacterianas. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata, a fim de assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

2.5. Atividade enzimática

A produção de enzimas extracelulares foi avaliada por meio de ensaios qualitativos em meio sólido, específicos para cada enzima (Tabela 2). Os testes foram realizados em triplicata, com incubação das placas a 25 °C por 5 dias, em pH 7. A atividade enzimática foi estimada pela formação de halos de degradação ao redor das colônias. Para a avaliação da produção de lipase, as placas foram incubadas por 10 dias, uma vez que, nos ensaios preliminares, observou-se que a degradação ocorria apenas após o quinto dia

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados para a detecção qualitativa das atividades enzimáticas extracelulares (quitinase, glucanase, lipase, celulase e protease).

Atividade Enzimática	Meio de Cultura (g/L)	Indicador / Revelação	Referência
Quitinase	Quitina coloidal (10), KCl (0,2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1), Ágar (15), Água destilada (1 L)	Formação de halo claro ao redor da colônia	Roberts & Selitrennikoff (1988)
Glucanase (β-1,3)	Laminarina (5), K_2HPO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NH_4NO_3 (1), Ágar (15), Água destilada (1 L)	Corar com vermelho Congo 0,1% por 15 min e lavar com NaCl 1 M; halo claro indica atividade	Teather & Wood (1982)
Lipase	Peptona (10), NaCl (5), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), Ágar (15), Tween 20 (10 mL), Água destilada (1 L)	Formação de halo esbranquiçado ao redor da colônia	Sierra (1957)
Celulase	CMC (10), KH_2PO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NaCl (0,5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01), NH_4NO_3 (0,3), Ágar (12), Água destilada (1 L)	Corar com vermelho Congo 0,1% por 15 min e lavar com NaCl 1 M; halo claro indica atividade	Ariffin et al. (2006)
Protease	Leite em pó desnatado (2), Peptona (5), Extrato de levedura (3), Ágar (15), Água destilada (1 L)	Formação de halo de clareamento ao redor da colônia	Hankin & Anagnostakis (1975)

2.6 Tolerância a temperatura

A tolerância térmica dos isolados foi avaliada em meio LB (Luria-Bertani) a 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 °C. Os isolados foram incubados por cinco dias, e o crescimento foi monitorado diariamente. A condição ótima de cultivo foi determinada com base no desempenho do crescimento observado em cada temperatura.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização filogenômica

A análise filogenômica baseada em genomas completos revelou a posição taxonômica das três linhagens isoladas dos sedimentos amazônicos: MPUR33.1, MPUR35.2 e MPUR44.1. A árvore filogenética construída evidencia que as cepas MPUR33.1 e MPUR35.2 formam um clado com *Bacillus oryzicola* KACC 18228 e *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* FZB42, indicando uma estreita relação com o complexo *B. amyloliquefaciens sensu lato*.

Por outro lado, a linhagem MPUR44.1 foi agrupada com *Bacillus subtilis* NCIB 3610 e *B. subtilis* ATCC 6051, com alto suporte filogenético (bootstrap = 92), apontando uma forte relação com a espécie *B. subtilis*. No entanto, análises complementares de identidade genômica indicam que essa linhagem apresenta divergência suficiente para ser considerada uma subespécie ou variante ecológica adaptada ao ambiente sedimentar amazônico.

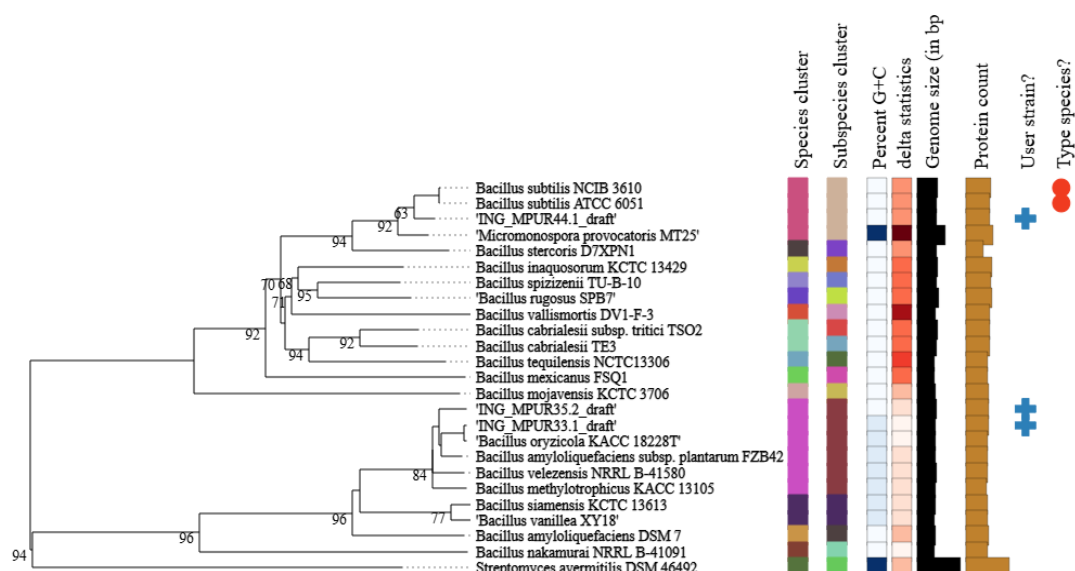


Figura 1. Árvore filogenética construída pelo TYGS baseada no genoma completo das linhagens MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1.

3.2 Predição de genes biossintéticos

A análise genômica dos três isolados *Bacillus* (MPUR33.1, MPUR35.2 e MPUR44.1) por meio da ferramenta antiSMASH revelou um perfil diversificado de clusters biossintéticos, com potencial para a produção de compostos bioativos relevantes. No total, foram identificados 15, 20 e 20 clusters biossintéticos nos isolados *MPUR33.1*, *MPUR35.2* e *MPUR44.1*, respectivamente.

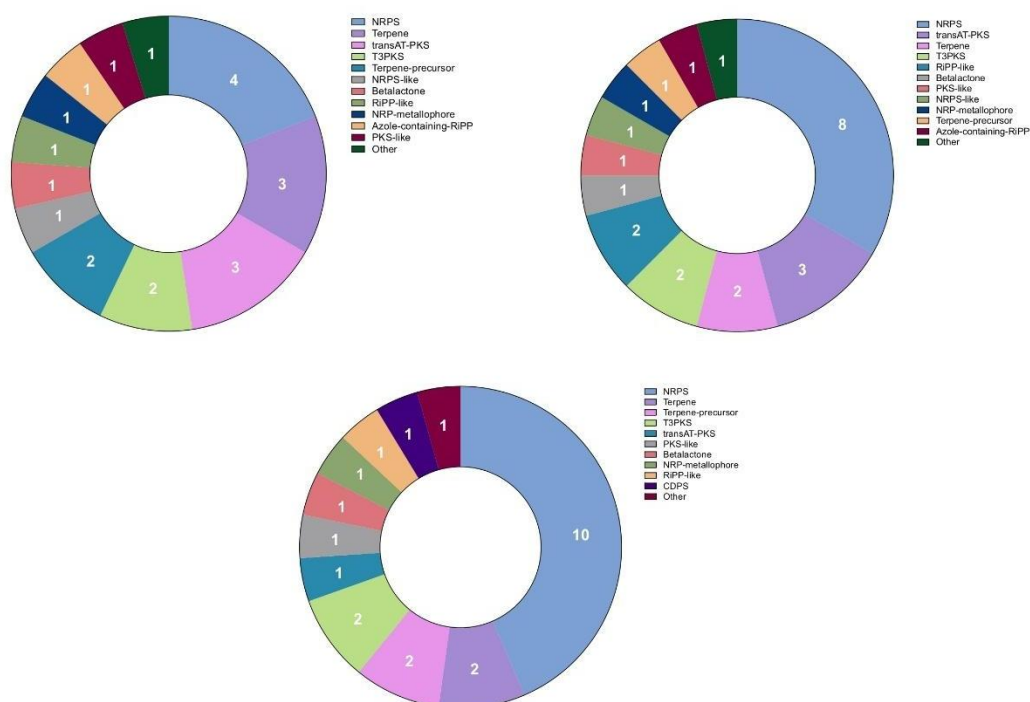


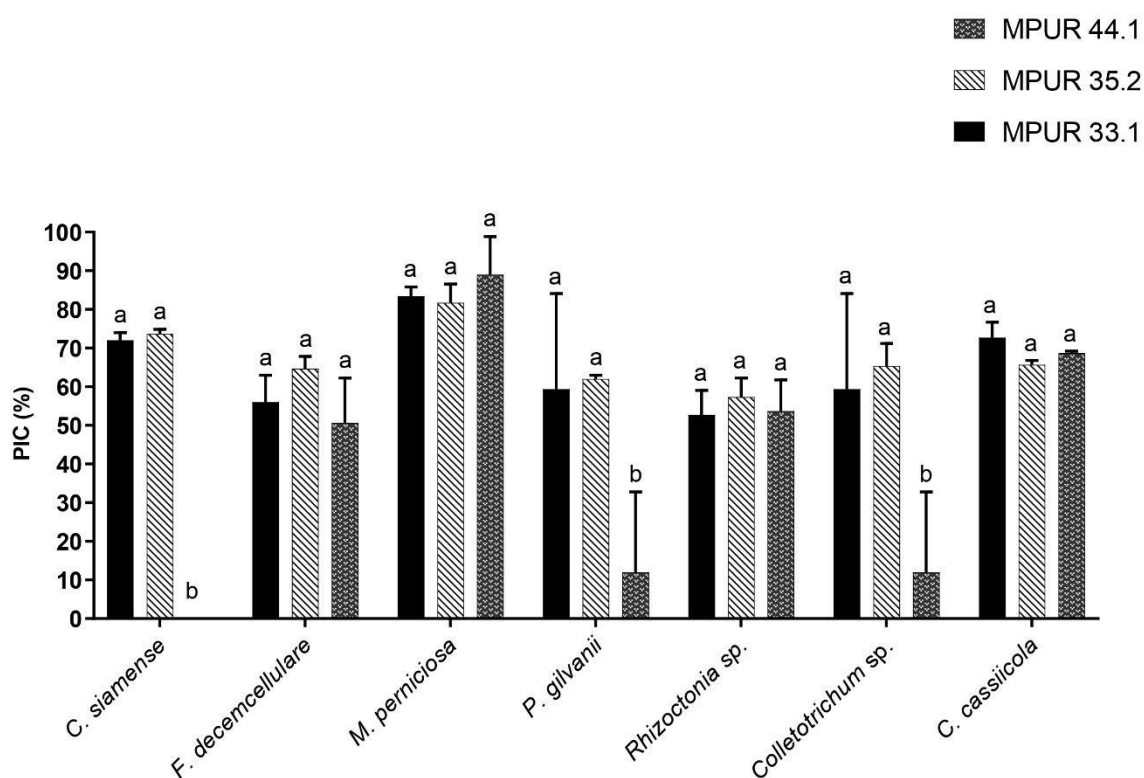
Figura 2. Comparação dos principais clusters biossintéticos identificados nos genomas dos isolados *MPUR33.1*, *MPUR35.2* e *MPUR44.1* por meio da ferramenta antiSMASH.

Sete clusters foram compartilhados entre pelo menos dois dos isolados, destacando-se aqueles associados à biossíntese de bacillibactina, surfactina, fengicina, bacilicina, difficidina, bacillaene e macrolactina H, compostos reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, siderofóricas e biosurfactantes. Esses resultados indicam um perfil conservado de produção de metabólitos secundários com potencial biotecnológico. Já o isolado *MPUR44.1* apresentou maior diversidade de clusters, com identificação exclusiva de BGCs relacionados à produção de subtilosina A, ácido pulcherrimínico, plipastatina e termoactinoamida A (Suplemento 1). Estes compostos estão associados a atividades antimicrobianas específicas e sugerem que esse isolado possui um potencial biossintético mais amplo, representando uma fonte promissora para a descoberta de novos metabólitos de interesse agrônômico e farmacêutico.

3.3 Atividade antagônica de *Bacillus* contra diferentes fitopatógenos

Os isolados de *Bacillus* MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1 foram avaliados quanto à sua atividade antagônica contra os fitopatógenos *M. perniciosa*, *F. decemcellulare*, *C. siamense*, *P. gilvanii*, *Rhizoctonia solani*, *C. spaethianum* e *C. cassiicola*. O percentual de crescimento micelial (PIC) variou de 12% a 89% entre os patógenos testados. Todos os isolados apresentaram a maior atividade antagônica contra *M. perniciosa*, com índices de crescimento micelial de 81%, 83% e 89% para os isolados MPUR 35.2, MPUR 33.1 e MPUR 44.1, respectivamente. No entanto, o isolado MPUR 44.1 não demonstrou inibição significativa contra *C. siamense*.

Figura 3. Índice de inibição de crescimento micelial (PIC) de fitopatógenos distintos por *Bacillus* spp. (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1). Letras iguais significam que não houve diferença significativa no percentual de inibição entre os três isolados.



3.4 Atividade enzimática

As três linhagens de *Bacillus* avaliadas apresentaram capacidade de produção de enzimas extracelulares, com variações nos níveis de atividade enzimática. A linhagem MPUR 33.1 destacou-se na produção de amilase (IE = 6) e celulase (IE = 7,9), enquanto a maior atividade de lipase também foi observada nessa linhagem (IE = 4,07). Por outro lado, a linhagem MPUR 35.2 apresentou o maior halo de protease (IE = 12,7), sendo também eficiente na produção de celulase (IE = 7,97) e amilase (IE = 5,8). A linhagem MPUR 44.1 apresentou os menores halos de atividade enzimática para todas as enzimas testadas, com destaque para os valores de IE = 2,7 para amilase e IE = 2,1 para lipase.

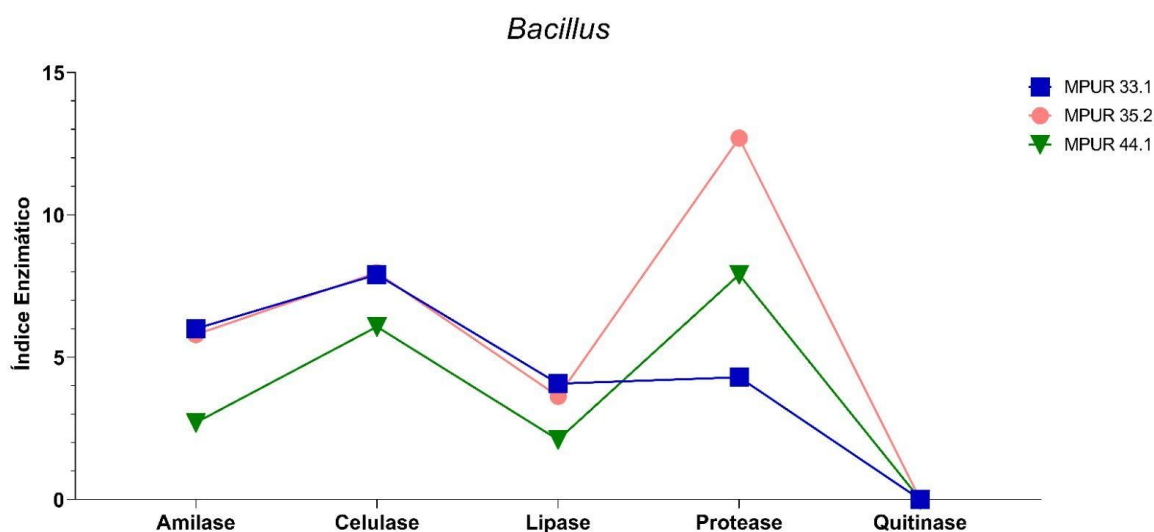


Figura 4. Índice Enzimático (IE) obtido nos testes qualitativos de produção de enzimas extracelulares (amilase, celulase, lipase e protease) pelas linhagens de *Bacillus* MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1.

3.5 Tolerância a temperatura

As três linhagens de *Bacillus* (MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1) apresentaram ótimo crescimento nas temperaturas de 25 °C a 45 °C, indicando ampla tolerância térmica nessa faixa. No entanto, a 50 °C, observou-se uma redução no crescimento das linhagens MPUR 33.1 e MPUR 35.2, que apresentaram apenas crescimento fraco, enquanto a linhagem MPUR 44.1 manteve crescimento abundante ótimo nessa condição. A 55 °C, apenas MPUR 44.1 mostrou crescimento, ainda que reduzido, enquanto as demais linhagens não cresceram.

Tabela 3. Crescimento de linhagens de *Bacillus* em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C) *Bacillus* MPUR 33.1 *Bacillus* MPUR 35.2 *Bacillus* MPUR 44.1

25	+++	+++	+++
30	+++	+++	+++
35	+++	+++	+++
40	+++	+++	+++
45	+++	+++	+++
50	+	+	+++
55	–	–	+

(+++) crescimento abundante, (+) crescimento fraco, (–) ausência de crescimento.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste capítulo mostraram o potencial biotecnológico das linhagens bacterianas MPUR 33.1, MPUR 35.2 e MPUR 44.1, isoladas de sedimentos amazônicos, reforçando a importância da exploração microbiana em ambientes pouco estudados. A caracterização filogenômica revelou que MPUR 33.1 e MPUR 35.2 estão filogeneticamente relacionadas ao complexo *Bacillus amyloliquefaciens* sensu lato, enquanto MPUR 44.1 se agrupa com *Bacillus subtilis*, embora apresente divergências genômicas indicativas de uma possível subespécie ou variante adaptada a nichos sedimentares.

Além disso, a predição de clusters de genes biossintéticos revelou perfis metabólicos distintos entre os isolados, com destaque para MPUR 44.1, que apresentou agrupamentos exclusivos associados à produção de compostos bioativos com potencial antimicrobiano e antifúngico. A detecção de clusters conservados, como os relacionados à biossíntese de surfactina, fengicina e bacillibactina, reforça a capacidade dessas linhagens de produzir metabólitos secundários com aplicações potenciais nos setores agrícola e farmacêutico.

Os testes de antagonismo *in vitro* confirmaram a eficácia das três linhagens no biocontrole de fitopatógenos de relevância econômica, principalmente contra

Moniliophthora perniciosa. Apesar de MPUR 44.1 não ter apresentado atividade contra *Colletotrichum siamense*, destacou-se pela ampla atividade inibitória frente à maioria dos patógenos testados. Os ensaios enzimáticos complementaram os resultados, mostrando a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, como amilase, celulase, lipase e protease, sugerindo que esses mecanismos podem agir como ação no biocontrole.

A avaliação da tolerância térmica revelou que todas as linhagens cresceram bem entre 25 °C e 45 °C, sendo que MPUR 44.1 manteve crescimento mesmo a 55 °C, demonstrando notável resistência a condições extremas, o que amplia seu potencial de uso em diferentes contextos agroambientais.

Dessa forma, os resultados obtidos até o momento, fortalecem a relevância da biodiversidade microbiana amazônica como fonte estratégica de microrganismos com atributos desejáveis para aplicações sustentáveis na agricultura.

REFERÊNCIAS

ADELEKE, Bartholomew Saanu et al. Strategies to enhance the use of endophytes as bioinoculants in agriculture. **Horticulturae**, v. 8, n. 6, p. 498, 2022.

BEYARI, Eman A. Alternatives to chemical pesticides: the role of microbial biocontrol agents in phytopathogen management: a comprehensive review. **Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 291-314, 2025.

BLIN, Kai et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. **Nucleic acids research**, v. 51, n. W1, p. W46-W50, 2023.

BUSCARDO, Erika et al. Spatio-temporal dynamics of soil bacterial communities as a function of Amazon forest phenology. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4382, 2018.

CAULIER, Simon et al. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 302, 2019.

FIRA, Djordje et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD_ALLAH, Elsayed Fathi. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

ISLAM, Tarequl et al. Resistance mechanisms of plant pathogenic fungi to fungicide, environmental impacts of fungicides, and sustainable solutions. **Plants**, v. 13, n. 19, p. 2737, 2024.

MAITRA, Sagar et al. Bioinoculants—natural biological resources for sustainable plant production. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 51, 2021.

MARKET GROWTH REPORTS. *Bacillus Subtilis* Market Size, Share, Growth, and Industry Analysis, By Type (Below 100 Billion CFU/g, 100–300 Billion CFU/g, Above 300 Billion CFU/g), By Application (Feed Additives, Pesticide, Others), Regional Insights and Forecast to 2033. Disponível em: <https://www.marketgrowthreports.com/enquiry/request-sample/105249>. Acesso em: 13 jul. 2025.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P. et al. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D801-D807, 2022.

NEWMAN, Lenore et al. Agriculture for the Anthropocene: novel applications of technology and the future of food. **Food Security**, v. 15, n. 3, p. 613-627, 2023.

OLIVEIRA, Ana Carolina Favacho Miranda et al. A metabologenomics approach reveals the unexplored biosynthetic potential of bacteria isolated from an Amazon Conservation Unit. **Microbiology Spectrum**, v. 13, n. 1, p. e00996-24, 2025.

PEREIRA, Jose Odair et al. Overview on biodiversity, chemistry, and biotechnological potential of microorganisms from the Brazilian Amazon. In: Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. Cham: Springer **International Publishing**, 2017. p. 71-103.

PUT, Hanne et al. *Bacillus subtilis* as a host for natural product discovery and engineering of biosynthetic gene clusters. **Natural Product Reports**, v. 41, n. 7, p. 1113-1151, 2024.

QIN, Wan-Qi et al. Genome mining, structural elucidation and surface-active property of a new lipopeptide from *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 106, 2025.

ROCKSTRÖM, Johan et al. Sustainable intensification of agriculture for human prosperity and global sustainability. **Ambio**, v. 46, n. 1, p. 4-17, 2017.

SALES, Luziane Ramos; RIGOBELLO, Everlon Cid. The role of *Bacillus* sp. in reducing chemical inputs for sustainable crop production. **Agronomy**, v. 14, n. 11, p. 2723, 2024.

SERRÃO, Cleyson Pantoja et al. *Bacillus* species as tools for biocontrol of plant diseases: A meta-analysis of twenty-two years of research, 2000–2021. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 110, 2024.

SHAILI, Shabrin Jahan; KABIRAJ, Uttam Kumar; MAHEDI, Md. Fungal Biocontrol in Agriculture: A Sustainable Alternative to Chemical Pesticides—A Comprehensive Review. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 26, n. 1, p. 2305-2316, 2025.

SHEORAN, Asha Rani et al. Enhancing plant disease resistance: insights from biocontrol agent strategies. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 44, n. 2, p. 436-459, 2025.

THOMPSON, Cristiane C. et al. Diversity of microbiomes across a 13,000-year-old Amazon sediment. **Microbial ecology**, v. 86, n. 3, p. 2202-2209, 2023.

WU, Xinmai et al. Four decades of *Bacillus* biofertilizers: Advances and future prospects in agriculture. **Microorganisms**, v. 13, n. 1, p. 187, 2025.

ZHAO, Wenya et al. Mining public genomic databases for novel lanthipeptides: a case study on *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 38, n. 1, p. 2402447, 2024.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Comparação dos principais clusters biossintéticos identificados nos genomas dos isolados *MPUR33.1*, *MPUR35.2* e *MPUR44.1* por meio da ferramenta antiSMASH.

MPUR 33.1				MPUR 35.1				MPUR 44.1			
Region	Type	Most similar known	Similarity (%)	Region	Type	Most similar known	Similarity (%)	Region	Type	Most similar known	Similarity (%)
1.1	Terpene-precursor	-	-	1.1	NRP-metallophore, NRPS, RiPP-like	bacillibactin	High	1.1	other	bacilysin	High
1.2	transAT-PKS	difficidin	High	2.1	NRPS	surfactin	High	1.2	sactipeptide	subtilosin A	High
1.3	T3PKS	-	-	2.2	RiPP-like	-	-	1.3	CDPS	pulcherriminic acid	High
1.4	terpene	-	-	3.1	NRPS, betalactone	fengycin	High	1.4	NRP-metallophore, NRPS, terpene-precursor	bacillibactin	High
2.1	transAT-PKS	macrolactin H	High	3.2	T3PKS	-	-	2.1	terpene-precursor	-	-
2.2	transAT-PKS, T3PKS, NRPS-like, NRPS	bacillaene	High	3.3	transAT-PKS	difficidin	High	2.2	T3PKS	1-carbapen-2-em-3-carboxylic acid	Low
2.3	NRPS, betalactone	fengycin	High	4.1	other	bacilysin	High	2.3	terpene	-	-
3.1	other	bacilysin	High	5.1	terpene	-	-	2.4	NRPS	plipastatin	Low
4.1	NRPS	surfactin	High	5.2	PKS-like	-	-	3.1	terpene	-	-

4.2	azole-containing-RiPP	-	-	9.1	transAT-PKS	macrolactin H	High	3.2	NRPS	-	-
5.1	terpene	-	-	10.1	terpene-precursor	-	-	4.1	NRPS, betalactone	fengycin	High
5.2	PKS-like	-	-	11.1	terpene	-	-	4.2	transAT-PKS, NRPS, T3PKS, PKS-like	bacillaene	High
6.1	RiPP-like, NRP-metallophore, NRPS, terpene-precursor	bacillibactin	High	12.1	transAT-PKS, NRPS-like, T3PKS, NRPS	bacillaene	High	6.1	NRPS	surfactin	Low
15.1	NRPS	fengycin	Low	28.1	NRPS	fengycin		7.1	NRPS	surfactin	Low
				31.1	NRPS	-	-	11.1	NRPS	plipastatin	Low
				32.1	NRPS	paenilarvin A/paenilarvin B/ paenilarvin C	Medium	13.1	NRPS	-	-
				34.1	NRPS	-	-	14.1	NRPS	-	-
				38.1	azole-containing-RiPP			16.1	NRPS	-	-
				40.1	NRPS	-	-	19.1	NRPS	-	-

REFERÊNCIAS GERAL

AL-QUWAIE, Diana A. The role of *Streptomyces* species in controlling plant diseases: a comprehensive review. **Australasian Plant Pathology**, v. 53, n. 1, p. 1–14, 2024.

BEYARI, Eman A. Alternatives to chemical pesticides: the role of microbial biocontrol agents in phytopathogen management: a comprehensive review. **Journal of Plant Pathology**, p. 1–24, 2024.

BLIN, Kai et al. antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. **Nucleic Acids Research**, p. gkaf334, 2025.

CHATTERJEE, Kanchan et al. Application of streptomycetes in medicine. In: **Bioeconomy of Streptomyces**. CRC Press, 2025. p. 119-141.

FENIBO, Emmanuel O.; IJOMA, Grace N.; MATAMBO, Tonderayi. Biopesticides in sustainable agriculture: Current status and future prospects. **New and future development in biopesticide research: Biotechnological exploration**, p. 1-53, 2022.

GAI, Yunpeng; WANG, Hongkai. Plant disease: a growing threat to global food security. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1615, 2024.

GODANA, Esa Abiso et al. Biotechnological and biocontrol approaches for mitigating postharvest diseases caused by fungal pathogens and their mycotoxins in fruits: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 46, p. 17584–17596, 2023.

HEZAKIEL, Helseena Ellickel et al. Biopesticides: a green approach towards agricultural pests. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, n. 8, p. 5533–5562, 2024.

ISHANGULYYEV, Rovshen; KIM, Sanghyo; LEE, Sang Hyeon. Understanding food loss and waste—why are we losing and wasting food?. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 297, 2019.

KHATRI, Priti et al. Understanding the intertwined nature of rising multiple risks in modern agriculture and food system. **Environment, Development and Sustainability**, v. 26, n. 9, p. 24107–24150, 2024.

KUMAR, Munendra et al. Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1597–1615, 2020.

KHUSHBOO et al. Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 16, n. 1, p. 244–264, 2022.

KOMAKI, Hisayuki. Resolution of housekeeping gene sequences used in MLSA for the genus *Streptomyces* and reclassification of *Streptomyces anthocyanicus* and *Streptomyces tricolor* as heterotypic synonyms of *Streptomyces violaceoruber*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 005370, 2022.

LAVANYA, S. N. et al. Recent advancement in multiomics techniques for the exploration of microbial diversity. In: **Biodiversity, Bioengineering, and Biotechnology of Fungi**. Academic Press, 2025. p. 227-253.

MADHUSHAN, Asanka et al. From natural hosts to agricultural threats: the evolutionary journey of phytopathogenic fungi. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 1, p. 25, 2025.

MENG, Xiangjia et al. Biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* LSR7 against rubber red root rot disease. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 12, p. 849, 2024.

MISPELAERE, Marieke et al. Whole genome–based comparative analysis of the genus *Streptomyces* reveals many misclassifications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 453, 2024.

NAWAZ, Shahid et al. Genomic, molecular networking–based metabolomic, and bioactivity profiling of actinobacteria from undisturbed caves in Pakistan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–14, 2025.

NGUYEN, T. T. et al. *In silico* and *in vitro* analyses reveal the potential use of *Streptomyces parvulus* VNUA74 as bioagent for sustainable banana production. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 7049, 2025.

NOUIOUI, Imen et al. Polyphasic taxonomic description of *Streptomyces okerensis* sp. nov. and *Streptomyces stoeckheimensis* sp. nov. and their biotechnological potential.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 75, n. 3, p. 006716, 2025.

OLIVEIRA, Ana Carolina Favacho Miranda de et al. A metabologenomics approach reveals the unexplored biosynthetic potential of bacteria isolated from an Amazon Conservation Unit. **Microbiology Spectrum**, v. 13, n. 1, p. e00996-24, 2025.

PALAZZOTTO, Emilia; WEBER, Tilmann. Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 109–116, 2018.

PATEL, Bhoomi N.; PATEL, Priti; PATEL, Gayatri. Antagonistic behavior of *Streptomyces chartreuse* against pathogenic bacteria in *Ricinus communis* L. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 21, n. 1, p. 185–192, 2024.

PORAT, Ron et al. Postharvest losses of fruit and vegetables during retail and in consumers' homes: quantifications, causes, and means of prevention. **Postharvest Biology and Technology**, v. 139, p. 135–149, 2018.

PRIYA, R. Sathya et al. Effects of climate change on plant diseases. In: **Plant Quarantine Challenges under Climate Change Anxiety**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024. p. 183-225.

QI, Dengfeng et al. Taxonomic identification and antagonistic activity of *Streptomyces luomodiensis* sp. nov. against phytopathogenic fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1402653, 2024.

SALES, Luziane Ramos; RIGOBELLO, Everlon Cid. The role of *Bacillus* sp. in reducing chemical inputs for sustainable crop production. **Agronomy**, v. 14, n. 11, p. 2723, 2024.

SADVAKASOVA, Assemgul K. et al. Combating phytopathogens by integration of metagenomics and phototrophic biotechnologies: toward sustainable agricultural practices. **Critical Reviews in Plant Sciences**, p. 1–18, 2025.

SAWICKA, Barbara; EGBUNA, Chukwuebuka. Pests of agricultural crops and control measures. In: **Natural remedies for pest, disease and weed control**. Academic Press, 2020. p. 1-16.

SHAHBAZI, Feizollah; SHAHBAZI, Saba; ZARE, Dariush. Losses in agricultural produce: causes and effects on food security. **Food and Energy Security**, v. 14, n. 3, p. e70086, 2025.

SHARMA, Itika et al. Fungal endophyte bioinoculants as a green alternative towards sustainable agriculture. **Heliyon**, v. 9, n. 9, 2023.

SUMAN, Archana et al. Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 805498, 2022.

SETHI, Yashendra et al. *Streptomyces* paradigm in anticancer therapy: a state-of-the-art review. **Current Cancer Therapy Reviews**, v. 20, n. 4, p. 386–401, 2024.

SIVALINGAM, Periyasamy et al. Endophytic *Streptomyces*: an underexplored source with potential for novel natural drug discovery and development. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 11, p. 442, 2024.

TANAKA, Kenya et al. Metabolomics-based development of bioproduction processes toward industrial-scale production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 85, p. 103057, 2024.

VOJNOVIC, Sandra et al. *Bacillus* e *Streptomyces* spp. como hospedeiros para produção de enzimas industrialmente relevantes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 185, 2024.

ZHANG, Bo et al. Natural antimicrobial lipopeptides secreted by *Bacillus* spp. and their application in food preservation: a critical review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 127, p. 26–37, 2022.

ZHOU, Wei; LI, Mengmeng; ACHAL, Varennyam. A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. **Emerging Contaminants**, p. 100410, 2024.

WANG, Mingxuan et al. *Streptomyces* strains and their metabolites for biocontrol of phytopathogens in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 2077–2088, 2024.

WANG, Yuhu et al. Whole-genome analysis revealed the growth-promoting and biological control mechanism of the endophytic bacterial strain *Bacillus halotolerans* Q2H2, with strong antagonistic activity in potato plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1287921, 2024.

WU, Xinmai et al. Four decades of *Bacillus* biofertilizers: advances and future prospects in agriculture. **Microorganisms**, v. 13, n. 1, p. 187, 2025.

YE, Dongyang et al. Microbial metabolomics: from novel technologies to diversified applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 148, p. 116540, 2022.