**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**
**INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RAFAEL PINTO E SOUZA**

# Mineração genômica e prospecção de moléculas de *Streptomyces* spp. isolados de sedimentos de rios amazônicos

**COARI-AM**
**2023**

**RAFAEL PINTO E SOUZA**

# Mineração genômica e prospecção de moléculas de *Streptomyces* spp. isolados de sedimentos de rios amazônicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito parcial para a obtenção de título de mestre em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva
**Co-orientador:** Prof. Dr. Eraldo Ferreira Lopes
**Co-orientadora:** Dra. Claudia Afras de Queiroz

**COARI-AM**
**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo autor.

S729m

Souza, Rafael Pinto e
Mineração genômica e prospecção de moléculas de Streptomyces spp. isolados de sedimentos de rios amazônicos / Rafael Pinto e Souza . 2023
130 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva
Coorientador: Eraldo Ferreira Lopes
Coorientadora: Claudia Afras de Queiroz
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bioinformática. 2. Biomoléculas. 3. Biotecnologia. 4. Actinobactéria. 5. Metabólitos secundários. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

ATA DA 182ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Aos 29 dias do mês de agosto de 2023, às 09 h, a banca examinadora composta pelos docentes Prof(a). Dr(a). Gilvan Ferreira da Silva (Presidente), Prof(a). Dr(a). Edmar Vaz de Andrade (Membro), Prof(a). Dr(a). Waldirene Rocha Gomes (Membro), assim designados pela Portaria 52/PPGBIOTEC de 10/08/2023, se reuniu para avaliar a apresentação e defesa de dissertação do(a) discente **Rafael Pinto e Souza**, com trabalho intitulado "**Mineração genômica e prospecção de moléculas de *Streptomyces* spp. isoladas de sedimentos de rios amazônicos**", sendo seu (a) orientador (a) Prof(a). Dr(a). Gilvan Ferreira da Silva, Coorientação do(a) Prof(a). Dr(a).Eraldo Ferreira Lopes e Coorientação do(a) Prof(a). Dr(a) Claudia Afras de Queiroz. O vice-coordenador do PPGBIOTEC, Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, fez a a abertura da sessão. Após a abertura da sessão, foi relatado que o(a) discente cumpriu todos os pré-requisitos necessários para a apresentação e defesa de sua dissertação de mestrado. Foi informado que (o)a discente dispõe de 30 a 60 minutos para concluir a sua apresentação e que em seguida terá início a arguição, sendo de até 30 minutos para cada membro da banca. Ao término da arguição, cada membro da banca examinadora fará o seu julgamento, em sessão secreta, atribuindo ao(à) discente o conceito APROVADO ou REPROVADO. O(A) discente será considerado APROVADO se receber este parecer pela maioria dos membros da banca examinadora. De acordo com o regimento interno do programa a aprovação na defesa de dissertação é um pré-requisito para a obtenção do título de Mestre(a) em Biotecnologia e, que somente após a entrega da versão final da dissertação defendida, lhe será concedido o título de Mestre(a) em Biotecnologia. A coordenação das atividades foi atribuída ao(à) presidente da banca examinadora, Prof(a). Dr(a). Gilvan Ferreira da Silva, que conduziu as atividades. A apresentação, a arguição e a defesa foram realizadas de modo remoto utilizando a ferramenta para conferência web:https://meet.jit.si/. Após apresentação pelo discente, a arguição e deliberação a banca examinadora emitiu os seguintes pareceres:

| Examinador(a) | Aprovado(a) | Reprovado(a) |
|---|---|---|
| Prof(a). Dr(a). Gilvan Ferreira da Silva (Presidente) | X | |
| Prof(a). Dr(a). Edmar Vaz de Andrade (Membro) | X | |
| Prof(a). Dr(a). Waldirene Rocha Gomes (Membro) | X | |
| **Parecer Final** | **APROVADO** | |

O discente foi aprovado, mas com correções a serem feitas conforme sugestão da banca. Nada mais havendo a tratar, eu, Gilvan Ferreira da Silva, dei por encerrada a reunião e lavrei a presente ata que segue assinada por mim, pelos demais membros da banca examinadora e pelo coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

em Manaus, 29 de agosto de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Edmar Vaz de Andrade**, **Coordenador em exercício**, em 31/08/2023, às 12:07, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Gilvan Ferreira Da Silva**, **Usuário Externo**, em 31/08/2023, às 12:36, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Waldireny Rocha Gomes**, **Professor do Magistério Superior**, em 31/08/2023, às 21:02, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1684723** e o código CRC **BA55F90B**.

Avenida General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroado I Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Sul, Bloco 1, ICB, 3º andar - Telefone: (92) 3305-1181 / Ramal 2380
CEP 69080-900, Manaus/AM, ppgbiotec@ufam.edu.br

À minha família: Olga e Moisés (*in memoriam*), Ednéia, Bêda, Ana Beatriz, Denise e Ana Vitória.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força, determinação e Fé!

A minha mãe, Ednéia. Ao meu pai, Bêda. A minha irmã, Ana Beatriz por sempre apoiar e incentivar a continuar estudando. Em especial a minha mãezinha, por todo o apoio, carinho, amor, cuidados, sacrifícios e renúncias para dar sempre o melhor a mim, serei eternamente agradecido. Assim como meus tios e tias sempre serão uma inspiração de vida.

A Denise, esposa e amiga, por todo amor, compreensão, paciência, companheirismo, incentivo e colaboração. A Ana Vitória, minha filha, pelo constante carinho. Vocês são uma Benção de Deus em minha vida.

Reitero o agradecimento a todos pelo incentivo em realizar a pós-graduação e por sempre apoiarem em todos os meus momentos da vida. Amo vocês! Desculpa pela ausência em momentos de comemoração e de perdas.

Aos meus amigos, Uátyla e Michel, pelo incentivo e ajuda no processo de seleção do mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva**,** expresso minha gratidão por todos os ensinamentos os quais foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Eraldo Ferreira Lopes e a Dra. Cláudia Afras de Queiroz, os quais sempre estavam dispostos a ajudar.

Aos meus colegas de laboratório, Valdir, Gerodes, Annie, Caio, Ingride, Thiago, Felipe, Aydra, Icaro, Moysés, Weyder pelos momentos vividos, pelas risadas nos momentos difíceis, assim como pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Amazônia Ocidental, Jefferson Cruz e Irani de Morais, por toda as orientações administrativas e no decorrer do desenvolvimento das atividades práticas.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), por toda estrutura. Assim como, todos os docentes, técnicos administrativos/laboratórios e aos representantes discentes por sempre ajudarem e contribuírem para o programa.

Até aqui nos ajudou o Senhor.

1 Samuel 7:12

**RESUMO**

A produção agrícola global tem sido impactada por uma ampla gama de doenças causadas por fitopatogênicos, responsáveis por 42% das perdas nas plantações e o uso de defensivos químicos ainda é o principal método utilizado na agricultura para o controle de doenças. Portanto, torna-se importante a busca por alternativas como o controle biológico, que apresenta a vantagem de mínima ou nenhuma toxicidade residual e contaminação ambiental. Microrganismos produtores de moléculas antifúngicas, como, as bactérias do gênero *Streptomyces*, podem ser um recurso natural utilizado no controle biológico, bem como uma fonte de novas moléculas aplicadas à agricultura. A seleção de microrganismos com atividade antagônica contra fitopatógenos, aliada às análises *in sílico* de genomas completos por ferramentas de bioinformática tem facilitado a caracterização de potenciais biocontroladores e a prospecção de produtos naturais por meio da identificação dos genes envolvidos em vias metabólicas relacionadas ao metabolismo secundário, conhecidas como "*biosynthetic gene clusters*" (BGCs). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar quatro isolados de *Streptomyces* quanto ao potencial antagonista contra patógenos de interesse agrícola, atividade citotóxica e realizar a prospecção de metabólitos secundários por meio de mineração genômica. A análise filogenômica dos isolados MPUR-31.3 e SOL 159 com base nos valores de dDDH revelou que ambos apresentam dDDH menor que 70% e representam novas espécies, já para os isolados MPUR-28.3 pertence a espécie *Streptomyces glomeratus* (dDDH 87,9 %) e MPUR-51.7 *Streptomyces albidoflavus* (dDDH 88,2 %). A atividade antagonista *in vitro* contra 13 fitopatógenos indicou que isolado MPUR-28.3 apresentou inibição contra todos os fitopatógenos, sendo a maior contra *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (85,2 %). Já os isolados MPUR-31.3 e MPUR-51.7 inibiram 10 dos 13 fitopatógenos, com a maior inibição foi contra *Rhizoctonia* sp. INPA 2943 (90,2 %) e *Colletotrichum scovillei* INPA 2910 (65,9 %) respectivamente. Enquanto o SOL-159 inibiu apenas 5 fitopatógenos dos 13 avaliados, sendo a melhor inibição contra *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (42 %). Os testes preliminares da atividade citotóxica dos extratos obtidos dos quatros isolados de *Streptomyces* contra as linhagens de células de carcinoma de cólon humano (HCT116) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2) apresentam resultados abaixo de 75% não sendo considerados promissores. A mineração genômica identificou em *S. limosus* (MPUR-28.3) 39 BGCs e 45 BGCs em *S. albidoflavus* (MPUR-51.7), nas novas espécies foram identificados 55 BGCs na linhagem MPUR-31.3 e 24 BGCs em SOL-159. Com base nos BGCs foi possível predizer a biossíntese de diversas biomoléculas com amplas atividades, destacando-se as anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, as quais são de importância industrial, agrícola, ambiental, médica, veterinária e de alimentos.

**Palavras-chave:** Bioinformática; Biomoléculas; Biotecnologia; Actinobactéria; Metabólitos secundários.

**ABSTRACT**

Global agricultural production has been impacted by a wide range of diseases caused by phytopathogens, responsible for 42% of losses in crops, and the use of chemical pesticides remains the primary method used in agriculture for disease control. Therefore, the search for alternatives such as biological control becomes important, which presents the advantage of minimal or no residual toxicity and environmental contamination. Microorganisms producing antifungal molecules, such as bacteria of the genus *Streptomyces*, can be a natural resource used in biological control, as well as a source of new molecules applied to agriculture. The selection of microorganisms with antagonistic activity against phytopathogens, combined with in silico analyses of complete genomes by bioinformatics tools, has facilitated the characterization of potential biocontrol agents and the prospecting of natural products through the identification of genes involved in secondary metabolism pathways, known as biosynthetic gene clusters (BGCs). In this context, the objective of this work was to evaluate four *Streptomyces* isolates for their potential antagonistic activity against agricultural pathogens, cytotoxic activity and to prospect secondary metabolites through genomic mining. Phylogenomic analysis of isolates MPUR-31.3 and SOL 159 based on dDDH values revealed that both have dDDH lower than 70% and represent new species, while isolates MPUR-28.3 belong to the species *Streptomyces glomeratus* (dDDH 87.9%) and MPUR-51.7 *Streptomyces albidoflavus* (dDDH 88.2%). The in vitro antagonistic activity against 13 phytopathogens indicated that isolate MPUR-28.3 inhibited all phytopathogens, with the highest inhibition against *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (85.2%). Isolates MPUR-31.3 and MPUR-51.7 inhibited 10 out of 13 phytopathogens, with the highest inhibition against *Rhizoctonia* sp. INPA 2943 (90.2%) and *Colletotrichum scovillei* INPA 2910 (65.9%), respectively. While SOL-159 inhibited only 5 out of the 13 evaluated phytopathogens, with the best inhibition against *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (42%). Preliminary tests of cytotoxic activity of extracts obtained from the four *Streptomyces* isolates against human colon carcinoma (HCT116) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell lines showed results below 75%, not considered promising. Genomic mining identified 39 BGCs in *S. limosus* (MPUR-28.3) and 45 BGCs in *S. albidoflavus* (MPUR-51.7), while 55 BGCs were identified in the new species lineage MPUR-31.3 and 24 BGCs in SOL-159. Based on the BGCs, it was possible to predict the biosynthesis of several biomolecules with broad activities, highlighting anticancer, antifungal, antibacterial, antioxidant activities, which are of industrial, agricultural, environmental, medical, veterinary, and food importance.

**Keywords:** Bioinformatics; Biomolecules; Biotechnology; Actinobacteria; Secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Representação esquemática do ensaio *in vitro* 43

**Figura 2 -** Características morfológicas e a microscopia eletrônica de varredura 49

**Figura 3 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado MPUR-28.3 53

**Figura 4 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado MPUR-31.3 54

**Figura 5 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado MPUR-51.7 55

**Figura 6 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado SOL-159 56

**Figura 7** - Anotação funcional do isolado MPUR-28.3 59

**Figura 8 -** Anotação funcional do isolado MPUR-31.3 60

**Figura 9 -** Anotação funcional do isolado MPUR-51.7 61

**Figura 10 -** Anotação funcional do isolado SOL-159 62

**Figura 11 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem MPUR-28.3 67

**Figura 12 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem MPUR-31.3 68

**Figura 13 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem MPUR-51.7 69

**Figura 14 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem SOL-159 70

**Figura 15 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Antimicina A 73

**Figura 16 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Albaflavona 74

**Figura 17 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Desferrioxamina B 76

**Figura 18 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Ectoína 77

**Figura 19 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Geosmina 79

**Figura 20 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Tetramato Policíclico Macrolactâmicos 80

**Figura 21 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Naringenina 82

**Figura 22 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Citrulassina D 84

**Figura 23 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Polilisina 85

**Figura 24 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Hidrocarboneto 1-heptadeceno 86

**Figura 25 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Malacidina A e B 87

**Figura 26 -** Atividade antifúngica *in vitro* dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 contra 13 diferentes patógenos de importância agrícola 92

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 -** *Streptomyces* sp. isolados de rios do Amazonas 35

**Tabela 2 -** Fitopatógenos isolados de hospedeiros de interesse agrícola 35

**Tabela 3 -** Composição dos meios de cultura 37

**Tabela 4 -** Características estruturais dos genomas dos isolados de *Streptomyces* sp. 50

**Tabela 5 -** Identificação filogenômica das linhagens de *Streptomyces* sp 51

**Tabela 6 -** Análise genômica comparativa por valores de ANI, OrtoANI, AAI, ANIb e ANIm dos isolados de *Streptomyces* sp 57

**Tabela 7 -** Percentagem de inibição do crescimento micelial de fitopatógenos de importância agrícola por *Streptomyces* spp 90

**Tabela 8 -** Porcentagem de inibição de proliferação em células tumorais 95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAI - Identidade Média de Aminoácidos (Average Aminoacid Identity)
ANI - Identidade Média de Nucleotídeos (Average Nucleotide Identity)
ANIb - BLAST ANI
ANIm - MUMmer ANI
BLAST – Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Básico (Basic Alignment Search Tool)
BMSB - Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)
dDDH - Hibridização DNA-DNA digital (digital DNA-DNA Hybridization)
DDH - Hibridização DNA-DNA (Hibridização DNA-DNA)
gANI - Genome-wide ANI
GBDP - Filogenia à distância do genoma BLAST (Genome BLAST Distance Phylogeny)
GGDC - Cálculo de Distância entre Genomas (Genome to Genome Distance Calculator)
GGDC - Genome-to-genome distance calculator
HGT - Transferência Horizontal de Genes (Horizontal Gene Transfer)
HTS - Sequenciamento de alto rendimento (High-throughput sequencing)
ICSP - Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (International Committee on Systematics of Prokaryotes)
IJSEM - Jornal Internacional de Sistemática e Microbiologia Evolutiva (International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology)
L50 - Contagem do menor número de *contigs* cuja soma de comprimento perfaz metade do tamanho do genoma
LPS - Lipopolissacarrídeo (Lipopolysaccharide)
MIBiG - Informações mínimas sobre um cluster de genes biossintéticos (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster)
MIC - Concentração inibitória minima (Minimum inhibitory concentration)
MLSA - Análise de sequência multilocus (Multi-locus Sequence analysis)
MUMi - Índice máximo de correspondências únicas (Maximum unique matches index)
N50 - Tamanho da menor sequência de *contig* usada para se obter 50% do genoma

NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (National Center for Biotechnology Information)
NGS - Sequenciamento de Próxima Geração (Next Generation Sequence)
NRPS - sintases de peptídeos não-ribossomais (Non-ribosomal peptide synthase)
OrthoANI - ANI Ortólogo (Orthologous ANI)
PCR - Reação de cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction)
RiPPs - Sintases de peptídeos ribossomalmente sintetizados e modificados pós-tradução (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides)
SGR PTMs - Tetramato Policíclico Macrolactâmicos
SSUrRNA - Subunidade Menor do Ribossomo (Small Subunit Ribosomal),
T1PKS - Policetídeo sintase tipo 1 (Polyketide synthases type 1)
T2PKS - Policetídeo sintase tipo 2 (Polyketide synthases type 2)
T3PKS - Policetídeo sintase tipo 3 (Polyketide synthases type 3)
TETRA - Tetranucleotide usage pattern
TOMM - Microcinas modificadas por tiazol/oxazol (Thiazole-oxazole-modified microcin)

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** ..... **16**

**2 OBJETIVOS** ..... **21**

**2.1 Geral** ..... **21**

**2.2 Específicos** ..... **21**

**3 REVISÃO DE LITERATURA** ..... **22**

**3.1 Fitopatógenos de interesse agrícola** ..... **22**

**3.2 Gênero *Streptomyces*** ..... **25**

**3.3 Importância Biotecnológica de *Streptomyces* spp.** ..... **25**

**3.4 Mineração genômica e abordagem OSMAC no gênero *Streptomyces*** ..... **29**

**4 METODOLOGIA** ..... **35**

**4.1 Microrganismos** ..... **35**

4.1.1 Reativação e manutenção das amostras ..... 36

**4.2 Análise morfológica e filogenômica das linhagens de *Streptomyces*** ..... **37**

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura ..... 37

4.2.2 Obtenção de rascunho e montagem do genoma ..... 38

4.2.3 Análise filogenômica das linhagens ..... 39

**4.3 Avaliação da atividade antifúngica por meio de pareamento de cultura** ..... **42**

**4.4 Mineração genômica e anotação gênica** ..... **43**

4.4.1 Identificação de *clusters* gênicos biossintéticos e prospecção de metabólitos secundários ..... 43

4.4.2 Anotação de genes e classificação em subsistemas ..... 44

**4.5 Abordagem OSMAC e obtenção de extratos para avaliação de citotoxicidade** ..... **45**

4.5.1 OSMAC ..... 45

4.5.2 Avaliação do potencial citotóxico ..... 46

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... **48**

**5.1 Caracterização morfológica das linhagens de *Streptomyces*** ..... **48**

**5.2 Sequenciamento e montagem do genoma** ..... **50**

**5.3 Identificação filogenômica das linhagens de *Streptomyces*** ..... **51**

**5.4 Anotação de genes e classificação em subsistemas** ..... **58**

**5.5 Identificação de *clusters* gênicos biossintéticos (BGCs)** ..... **66**

**5.6 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*** ..... **89**

**5.7 Abordagem OSMAC e atividade citotóxica dos extratos ..... 94**
**6 CONCLUSÃO ..... 97**
**7 REFERÊNCIAS ..... 99**
**APÊNDICE A - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO MPUR-28.3 ..... 122**
**APÊNDICE B - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO MPUR-31.3 ..... 124**
**APÊNDICE C - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO MPUR-51.7 ..... 127**
**APÊNDICE D - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO SOL-159 ..... 129**

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido como um dos países mais ricos em diversidade de espécies no planeta, abrigando mais de 15% da biota global. Essa característica inspirou o conceito de um país megadiverso, apoiado por sua extensão territorial continental e pela vasta variedade de habitats terrestres e aquáticos. O país é composto por seis importantes biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, e possui o maior sistema fluvial do mundo (ICMBIO, 2018; VALLI, RUSSO, BOLZANI, 2018).

A Amazônia corresponde a aproximadamente 5 milhões de quilômetros quadrados, o que equivale a 58,9% do território brasileiro (MELLO, 2015; PEREIRA *et al.,* 2017; CMBIO, 2018; Embrapa, 2020; ARAGÓN, 2018; IBGE, 2021). Esse ecossistema, abriga milhares de espécies desconhecidas, além disso, estima-se que existam cerca de 30 milhões de espécies. No entanto, nem todas foram encontradas e estudadas pelos cientistas, principalmente tratando-se de espécies de microrganismos (PEREIRA *et al*., 2017; ICMBIO, 2018; VALLI, RUSSO, BOLZANI, 2018).

Os microrganismos existentes na Amazônia representam recursos e patrimônios de inestimável importância e de alto valor para o país, devido à vasta diversidade de espécies e ao potencial genético que eles apresentam. Logo, a conservação desse imenso patrimônio de biodiversidade e diversidade genética torna-se essencial para assegurar a proteção e a sustentabilidade desse valioso recurso (ICMBIO, 2018; VAL e*t al.*, 2021).

A Bacia Hidrográfica Amazônica com área aproximada de 6,9 milhões de quilômetros quadrados, representa 16% da água doce na Terra e 70% da água doce no território brasileiro e desempenha um papel essencial no equilíbrio do clima global e funcionamento da vida na terra (HIRATA, 2003; ANA, 2015; PEREIRA *et al*., 2017).

As águas da Bacia Amazônica podem ser classificadas em três tipos distintos: águas brancas, ricas em nutrientes e material em suspensão, com pH próximo de neutro; águas pretas, com baixa quantidade de nutrientes e menor turbidez, apresentando pH mais baixo devido a uma quantidade superior de ácidos húmicos; e as águas claras, com baixa concentração de nutrientes e partículas, possuindo pH próximo a 7 (SIOLI, 1984, CASTELO *et al*., 2013).

Ao longo dos anos, as águas da Bacia Amazônica foram passando por grandes variações dos níveis das águas, resultando no desenvolvimento de um ambiente rico em biodiversidade. Esses processos naturais contribuíram para valorização desse ecossistema, tornando-o a maior reserva biológica do mundo. Essa região tem sido fonte de descobertas de novos microrganismos que produzem diversas moléculas de importância biotecnológica (PEREIRA *et al.,* 2017; ASTOLFI-FILHO, 2001; BECKER, 2005; MALHI *et al.,* 2008; MELLO, 2015; SOUSA *et al*., 2020; GUALBERTO *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022; DA SILVA *et al.*, 2023; SENABIO *et al.*, 2023; SOUSA *et al.*, 2023).

A diversidade microbiana dos sistemas aquáticos, especialmente em sedimentos de rios amazônicos, ainda não foi exaustivamente estudada. Esses ambientes abrigam nichos ecológicos com alta biodiversidade, o que aumenta a probabilidade de isolamento de novos microrganismos e biomoléculas com amplo potencial biotecnológico. Além disso, há um conhecimento limitado sobre a ocorrência e a diversidade genética de *Streptomyces* spp. na região da Amazônica. Sendo esse gênero bacteriano de extrema importância para a agricultura, medicina e produção de alimentos (SEIPKE, KALTENPOTH, HUTCHINGS, 2012; OKUDA *et al*., 2014; AMALFITANO *et al*., 2014; DOHERTY *et al*., 2017; PEREIRA *et al*., 2017; GOHAIN *et al*., 2020; LIMA *et al*., 2021).

Nas últimas décadas, as pesquisas biotecnológicas voltadas para a exploração do potencial microbiológico presente na Amazônia têm apresentado um notável crescimento. Pois, grande parte desse ambiente permanece inexplorada, tornando os microrganismos amazônicos uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos processos industriais e tecnologias inovadoras (DOHERTY *et al*., 2017; PEREIRA *et al*., 2017; VALLI, RUSSO, BOLZANI, 2018).

Dentre as inúmeras espécies de microrganismos encontradas, muitas estão envolvidas em processos bioativos, incluindo a produção de novas moléculas com potencial de aplicação em diversas áreas. Esses bioprodutos podem ser utilizados para inibir o desenvolvimento de fitopatógenos e até mesmo contribuir para a cura de várias doenças, elevando, assim, a qualidade de vida e oferecendo soluções para problemas atuais e futuros que possam afetar a humanidade (ASTOLFI-FILHO, 2001; PROCÓPIO *et al.,* 2012; VALLI, RUSSO, BOLZANI, 2018; SANTIAGO *et al*., 2022).

Diante desse cenário, a microbiota amazônica poderá ser valiosa para o desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis para os problemas atuais e futuros. Embora apresente alto potencial, são necessários mais investimentos e estudos para caracterizar e desvendar o potencial biotecnológico dos microrganismos Amazônicos, seja por estratégia dependente de cultivo ou por abordagens metagenômicas. Entretanto, estima-se que menos de 1% dos microrganismos são cultiváveis em condições laboratoriais. E mesmo aqueles que são cultiváveis, nem sempre são capazes de expressar todo seu potencial genômico *in vitro* (TORSVIK, OVREA, 2002). (PEREIRA *et al*., 2017; ICMBIO, 2018; VALLI, RUSSO, BOLZANI, 2018).

Um dos principais problemas da humanidade atualmente é o desenvolvimento da resistência dos microrganismos aos fármacos, principalmente de ação antibacteriana nos mais diversos tratamentos (SILVA, AQUINO, 2018; ABADI *et al.,* 2019). Essa problemática implica a preocupante possibilidade de escassez de medicamentos efetivos para o tratamento de doenças infecciosas (COOPER, SHLAES, 2011; KIM, 2021).

Segundo Cooper, Shlaes (2011) e Kim (2021) a pesquisa por novas espécies de *Streptomyces* e a descoberta de novas moléculas bioativas ou mais eficazes para combater diversos patógenos são de extrema importância, especialmente considerando o aumento de patógenos resistentes a fármacos nos últimos anos.

Em paralelo, a produção agrícola global tem sido afetada por uma ampla gama de doenças, sendo os fungos responsáveis por imensos prejuízos financeiros. A crescente resistência dos fitopatógenos aos mecanismos de defesa das plantas e aos defensivos agrícolas, incluindo fungicidas, aumenta o risco de contaminação química na cadeia alimentar e nos ecossistemas. Em busca de alternativas não químicas, o controle biológico com microrganismos antagonistas tem sido cada vez mais proposto como uma alternativa promissora e sustentável no manejo de doenças agrícolas, pois apresentam vantagens como baixa ou nenhuma toxicidade residual e impacto ambiental (UMESHA, SINGH, SINGH, 2018; YAN *et al*., 2018; LE *et al*., 2022).

O gênero *Streptomyces* (WAKSMAN, HENRICI, 1943) é considerado o de maior importância biotecnológica, pois dos 100 mil metabólitos secundários (MS) produzidos por microrganismos cerca de 35 mil são produzidos por actinobactérias, e 70% é obtido dos *Streptomyces* spp. (ARASU *et al*., 2009; BÉRDY, 2012; GOHAIN *et*

*al*., 2020; TERRA, *et al*., 2021). As bactérias desse gênero apresentam atividade biológica variada, além de serem importantes para regulação do ciclo hidrológico (RODRIGUES *et al*., 2006, PROCÓPIO *et al*., 2012; GOHAIN *et al*., 2020; TERRA, *et* al*.,* 2021; MA, KARTHIK, 2022).

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos fármacos diminuiu, logo, existe a necessidade crescente de buscar microrganismos que atuam no controle direto de fitopatógenos, na promoção de crescimento vegetal e na produção de compostos bioativos. Esse recurso natural de relevância biotecnológica tem seus resultados potencializados pela abordagem interdisciplinar das pesquisas (HARVEY, EDRADA-EBEL, QUINN, 2015; DEBENEDICTIS *et al*., 2022).

Em contrapartida, o avanço tecnológico e científico nos últimos anos, tem possibilitado o sequenciamento completo de genomas, onde as análises *in silico,* conduzidas por meio de ferramentas de bioinformática, surgem como aliadas a estudos *in vitro,* permitindo a caracterização de novos isolados em nível morfológico, fisiológico e genômico (CHANDRA, CHATER, 2014; ZHAO *et al*., 2020; KIM, 2021).

Com o acesso ao genoma completo dos *Streptomyces* spp. e por intermédio das diversas ferramentas de bioinformática tem-se descoberto novas biomoléculas pois, através das análises dos "*Biosynthetic Gene Clusters*" (BGCs), em português, Agrupamento de Genes Biossintéticos há uma caracterização mais completa dessas bactérias e de seus metabólitos secundários. Essas análises revelam todo o vasto potencial biotecnológico que os microrganismos apresentam, pois em uma única bactéria do gênero *Streptomyces* pode possuir de 20 a 50 BGCs diferentes, os quais ocupam mais de 15% do genoma desses microrganismos. (HOPWOOD, 1999; BENTLEY *et al*., 2002; BÉRDY, 2012; CHANDRA, CHATER, 2014; ZHAO *et al*., 2020; KIM, 2021; ALAM *et al.*, 2022).

Ressalta-se que mais de 90% dos BGCs não são expressos em condições laboratoriais, devido principalmente pela complexidade nutricional e as interações biológicas. Para desbloquear esses *clusters* e termos acesso a todo potencial biotecnológico do genoma bacteriano faz-se necessário o uso de técnicas, tais como, expressão heteróloga e *One Strain-Many Compounds* (OSMAC), em português, um isolado, muitos compostos (HOPWOOD, 1999; NGUYEN, 2020; KIM, 2021; ALAM *et al.*, 2022).

Portanto, a Amazônia é uma região com potencial imensurável para isolamento de novas bactérias, em especial as bactérias do gênero *Streptomyces.* Esses microrganismos sintetizam diversos metabólitos secundários de interesse biotecnológico. As principais aplicações incluem os antibióticos, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios, antitumorais, inseticidas, imunossupressores e além de produzirem enzimas de interesse industrial como celulases, amilases, lipases, xilanases (CHALLIS, HOPWOOD, 2003; FLÄRDH, BUTTNER, 2009; AMALFITANO *et al*., 2014; FERREIRA, 2017; DOHERTY *et al*., 2017; PEREIRA *et al*., 2017; ANWAR ZWAR, SOUZA, 2020; KIM, 2021; LIMA *et al*., 2021).

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de quatro isolados de *Streptomyces* obtidos de sedimentos dos rios Purus e Solimões, quanto a habilidade para biocontrole, citotoxicidade e produção de metabólitos secundários

## 2.2 Específicos

1 - Avaliar *in vitro* o potencial antagonista dos isolados de *Streptomyces* contra 13 diferentes fitopatógenos de interesse agrícola;

2 - Identificar e caracterizar as vias de biossíntese para metabólitos secundários (BGCs) com base no rascunho genoma completo dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159;

3 - Obter extratos com base na abordagem OSMAC (*One Strain-Many Compounds*) visando avaliar potencial citotóxico dos metabólitos produzidos pelas linhagens MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159.

# 3 REVISÃO DE LITERATURA

## 3.1 Fitopatógenos de interesse agrícola

Os fitopatógenos de interesse agrícola são agentes biológicos responsáveis por causar danos significativos à saúde das culturas, dependendo do grau de severidade, pode causar a morte. As doenças em cultivos são consideradas o resultado da complexa interação entre o hospedeiro, o agente causal e o ambiente, a qual acarreta prejuízos significativos à agricultura. Os organismos responsáveis pelos danos nas plantações podem ser de origem bacteriana, fúngica, nematóide, entre outros patógenos (MICHEREFF, 2001).

As doenças de plantas constituem um dos principais fatores que impactam negativamente na quantidade e qualidade da produção agrícola, pois resultam na perda que varia de 10 a 42 % das principais colheitas do mundo, e cerca de 70 a 80 % são causadas por fungos patogênicos (RISTAINO *et al*., 2021; PENG *et al.,* 2021). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), os fungos fitopatogênicos são responsáveis anualmente por US$ 220 bilhões dos custos agrícolas da economia global.

Apesar da baixa produtividade de cultivos na região Amazônica, os fitopatógenos avaliados no presente estudo apresentam grande valor para a economia regional (BENTES, BARRETO, 2004; HOMMA *et al.*, 2020). Esses fitopatógenos fúngicos apresentam ampla distribuição geográfica e importância agrícola nacional e mundial. Entre os diversos patógenos que causam danos às plantas incluem o *Colletotrichum guaranicola, Colletotrichum scovillei, Colletotrichum siamense, Colletotrichum spaethianum, Corynespora cassiicola, Fusarium decemcellulare, Moniliophthora perniciosa, Neopestalotiopsis formicarum, Rhizoctonia sp.* e *Sclerotium rolfsii.*

O *Colletotrichum guaranicola* é altamente especializado em infectar plantas do gênero *Paullinia*, causando a antracnose, que gera danos significativos nas lavouras de guaraná. Os fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* podem causar danos expressivos e irreversíveis em diversas outras culturas, tais como: soja, feijão, milho, sorgo, café, abacaxi, uva, banana, mamão e tomate (ALBUQUERQUE, 1960; BENTES, BARRETO, 2004).

O *Corynespora cassiicola* é conhecido por causar infecção que pode resultar em sintomas como manchas foliares, lesões necróticas, cloroses e desfolha prematura. As perdas significativas na produção agrícola incluem diversas culturas de importância agrícola, tais como: soja, feijão, ervilha, lentilha, batata-doce, abóbora, tabaco, algodão, amendoim, girassol (JONES, 1961; RONDON, LAWRENCE, 2021).

O gênero *Fusarium* possui características específicas de patogenicidade e preferência por hospedeiros, que varia de acordo com a espécie. No entanto, os principais sintomas das doenças incluem o superbrotamento, murchamento, necrose, descoloração e apodrecimento de raízes, caules e tecidos vegetais. Os danos podem ocorrer em uma ampla gama de culturas agrícolas, como guaraná, banana, milho, trigo, feijão, tomate, alface, batata, cenoura, pimentão, morango e algodão (SNYDER, HANSEN, 1940; QUEIROZ *et al*., 2020; NIKITIN *et al.,* 2023).

*Moniliophthora perniciosa* é um fitopatógeno que causa uma doença conhecida como vassoura-de-bruxa do cacaueiro, é considerada uma das mais devastadoras para essa cultura, em especial a espécie *Theobroma cacao*. O fungo ataca os brotos, flores e frutos, resultando em deformações nas partes afetadas, como a formação de vassouras escuras (estruturas fúngicas). Embora a ocorrência seja em menor grau, este fungo também pode causar danos às culturas de cupuaçu, murici, bacaba e buriti (PEREIRA *et al.,* 1989; SANTOS *et al*., 2023).

*Neopestalotiopsis formicarum* é um fitopatógeno que tem despertado interesse crescente entre os cientistas e agricultores devido ao seu potencial como agente causador de doenças. Os sintomas característicos são manchas foliares que lembram antracnose, lesões necróticas, murcha e queda prematura de frutos que causam danos significativos em plantas, como a goiaba, mamão, manga, abacate, graviola, caqui, café. Recentemente o *Pseudopestalotiopsis gilvanii* foi identificado no guaraná (STEYAERT, 1949; GUALBERTO *et al.*, 2021).

Os fitopatógenos do gênero *Rhizoctonia* são considerados um dos principais causadores de doenças radiculares e de colo. O principal sintoma é o estrangulamento parcial dos caules, podendo originar outros sintomas, tais como: atraso no desenvolvimento da planta, pigmentações púrpuras nas folhas, deformação e descoloração dos caules, necrose do tecido vascular, tombamento e até morte da plântula. Este fungo é altamente versátil e possui um amplo espectro de hospedeiros,

afetando uma variedade de culturas agrícolas, como a alface, milho, arroz, trigo, batata, feijão, soja, algodão, cana-de-açúcar entre outras (AKBER *et al*., 2023).

O *Sclerotium rolfsii* é um fitopatógeno conhecido também como "mofo branco" ou "podridão de *Sclerotium*". Este fungo é um dos mais destrutivos em diversas culturas agrícolas. Os sintomas típicos incluem o aparecimento de lesões necróticas no caule, raízes e colo da planta, além da formação de estruturas de resistência chamadas escleródios, que são densos e duros e podem persistir no solo por longos períodos. Por ser amplamente distribuído em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo, pode causar danos em diversas culturas, como a soja, feijão, arroz, amendoim, milho, batata-doce, tomate, algodão, alface, alho, cebola, couve, ervilha (PUNJA, 1985; O'SULLIVAN, BELT, THATCHER, 2021).

Os defensivos agrícolas ainda contribuem no controle dos fitopatógenos na agricultura atual, porém são de natureza tóxica e representam riscos agudos para a saúde humana e para o meio ambiente (BERNARDES *et al.*, 2015; TUDI *et al.*, 2021). Nesse sentido, pesquisas que visem o controle eficiente das doenças causadas pelos fitopatógenos e com menor ou nenhum impacto ambiental são essenciais e urgentes na agricultura, tal como o biocontrole por agentes biológicos antagonistas (LATA *et al.,* 2021; GIEHL *et al*., 2023; PRIYASHANTHA *et al.,* 2023).

Na agronomia, os bioprodutos que agem no controle de fungos patogênicos são conhecidos como biopesticidas ou biofungicidas e são alternativas sustentáveis aos defensivos químicos. Os produtos obtidos de bactérias do gênero *Streptomyces* têm sido utilizados como agentes biológicos para o controle de fitopatógenos em plantações, incluem o Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* K61) usado para o controle de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. entre outros. Actinovate® SP (*Streptomyces lydicus* WYEC 108) usado para o controle de *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. e outros (Embrapa, 2012; KAMARA, GANGWAR, 2015).

A carência de produtos obtidos a partir de *Streptomyces* spp. ressalta importância de pesquisas científicas voltadas para descobrir o potencial biotecnológico desses microrganismos. Os *Streptomyces* spp. possuem um arsenal metabólico que pode garantir a proteção e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, buscando mitigar os impactos negativos causados pelos fitopatógenos e garantir uma produção agrícola saudável e sustentável no Brasil e no mundo.

## 3.2 Gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* foi inicialmente descrito por Waksman e Henrici em 1943, são bactérias Gram-positivas, filamentosas, formadoras de esporos e aeróbias (WAKSMAN, HENRICI, 1943; WILLIAMS *et al*., 1983; FLÄRDH, BUTTNER, 2009). Eles, são mesófilos, com temperatura ótima de crescimento variando 25 ºC a 35 ºC (WILLIAMS *et al*., 1983; GOHAIN *et al*., 2020), embora existam organismos que suportam temperaturas extremas (NÚÑEZ-MONTERO, 2019; ARIFIYANTO *et al*. 2021). O potencial hidrogeniônico (pH) dos *Streptomyces* spp. varia de 6 até 9, e o crescimento das colônias é lento, quando comparado a *Bacillus* (WILLIAMS *et al.,* 1983; GOHAIN *et al*., 2020; MA, KARTHIK *et al*., 2022).

O genoma dos *Streptomyces* spp. é composto por um único cromossomo linear, com uma média de tamanho de aproximadamente 8 Mb. No entanto, existem relatos na literatura de genomas com tamanhos variando de 6.8 Mb a 11.9 Mb. Seu DNA é caracterizado por apresentar um alto conteúdo de guanina e citosina (G+C), com uma média de 70%, porém pode variar de 69% a 78%. Essa característica distingue-os de outras bactérias, como *Staphylococcus* e *Bacillus*, que possuem um conteúdo G+C em torno de 50% (WILLIAMS *et al*., 1983; HOPWOOD, 2006; FLÄRDH, BUTTNER, 2009; CHANDRA, WANG, *et al.*, 2013; CHATER, 2014; ZABURANNUI, *et al*., 2014).

Essas características fisiológicas e genéticas são fundamentais para a compreensão e exploração desse importante grupo de microrganismos, que desempenham papéis cruciais na produção de compostos bioativos e na biotecnologia.

## 3.3 Importância biotecnológica de *Streptomyces* spp.

Atualmente a resistência antimicrobiana é uma das maiores preocupações e ameaça à saúde pública mundial, devido ao uso indiscriminado de grandes quantidades de antibióticos para controlar infecções, seja em humanos, animais, ou plantas, criando condições sem precedentes para a mobilização de elementos resistentes em populações microbianas. Tal fato, tem contribuído para o aumento da morbidade e mortalidade, associados a microrganismos multirresistentes (BROWN,

WRIGHT, 2016; MANTECA, YAGÜE, 2019; SIVALINGAM *et al*., 2019; HUTCHINGS, TRUMAN, WILKINSON, 2019). Além da resistência antimicrobiana, o câncer também é uma das preocupações mundiais, pois trata-se de uma das doenças mais complexa da atualidade, que exige novos medicamentos sem ou com o mínimo de efeito colateral, e para isso, é necessário novos medicamentos ou medicamentos mais eficientes para o tratamento dessa doença (SIVALINGAM *et al*., 2019).

A descoberta da penicilina em 1928 foi o marco da era de ouro dos antibióticos, perpetuando até meados da década de 1950 (MANTECA, YAGÜE, 2019). Após a década de 50 houve um declínio gradual na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. Enquanto isso, nas últimas décadas, novos fungos patogênicos multirresistentes estão causando grande preocupação, como é o caso da *Candida auris*, resistente a fluconazol, equinocandinas e até mesmo à anfotericina B. (HUTCHINGS, TRUMAN, WILKINSON, 2019). De acordo com Newman e Cragg (2020), apesar do alto potencial de produção de bioativos por microrganismos, desde 2006 não há relatos de novos compostos antifúngicos relacionados a produtos naturais industrialmente comercializados.

*Streptomyces* é o gênero mais versátil para aplicações biotecnológicas amplamente utilizado como plataforma na produção de novos antibióticos (SALWAN, SHARMA, 2020; BARBUTO-FERRAIUOLO *et al*., 2021). Este grupo produz compostos bioativos importantes com propriedades antibacterianas, antifúngicas, anticâncer, antioxidantes, anti-helmíntico, antimalárico, anti-inflamatório e imunossupressores (BÉRDY, 2005; SHARMA *et al*., 2020; SALWAN, SHARMA, 2020; NAH *et al*., 2021). Estes compostos possuem papéis importantes nos mais diversos setores, como na agricultura, medicina, indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, com muitos benéficos e valor bioeconômico (SHARMA *et al.*, 2020; EBRAHIMI-ZARANDI, 2021; KHUSHBOO *et al.*, 2022).

A produção dos metabólitos secundários nesses microrganismos acontece durante a fase vegetativa, ocasionado em resposta à perda de nutrientes ou sinais ambientais de estresse (PROCÓPIO *et al*., 2012; CHATER, 2016; BARKA *et al.,* 2015). Além disso, essas bactérias, podem também realizar reações de bioconversão enzimáticas específicas que são interessantes como drogas, como no caso de esteroides. O uso do potencial biotecnológico de *Streptomyces* spp. pode variar de acordo com as diferentes fases de crescimento em relação às aplicações pretendida

ou aos tipos de moléculas que devem ser produzidas. Isto porque, durante o início do crescimento vegetativo, as células produzem enzimas e vitaminas que podem também serem interessantes para fins comerciais e utilizadas em indústrias farmacêuticas, cosméticas, têxtil e alimentícias, como as amilases, celulases e proteases (BARKA *et al*., 2015; HARIR *et al.,* 2018; BARBUTO-FERRAIUOLO *et al*., 2021).

A estreptomicina foi o primeiro antibiótico isolado de *Streptomyces*, essencial para o tratamento de tuberculose. Atualmente, mais de 70% dos compostos biologicamente ativos são sintetizados por bactérias do gênero *Streptomyces*. Destes compostos, destacam-se os aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina), os glicopeptídeos (vancomicina), as antraciclinas (doxorrubicina), os macrolídeos (eritromicina, azitromicina), os β-lactâmicos (cefamicina), os polienos (nistatina) e as tetraciclinas (terramicina) (RAJIVGANDHI *et al*., 2018; KHUSHBOO *et al.*, 2022; KURNIJASANTI, SUDJARWO, 2022).

Esses antibióticos são compostos químicos que inibem o crescimento bacteriano sem prejudicar os organismos eucarióticos, podendo agir diretamente nas estruturas funcionais dos microrganismos patogênicos. Os principais mecanismos de ação envolvem a biossíntese da parede celular, replicação de DNA e síntese proteica (LO-GRASSO, CHILLURA-MARTINO, ALDUINA, 2016).

Podemos destacar ainda a produção de compostos antitumorais, tais como, antraciclinas, salinomicina, antramicina, arenimicina (HARIR *et al.* 2018). Vale ressaltar que a busca por novos compostos é contínua. Nesse sentido, Son *et al*. (2018), conseguiu através de análises de mineração genômica elucidar um novo peptídeo, denominados *Ulleungdin*, isolado de *Streptomyces*, onde esse composto apresentou atividades inibitórias significativas contra a invasão e migração de células cancerígenas, reforçando o potencial de espécies desse gênero para produção de um novo composto bioativo com efeito antitumoral.

Cada vez mais novos ambientes estão sendo explorados, assim novos microrganismos e novas biomoléculas estão sendo descobertas, como os desertos, que que abrigam uma diversidade de actinobactérias, incluindo os *Streptomyces* spp. (SIVALINGAM *et al*., 2019; ABDELMOTELEB, GONZÁLEZ-MENDOZA, 2020; XIE, PATHOM-AREE, 2021). Assim como, os ambientes frios que resultam na expressão de novos metabólitos por conta das condições climáticas extremas (ZHANG *et al*., 2016; KAMJAM *et al.*, 2018; SIVALINGAM *et al*., 2019).

Além de ambientes inóspitos, estudos realizados por Wang *et al.* (2020), demonstraram que nos últimos 40 anos, a principal fonte de exploração de metabólitos secundários de actinobactérias foi de ambientes marinhos, oriundos de sedimentos, esponjas, animais, mangue, algas, plantas marítimas.

Na agricultura, o aumento da utilização de produtos químicos tomou proporções assustadoras e o uso indevido desses produtos vem causando diversos problemas a população e ao meio ambiente, como por exemplo, o desenvolvimento de fitopatógenos resistentes, exigindo desta forma, o desenvolvimento de alternativas eficientes e seguras (SADEGHIAN, BONJAR, SIRCHI, 2016).

Nesse contexto, os *Streptomyces* spp. são foco de muitas pesquisas na atualidade, pois são capazes de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários bioativos. Essas bactérias, compõem uma fração notável da biomassa microbiana do solo, e desempenham papel fundamental para o equilíbrio ecológico. Eles ainda apresentam relação simbiótica com as plantas, sendo capazes de proteger contra pragas, doenças em plantas, e induzir mecanismos de defesa. Além dessas funções, também podem degradar polímeros complexos de vegetais e animais, resultando em sínteses de enzimas extracelulares como lignase, protease, lipase, celulase, xilanase, quitinase, pectinase, queratinase, amilase (BHATTI *et al*., 2017; VAN-DER-MEIJ *et al*., 2017; OLANREWAJU, OLUBUKOLA, 2019; JING *et al*., 2020; EBRAHIMI-ZARANDI *et al*., 2021; PACIOS-MICHELENA *et al.,* 2021). Logo, os isolados de *Streptomyces* são fortes candidatos ao biocontrole de microrganismos fitopatogênicos.

O *Streptomyces neotropsis*, isolado de solo desértico, tem potencial para ser empregado como bioproduto agrícola, pois estudos demonstram o potencial para promoção de crescimento em plantas, assim como a inibição dos fitopatógenos: *Macrophomina phaseolina, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Fusarium equiseti, Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum gloeosporioides*, através de ensaios *in vitro* (ABDELMOTELEB, GONZÁLEZ-MENDOZA, 2020).

O *Streptomyces griseocarneus*, isolado de raízes e sementes de Guaraná (*Paulinia cupana* K.)*,* conseguiu controlar o desenvolvimento de antracnose em frutos de *Capsicum annuum,* e promoveu crescimento da planta (LIOTTI *et al.*, 2018). Zhou *et al.* (2022), realizou uma triagem antifúngica com o *Streptomyces* sp. HSL-9B contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides,* agente causal de doenças em diversas

culturas agrícolas e em frutos pós-colheita, no qual o isolado indicou (63,21%) potencial contra o fitopatógeno testado. Sadeghian Bonjar, Sirchi (2016), corroboram que o *Colletotrichum gloeosporioides* é um dos principais agentes causais de antracnose em diversas plantas e frutos, e estudos preliminares com *Streptomyces* sp. para produção de biocontrole, mostraram atividade antagonista contra o referido fitopatógeno, diminuindo os sintomas de podridão amarga em maçãs.

Outro potencial dos *Streptomyces* spp. aplicado à agricultura são os herbicidas, visto que há uma necessidade de novos modelos de perfis toxicológicos e ambientais mais seguros para manejar a evolução de plantas daninhas resistentes aos herbicidas comerciais (MYRONOVSKYI *et al.*, 2020). De acordo com Bo *et al.* (2019) compostos herbicidas bioativos produzidos por microrganismos do solo podem ser usados para criar um bioherbicida e diminuir o crescimento de plantas daninhas. Albucidina é um exemplo de bioherbicida isolado de *Streptomyces albus* subsp. *chlorinus* fundamental para uma agricultura sustentável (HAHN *et al.,* 2009).

Atualmente, diversas biomoléculas já foram obtidas de isolados de *Streptomyces*, porém, acredita-se que menos de 30% dos compostos produzidos por estas bactérias são elucidados (HARIR *et al.,* 2018; KURNIJASANTI, SUDJARWO, 2022). Isso ocorre porque há muitas vias de metabólitos secundários que em condições de laboratório estão silenciados ou não são expressos, neste caso conhecidos como crípticos (MANTECA, YAGÜE, 2019; ALAM *et al.*, 2022).

Portanto, a combinação do sequenciamento e da mineração do genoma completo representa uma abordagem revolucionária nas pesquisas de novas biomoléculas ou biomoléculas com melhor potencial biotecnológico. Logo, o presente estudo surge como uma alternativa promissora para impulsionar a bioeconomia através dos compostos bioativos inovadores, com potencial terapêutico e aplicação prática em diversas áreas da agricultura e saúde.

### 3.4 Mineração genômica e abordagem OSMAC no gênero *Streptomyces*

Os metabólitos secundários são produzidos por uma lógica biossintética, na qual as enzimas que fazem parte desse processo estão codificadas em genes espacialmente próximos nos genomas, denominados em inglês de *Biosynthetic Gene Clusters* (BGCs) (CIMERMANCIC *et al*., 2014).

Os BGCs contêm genes principais que codificam as enzimas que atuarão na formação do esqueleto principal da molécula como as policetídeos sintases (PKS), sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS) e sintases de peptídeos ribossomalmente sintetizados e modificados pós-tradução (RiPPs), entre outras enzimas relacionadas a diferentes classes de moléculas. Os BGCs ainda podem conter genes relacionados a transporte e fatores de transcrição, bem como genes adicionais, os quais codificam enzimas que atuam na incorporação de grupos funcionais no esqueleto principal da molécula, tais como: metiltransferases, redutases, halogenases e mono-oxigenases (WEBER *et al*., 2015; ZIEMERT, ALANJARY, WEBER, 2016; LEE *et al*., 2020).

Em *Streptomyces* spp. o estabelecimento de estudos genéticos para entender a lógica biossintética da produção de moléculas bioativas começaram em 1976 com a descoberta de um plasmídeo (pSV1) que é responsável pela biossíntese de metilenomicina A e resistência a esse antibiótico em *Streptomyces coelicolor* A3, usando técnicas clássicas de transferência por conjugação de plasmídeos em culturas mistas (WRIGHT, HOPWOOD, 1976). Posteriormente, a biossíntese de metilenomicina A foi relacionada a dois grandes transcritos (6,6 kb e 9,5 kb) além de um fragmento *upstream* na qual estava envolvido com a regulação negativa de metilenomicina A por meio de clonagem mutacional (SENO, CHATER *et al*., 1983).

Entrando, no novo milênio, o genoma completo de *S. coelicolor* A3 foi obtido por meio de sequenciamento de bibliotecas de cosmídeos, sendo este o primeiro genoma obtido para o gênero. O sequenciamento do genoma completo de *S. coelicolor* A3 permitiu a identificação de 20 *clusters* de genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários e revelou o potencial escondido dos isolados de *Streptomyces*, além de proporcionar a descoberta de novos fármacos por engenharia genética (BENTLEY *et al*., 2002). Ademais, estudos complementares têm sido realizados para analisar os genomas desse microrganismo (FADDETTA *et al.,* 2022; DULERMO *et al*., 2023; KRONHEIM e*t al.,* 2023).

Com o advento e consolidação do sequenciamento de nova geração (NGS), a possibilidade de se explorar genomas completos com custo mais reduzido, levou a busca guiada por novos produtos naturais para uma nova era, ao passo em que a bioinformática voltada a genômica fornece ferramentas poderosas para análises de genes relacionados ao metabolismo secundário (HU *et al*., 2021).

Atualmente, a descoberta de novas moléculas bioativas e diversos outros produtos naturais é guiada por análises genômicas combinadas com as técnicas clássicas de fermentação, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN), também chamada de metabologenômica (EISENHOFER *et al*., 2017; QI *et al.*, 2021). Sendo assim, com a obtenção de genomas completos, impulsionado pelo NGS, permite o acesso à essa biodiversidade genética e consequentemente a uma variedade de BGCs, os quais estão disponíveis para serem descobertos. Com base no *Genbank*, consultado em julho de 2023, há 652 genomas sequenciados disponíveis para o gênero *Streptomyces* (disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov /genome/?term=streptomyces>).

A disponibilidade de genomas completos ou rascunhos de genomas tem permitido a análise *in silico* do potencial para produção de produtos naturais por meio de plataformas como a *antiSMASH.* Essa ferramenta realiza a identificação e análise de *clusters* gênicos biossintéticos, por intermédio do repositório *Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster* (MIBiG) que traz informações mínimas sobre os BGCs. Essa ferramenta de bioinformática faz parte da revolução da era genômica na busca por produtos naturais em microrganismos (MEDEMA *et al*., 2011; EPSTEIN *et al*., 2018; KAUTSAR *et al*., 2020; BLIN *et al*., 2021).

Os dados relacionados a BGCs identificados e caracterizados por pesquisadores de todo o mundo são depositados no MIBiG e esse conjunto de informações permite o avanço do conhecimento sobre a lógica biossintética pela qual os metabólitos secundários são produzidos. Isso permitiu o desenvolvimento de diversas abordagens, entre elas a mineração genômica direta e reversa (LEE *et al*., 2020).

A mineração genômica direta nada mais é do que a predição da estrutura de um determinado metabólito partindo da análise dos genes que compõem o BGC e geralmente é usada para guiar a busca. Essa abordagem de mineração genômica levou ao desenvolvimento dos produtos naturais sintéticos baseado em bioinformática também chamados de *Synthetic Bioinformatic Natural Products* (syn-BNPs) e a descoberta de novos antibióticos bioativos contra linhagens multirresistentes de patógenos humanos baseados apenas na predição estrutural de moléculas via identificação dos genes de biossíntese e análises de bioinformática (CHU *et al.,* 2020; LEE *et al*., 2020; LI, 2023). Essa abordagem é considerada promissora, tendo em

vista, a independência de técnicas de isolamento, manutenção e fermentação para descoberta e produção de moléculas. E tem sido aplicada com sucesso em dados metagenômicos (LI, 2023; SMITH, 2023).

A mineração genômica reversa é a abordagem que a partir do metabólito secundário é possível identificar os genes responsáveis pela sua biossíntese (DUNCAN *et al*., 2015; LEE *et al*., 2020). A abordagem reversa permite a identificação de BGCs ativos em determinadas condições de laboratório, no entanto, é de conhecimento que muitos dos BGCs se encontram silenciados ou são crípticos (LUO *et al.,* 2013; REEN *et al*., 2015; SAHA *et al*., 2017; NGUYEN *et al*., 2020; LEE *et al*., 2020; UNNO *et al*., 2020). A caracterização de BGCs via mineração genômica reversa fornece aos bancos de dados informações necessárias para o melhoramento da mineração genômica direta (LI, 2023; SMITH, 2023).

Em *Streptomyces* spp. a mineração genômica vem guiando a descoberta de novos produtos naturais bioativos, como em *Streptomyces olivaceus* SCSIO T05 com a identificação de novos compostos chamadas de olimicinas A e B (SUN *et al.,* 2018). Paralelamente, em *Streptomyces atratus* SCSIO ZH16 foi descoberta a atratumicina que é ativa contra *Mycobacterium tuberculosis* (SUN *et al.,* 2019), e em *Streptomyces* sp. SCSIO 40010 isolado de ambientes marinhos foi descoberto de novos tetramatos macrolactâmicos citotóxicos contra linhagens de células cancerígenas (LIU *et al*., 2019).

Esses exemplos demonstram que apesar dos produtos naturais de isolados de *Streptomyces* serem estudados a muitos anos, o desenvolvimento de técnicas ômicas permite explorar seu incrível arsenal metabólico e mostrar também que o gênero ainda é um grande reservatório de novos produtos naturais bioativos a serem investigado.

Uma das estratégias que tem sido empregada para o desbloqueio de BGCs crípticos e/ou silenciados identificados via mineração de genoma é a expressão em hospedeiros heterólogos (MYRONOVSKYI *et al.,* 2019). A escolha do hospedeiro é um fator chave para o sucesso da expressão, esse hospedeiro deve corresponder ao uso de códons e a produção de precursores para a biossíntese. Em *Streptomyces* spp. a expressão heteróloga de BGCs tem sido realizada principalmente nos hospedeiros *S. coelicolor, S. lividans*, e *S. albus*, no entanto, o BGC expresso nesses hospedeiros pode ainda ter seus produtos alterados pela composição de genes adicionais contidos nos BGC do hospedeiro (KANG *et al.,* 2021). Para minimizar esse

problema a linhagem mutante de *S. albus* livre de BGCs foi desenvolvida para melhorar a detecção do produto do BGC heterólogo (MYRONOVSKYI *et al*., 2018).

A expressão heteróloga de um *cluster* críptico de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 levou à descoberta de uma nova família de lassopeptídeos denominadas leupeptina (GOMEZ-ESCRIBANO *et al.,* 2019), em *Streptomyces prunicolor* o desbloqueio levou a descoberta de um novo peptídeo bicíclico denominado prunipeptina (UNNO *et al.,* 2021). Diversos estudos mostram que a combinação dessas técnicas é eficaz para a descoberta de novos compostos em espécies de *Streptomyces* (QUIAN *et al*., 2019; LASCH *et al*., 2020; LIU *et al*., 2021; CHEN *et al*., 2022).

Outra estratégia de desbloqueio de BGCs silenciados ou crípticos, que a priori é independente de ferramentas de biologia molecular, é a abordagem denominada *One Strain-Many Compounds* (OSMAC), também tem sido muito empregada para o desbloqueio de produtos naturais em *Streptomyces* spp. (NGUYEN *et al.,* 2020). Esta metodologia baseia-se na utilização de diferentes condições durante o cultivo do microrganismo, como temperatura, pH, mudanças nas fontes de carbono e/ou nitrogênio, uso de xenobióticos e co-cultivo (WEI *et al.,* 2010; ROMANO *et al.,* 2018; PAN *et al.,* 2019).

A estratégia OSMAC foi utilizada para *Streptomyces* sp. RKND004 por meio do uso de diferentes meios de cultivo e possibilitou a descoberta de novas moléculas com potencial antibiótico e citotóxico contra linhagens de células cancerígenas, denominadas de terrosamycina A e B (SPROULE *et al.,* 2019). Já o cultivo de *Streptomyces peucetius* em diferentes temperaturas revelou a produção de um novo composto induzido sob temperatura de 18°C, denominada *peucemycina*, na qual exibe alta citotoxicidade em diferentes linhagens de células cancerígenas (PHAM, *et al.,* 2021). Em uma pesquisa realizada por Wu *et al.* (2018), com um isolado de *Streptomyces*, o cultivo em diferentes meios de cultivo levou a produção de *inthomycina* B, um poderoso herbicida e antimicrobiano. Esses exemplos demonstram que a abordagem OSMAC pode ser uma alternativa para produção de novos metabólitos e/ou metabólitos bioativos já conhecidos.

Nesse contexto, a prospecção de genomas de *Streptomyces* spp. isolados de ambientes inexplorados, como os sedimentos dos rios amazônicos pode representar recursos genéticos para produção de novos compostos ou moléculas com ampla

aplicação biotecnológica. A utilização de técnicas recentes para prospecção dessas moléculas como a mineração de genoma pode auxiliar no desenvolvimento futuro de novos produtos e processos ambientalmente sustentáveis.

# 4 METODOLOGIA

## 4.1 Microrganismos

Nesse estudo, foi avaliado o potencial biotecnológico de quatro isolados de *Streptomyces*, sendo três oriundos de sedimentos do rio Purus e um do rio Solimões (Tabela 1). Esses isolados foram previamente selecionados pelo grupo de pesquisa da Embrapa Amazônia Ocidental com base na habilidade de redução do crescimento *in vitro* de pelo menos um patógeno de interesse agrícola.

Também foram utilizados neste trabalho, 13 fungos fitopatógenos isolados de plantas de interesse agrícola (Tabela 2) visando confirmar e ampliar o número de patógenos que podem ser utilizados no processo de desenvolvimento de soluções para o controle biológico a partir das quatro linhagens de *Streptomyces.*

**Tabela 1 -** *Streptomyces* spp. isolados de rios do Amazonas

| N° | Código da Coleção | Identificação | Origem | Local |
|---|---|---|---|---|
| 1 | MPUR-28.3 | *Streptomyces* sp. | Sedimentos | Rio Purus |
| 2 | MPUR-31.3 | *Streptomyces* sp. | Sedimentos | Rio Purus |
| 3 | MPUR-51.7 | *Streptomyces* sp. | Sedimentos | Rio Purus |
| 4 | SOL-159 | *Streptomyces* sp. | Sedimentos | Rio Solimões |

Fonte: O autor (2023).
Nota: Os isolados de *Streptomyces* mencionados na tabela foram coletados através da parceria da Embrapa Amazônia Ocidental com o Instituto de Pesos e Medidas do Amazonas (Ipem/AM), órgão delegado do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

**Tabela 2 -** Fitopatógenos isolados de hospedeiros de interesse agrícola

| N° | Código da Coleção | Fitopatógeno | Hospedeiro |
|---|---|---|---|
| 1 | INPA 2939 | *Colletotrichum guaranicola* | Guaranazeiro (folha) |
| 2 | INPA 2910 | *Colletotrichum scovillei* | Pimenta de cheiro (fruto) |
| 3 | Coll 2N | *Colletotrichum siamense* | Botão-de-ouro (folha) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 4 | INPA 2973 | *Colletotrichum sp.* | Mamão (fruto) |
| 5 | INPA 2908 | *Colletotrichum spaethianum* | Cebolinha |
| 6 | INPA 2671 | *Corynespora cassicola* | Tomate (folha) |
| 7 | CPAA Fdc307 | *Fusarium decemcellulare* | Guaranazeiro (folha) |
| 8 | CPAA MCT 10621 | *Fusarium sp.* | Tomate (fruto) |
| 9 | CPAA Mp01 | *Moniliophthora perniciosa* | Cupuaçu (fruto) |
| 10 | CPAA 609 | *Neopestalotiopsis formicarum* | Guaranazeiro (folhas) |
| 11 | INPA 2943 | *Rhizoctonia sp.* | Alface |
| 12 | INPA 2942 | *Rhizoctonia sp.* | Feijão (raiz) |
| 13 | INPA 2941 | *Sclerotium rolfsii* | Tomate (folha) |

Fonte: O autor (2023).
Nota: INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. CPAA - Embrapa Amazônia Ocidental.

### 4.1.1 Reativação e manutenção das amostras

A cultura estoque dos isolados de *Streptomyces* preservados sob congelamento a -80º C, em caldo de cultura ISP2 + glicerol a 20% (v/v) foram reativados a partir da adição de 100 µL do estoque preservado em 25 mL de caldo de cultura ISP2 em tubos Falcon de 50 mL, incubados por 5 dias, a 28º C, e a 150 rpm.

Os isolados bacterianos reativados foram cultivados em triplicata em placas de Petri por técnica de estrias de esgotamento em meio de cultura ISP2 (Tabela 3) e incubadas por 7 dias em estufa bacteriológica a 28º C.

Os fitopatógenos foram reativados pela inoculação de *plugs* de micélios preservados a -80º C em meio BDA enriquecido (Tabela 3). Em seguida, as placas foram incubadas por 7 dias em estufa bacteriológica a 25º C. Repiques periódicos foram realizados para garantir a manutenção de todos os isolados usados no presente estudo.

**Tabela 3 -** Composição dos meios de cultura

| Meio de Cultura | Composição |
|---|---|
| ISP2 | 4 g extrato de levedura, 10 g extrato de malte, 4 g dextrose, 20 g ágar, 1000 mL de água destilada, pH 7,2 |
| ISP2* | 4 g extrato de levedura, 10 g extrato de malte, 4 g dextrose, 1000 mL de água destilada, pH 7,2 |
| BDA (enriquecido) | 300 g batata, 10 g dextrose, 2 g extrato de levedura, 2 g peptona, 1,5 g caseína, 16 g ágar, 1000 mL de água destilada |
| BD* (enriquecido) | 300 g batata, 10 g dextrose, 2 g extrato de levedura, 2 g peptona, 1,5 g caseína, 1000 mL de água destilada, pH para 7,2 |
| Simplificado A* | 20 g de amido solúvel, 5 g extrato de levedura, 5g peptona, 10 g glicose, 1000 mL de água destilada, pH 7,2 |
| GYM* | 4 g extrato de levedura, 10 g extrato de malte, 4 dextrose, 1000 mL de água destilada, pH 7,2 |
| YM* | 2,7 g extrato de levedura, 7,2 g extrato de malte, 9 g peptona, 20 g de sacarose, pH 7,2 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: O asterisco (*) representa caldo de cultura. International *Streptomyces* Project Medium 2 (ISP2). Batata Dextrose Ágar (BDA). Batata Dextrose (BD). Glucose Yeast Maltose (GYM). Yeast Maltose (YM).

## 4.2 Análise morfológica e filogenômica das linhagens de *Streptomyces*

### 4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A forma, o arranjo, a presença de esporos e de flagelos dos isolados bacterianos foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura, no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio), na Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (ESA-UEA) conforme o protocolo estabelecido (SOUZA, 2007).

Para análises por microscopia eletrônica de varredura, os isolados de *Streptomyces* foram cultivados em meio de cultura ISP2, por 7 dias a 28º C e deste

cultivo foram retirados fragmentos de 0,5 cm² e transferidos para uma placa de 24 poços. Em seguida, foi realizada a fixação por meio da submersão das amostras em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7.2) por 24 horas, em temperatura ambiente.

Após esses processos, iniciou-se a lavagem, onde foram feitas 4 lavagens sucessivas em tampão fosfato de potássio (0,05 M pH 7.2), por 10 min cada. Logo após, ocorreu a pós-fixação, onde as amostras foram submersas por 2 h em solução de tetróxido de ósmio 1 % em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,3, ao abrigo da luz, coberto com folha de alumínio. Sendo necessário a lavagem pós-fixação, onde o excesso de ósmio foi lavado três vezes com o tampão fosfato de potássio 0,05 M.

A desidratação das amostras foi com soluções de etanol a 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % e 100 %, mantendo-as submersas em cada uma das soluções por 20 min (este processo será repetido três vezes na etapa do etanol 100 %). Logo após, foi realizada a secagem em ponto crítico por 1 h 30 min (Leica EM CPD300).

Após todos esses processos, foi realizada a metalização, onde as amostras foram fixadas em fitas de carbono à tubos e submetidas a 4 min de metalização com ouro, no metalizador JEOL Smart Coater.

As análises e as microfotografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-IT500HR).

### 4.2.2 Obtenção de rascunho e montagem do genoma

Os isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 foram cultivados em caldo ISP2 por 5 dias a 28 ºC, 150 rpm. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação e o DNA genômico (gDNA) foi extraído utilizando o kit *DNeasy® blood and tissue* (*Qiagen*, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o gDNA foi analisado em gel de agarose 1 % e quantificado no *Qubit® 2.0 fluorometer* (*Life Technologies*).

O gDNA dos quatros isolados foi sequenciado através plataforma *Illumina – HiSeqX* – PE 150 *cycle*, com *read length* (comprimento de leitura) de 2 x 150 (*Paired End*), e com cobertura estimada de 100x.

A montagem do genoma dos quatros isolados foi gerada pela combinação de dados de sequenciamento de *Illumina – HiSeqX* usando o fluxo de trabalho *SPAdes*,

seguido de curadoria manual por meio do mapeamento das leituras Illumina nos *contigs* originados.

### 4.2.3 Análise filogenômica das linhagens

A identificação dos isolados foi realizada por filogenômica utilizando a plataforma *Type Strain Genome Server* (TYGS), disponível em: <https://tygs.dsmz.de/>, no dia 07 de março de 2023.

A análise no TYGS permitiu a identificação dos quatro isolados de *Streptomyces* com base no cálculo de dDDH (digital *DNA-DNA hybridization*), em relação às subespécies e espécies tipos. Para tanto, os genomas são comparados contra todos os genomas de linhagens tipo disponíveis no banco de dados TYGS, por meio do algoritmo *MASH*, sendo essas distâncias usadas para determinar os 10 genomas de linhagem tipo mais próximo para cada um dos genomas dos isolados (MEIER-KOLTHOFF, GÖKER, 2019; MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2022).

Foram realizadas análises complementares para corroborar com a identificação das linhagens e predição de novas espécies, também foi realizado o cálculo do *Genome-to-Genome Distance Calculator* (GGDC) 3.0, uma plataforma de análise baseada na *web*, disponível em: <ggdc.dsmz.de>. Esse algoritmo permite o cálculo do dDDH com base na Fórmula 2 (dDDH d2) do GGDC que é mensurado independente do comprimento do genoma, o cálculo é baseado na divisão das identidades encontradas em segmentos e não pelo comprimento da sequência inteira (MEIER-KOLTHOFF, GÖKER, 2019; MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2022).

O *score* gerado pelo GGDC com base no cálculo da distância intergenômica entre dois organismos para determinar a relação entre as espécies utilizando a metodologia baseada no programa *Genome Blast Distance Phylogeny* (GBDP) (HENZ *et al*., 2005). Com este resultado calcula-se um *escore* que é convertido no valor esperado, caso fosse realizado em bancada de laboratório o DDH entre as duas espécies analisadas, onde o valor final será o DDH digital (dDDH) entre ambos os organismos, com o *threshold* (limite de corte) para espécie igual ao DDH, de 70 % e quanto a subespécie este limiar é de 79 %, além disso, fornece diferenças no conteúdo de G-C%. (MEIER-KOLTHOFF *et al.,* 2013).

O *escore* calculado pelo GGDC, usado para delimitação de espécie através da determinação da distância entre os dois genomas, apresenta um limite para valores

iguais ou inferiores a 0,044~0,045 e pode variar entre 0 para mais similar, e 1 para mais distante (AUCH *et al*., 2010).

O TYGS também utilizou o valor de δ (delta), uma matriz estatística para inferir a distância filogenética. O cálculo do valor de δ no serviço de construção de árvores envolve a inferência de filogenias do GBDP para genomas e para o gene 16S rRNA através da ferramenta *FastME 2.1.4.* Valores de δ altos tornam os dados menos semelhantes, logo, essas sequências genômicas são removidas do conjunto de dados (HOLLAND *et al*., 2002; MEIER-KOLTHOFF, GÖKER, 2019).

A análise do comprimento das subunidades menores do RNA ribossômico (SSUrRNA) foi realizada pela ferramenta *rDNA extractor*, que extraiu a sequência 16S rRNA do genoma dos isolados bacterianos de interesse através do programa *RNAmmer*. Em seguida, a ferramenta *Pairwise SSU BLASter* realizou o alinhamento da sequência 16S rRNA dos isolados com sequências do banco de dados através da corrida do *NCBI BLAST+*. Automaticamente, os genomas que produzem os *hits* do *BLAST* com os 50 *bitscores* mais altos do BLAST são selecionadas para o cálculo da distância do GBDP. A ferramenta *SSU distance calculator* fez a análise da distância GBDP entre as sequências selecionadas. Neste processo, o GBDP utilizou a fórmula d5 para seleção das espécies tipo com as menores distâncias entre a sequência do genoma de interesse e os genomas do banco de dados. A árvore filogenômica obtida no TYGS baseou-se no cálculo do GBDP inferido pelos algoritmos da plataforma. Os resultados foram replicados 100 vezes por meio do *pseudo-bootstrap*, fornecendo um intervalo de confiança para os resultados de dDDH (MEIER-KOLTHOFF *et al*., 2013; MEIER-KOLTHOFF, GÖKER, 2019).

Concomitantemente, foram realizadas análises complementares de genômica comparativa por meio de diferentes *Overall genome relatedness index* (OGRI), em para corroborar e validar os resultados das metodologias anteriores. Essas análises incluíram o cálculo de AAI (*average aminoacid identity*), OrthoANI (*orthologous average nucleotide identity*), ANI (*average nucleotide identity*), e *BLAST ANI* (ANIb), *MUMmer ANI* (ANIm). Todas as métricas são internacionalmente validadas em estudos filogenéticos e de taxonomia microbiana para avaliar a relação genética entre diferentes microrganismos.

O cálculo do *Average Nucleotide Identity* (ANI) foi realizado através da plataforma de análise baseada na *web,* disponível em: <https://www.ezbiocloud.net/to

ols/ani>. Utilizou-se os parâmetros padrões e o *pipeline* da plataforma que permite comparar a similaridade genética entre duas sequências de DNA. As sequências genômicas são alinhadas uma contra a outra para identificar regiões homólogas através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). O cálculo é realizado após o alinhamento das sequências de nucleotídeos através da fórmula: ANI = (número de nucleotídeos idênticos nas regiões homólogas / comprimento total das regiões homólogas) x 100.

O cálculo do *Orthologous Average Nucleotide Identity* (OrtoANI) foi realizado através do *software Orthologous ANI Tool* (OAT), disponível em: <https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoani>. Utilizou-se os parâmetros padrões e o *pipeline* do programa que permite identificar os genes ortólogos entre os genomas comparados. O algoritmo que realiza o cálculo entre os genomas consiste em três etapas. Primeiramente, ambas as sequências do genoma são fragmentadas em 1.020 pb de comprimento, em seguida, todos os fragmentos são pesquisados e as identidades dos nucleótidos são calculadas utilizando o programa BLASTn. Por fim, os fragmentos ortólogos entre dois genomas são identificados quando mostraram melhor similaridade recíproca com base nas pesquisas do BLASTn.

O cálculo do *Average Aminoacid Identity* (AAI) foi realizado através da plataforma de análise baseada na *web,* disponível em: <http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>. Utilizou-se os parâmetros padrões e o *pipeline* da plataforma que permite comparar a semelhança entre as sequências de aminoácidos de proteínas dos isolados de *Streptomyces* com as espécies mais relacionadas. As sequências de proteínas são alinhadas através do *Basic Local Alignment Search Tool for Proteins* (BLASTP) para identificar regiões conservadas (sequências semelhantes) e regiões variáveis (sequências diferentes). O cálculo é realizado após o alinhamento das sequências de proteínas através da fórmula: AII = (número de aminoácidos idênticos / comprimento total das sequências) x 100. O valor acima do *threshold* > 95 % indica uma maior similaridade genética, enquanto o valor abaixo indica maior divergência entre as espécies analisadas (RODRIGUEZ-R, KONSTANTINIDIS, 2014).

O cálculo do *Average Nucleotide Identity by BLAST* (ANIb) e do *Average Nucleotide Identity by MUMmer* (ANIm) foi realizado através da plataforma de análise baseada na *web,* disponível em: <https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>. Utilizou-se os parâmetros padrões e o *pipeline* da plataforma que permite avaliar a similaridade

genética entre o genoma da espécie de interesse contra o genoma da espécie de referência. Para ANIb as sequências genômicas são alinhadas através do BLAST que identifica regiões homólogas e para ANIm as sequências genômicas são alinhadas através através do *Maximal Unique Matches* (MUMmer) que identifica regiões de sequência única em cada genoma, bem como regiões de similaridade entre eles. O cálculo do ANIb é realizado com base no alinhamento BLAST através da fórmula: ANIb = (número de pares de nucleotídeos idênticos nas regiões homólogas / comprimento total das regiões homólogas) x 100 e o ANIm foi calculado a partir do alinhamento do MUMmer através da fórmula: ANIm = (número de pares de nucleotídeos idênticos nas regiões homólogas / comprimento total das regiões homólogas) x 100.

Todos os algoritmos acima apresentam como ponte de corte para determinação de novas espécies um valor de *threshold* > 95~96 %, ou seja, o equivalente ao valor de 70% relativo ao dDDH. Indicando, portanto, que o genoma analisado pertence à mesma espécie quando >96%, enquanto o valor abaixo indica potencialmente nova a espécie se comparado a todos os tipos mais relacionados (RICHTER, ROSSELLÓ-MÓRA, 2009; RICHTER *et al.*, 2015, LEE *et al.,* 2016, YOON *et al*., 2017).

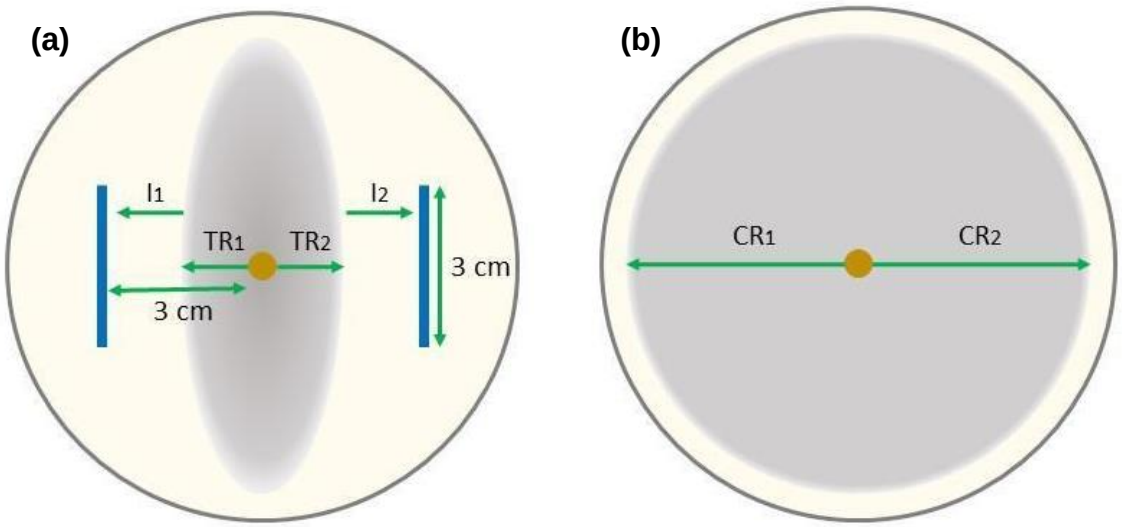
### 4.3 Avaliação da atividade antifúngica por meio de pareamento de cultura

Visando avaliar a potencial atividade antagonista, os quatros isolados de *Streptomyces* foram testados através do método de culturas pareadas contra 13 fitopatógenos (Tabela 2).

Para cada placa teste um *plug* micelial de 0,5 cm de cada fitopatógeno foi inoculado no centro da placa de Petri contendo o meio BDA enriquecido. Posteriormente, através da técnica de estria simples os isolados de *Streptomyces* foram inoculados a 3 cm de distância do disco micelial do patógeno por uma estria de 3 cm (Figura 1a). Como controle negativo, foram utilizados somente o patógeno no centro da placa de Petri (Figura 1b). Todas as placas de Petri foram mantidas a temperatura de 25 °C durante 15 dias. Foram realizadas avaliações das mensurações com paquímetro e as medições da distância do crescimento dos fitopatógenos no 5º,

10º e 15º dia foram anotadas. O experimento foi conduzido em triplicata (ANITH, NYSANTH, NATARAJAN, 2021).

**Figura 1 -** Representação esquemática do ensaio *in vitro*




Fonte: O autor (2023).
Nota: Ensaio *in vitro* de cultura dupla (fitopatógeno e isolados de *Streptomyces*). (a) placa de teste. (b) placa de controle. CR1 e CR2: raio da colônia do fitopatógeno na placa de teste. TR1 e TR2: raio da colônia do fitopatógeno na placa controle. I1 e I2: zona de inibição. As linhas azuis representam a estria bacteriana. Os círculos marrons são os *plugs* dos fitopatógenos. As linhas verdes correspondem às medidas. Fonte: adaptado de Anith, Nysanth, Natarajan, 2021.

Após os períodos estabelecidos, foi calculada a porcentagem de inibição adotando o parâmetro formular I = C – T / C x 100, onde: I = porcentagem (%) de inibição; C = é a distância do crescimento radial (mm) do micélio do patógeno na ausência do antagonista (controle), e T = é a distância do crescimento radial (mm) do patógeno em direção ao antagonista (teste), conforme descrito por (BHAI *et al.,* 2016).

## 4.4 Mineração genômica e anotação gênica

### 4.4.1 Identificação de *clusters* gênicos biossintéticos e prospecção de metabólitos secundários

Os *Biosynthetic Gene Clusters* (BGCs) ou clusters de genes biossintéticos relacionados à produção de metabólitos secundários foram preditos utilizando a ferramenta de mineração genômica *Secondary Metabolites Analysis Shell* (antiSMASH*) Bacterial*, versão 6.1, uma plataforma de análise baseada na *web*,

disponível em <https://antismash.secondarymetabolites.org>. Foram utilizados os parâmetros padrões e seguindo o *pipeline* da plataforma que pode identificar até 70 grupos de classes de moléculas. Cada BGC foi classificado conforme o tipo de produto natural codificado dentro do grupo de gene (MEDEMA *et al.,* 2011; BLIN *et al*., 2021).

Os BGCs foram classificados de acordo com a similaridade apresentada com vias de biossíntese já caracterizadas e disponíveis na base de dados *Minimum Information about a Biosynthetic Gene Cluster* (MIBiG), onde alta similaridade corresponde a ≥ 70 %, moderada similaridade é de 30 - 69 %, baixa similaridade é de 1 - 29 % e ausência de similaridade é igual 0 %.

Paralelamente, foi realizada a análise de sintenia utilizando a ferramenta *Clinker,* uma plataforma baseada na *web* (*BioPython*) e *Clustermap.js,* uma biblioteca de visualização (*JavaScript*) complementar, disponível em <https://cagecat.bioinformatics.nl>. As ferramentas foram usadas em conjunto para gerar números de comparação de *cluster* de genes precisos, interativos (CAMERON, YIT-HENG, 2021).

### 4.4.2 Anotação de genes e classificação em subsistemas

A anotação estrutural e funcional de genes foi realizada utilizando a ferramenta *Rast Annotation using Subsystem Technology* (RAST), uma plataforma de análise baseada na *web*, disponível em <https://rast.nmpdr.org/>.

Foram seguidos os parâmetros padrões do *pipeline* da plataforma, que utiliza como base para comparação o banco de dados SEED disponível em <http://pubseed.theseed.org/>, onde os dados foram organizados em subsistemas. Essa classificação corresponde aos conjuntos de funções logicamente relacionadas, para gerar informações sobre taxonomia, tamanho, número de *contigs*, número de sequências de codificação e RNA's e contagens de anotações genéticas não hipotéticas e hipotéticas (AZIZ *et al*., 2008; MEYER *et al.,* 2008).

## 4.5 Abordagem OSMAC e obtenção de extratos para avaliação de citotoxicidade

### 4.5.1 OSMAC

O pré-inóculo foi preparado em caldo ISP2, com correção do pH para 7,2, onde 50 mL de caldo meio de cultura foi adicionado em um Erlenmeyer com capacidade para 125 mL, em seguida foi adicionado 0,5 mL da cultura bacteriana reativada.

A produção de metabólitos de cada isolado foi realizada por meio da abordagem OSMAC, que consiste em cultivar uma linhagem em diferentes condições, e nesse caso, a abordagem OSMAC usada foi com diferentes fontes de nutrientes. Foi usado como caldo nutritivo o ISP2, Simplificado A, BD enriquecido, GYM e YM (Tabela 3).

Cada linhagem foi cultivada nos diferentes meios de cultura em triplicata, sendo o volume final do OSMAC de 300 mL, onde 298 mL consistiu do caldo nutritivo específico e 2 mL consistiu do cultivo do pré-inóculo de cada isolado de *Streptomyces*. O volume final do OSMAC foi distribuído em três Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de cultivo em cada. Todos os Erlenmeyers contendo os inóculos foram incubados durante 7 dias, a 28º C, 7,2 pH a 150 rpm em câmara incubadora com agitação orbital.

Após o cultivo em meio líquido dos isolados *Streptomyces*, a biomassa foi separada do sobrenadante por centrifugação por 15 min, a 7.000 rpm, 8 ºC (*Centrifuge Eppendorf* 5430 R). Em seguida, todas as amostras foram filtradas em papel de filtro GR40 *Whatman* de 150 mm de diâmetro e o sobrenadante foi coletado para posterior liofilização.

Após o processo de liofilização, as amostras foram levadas a Central de Análises Programa de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais (MBT) na Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (ESA-UEA) para a realização da extração dos metabólitos.

A extração dos metabólitos foi realizada pelo processo de maceração em 60 mL de Álcool Metílico P.A (SYNTH). As amostras foram submetidas à sonicação em banho de ultrassom, durante 20 min, 40 kHz (MyLabor SSu15L), para melhor dissolução e desprendimento da amostra incrustadas na vidraria.

Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro GR40 *Whatman* de 150 mm de diâmetro e a fase orgânica foi coletada em balão de 250 mL. A fase orgânica foi levada ao evaporador rotativo à vácuo a 50 rpm, 500 mmHg, 35º C (Fisatom 803).

Os extratos brutos foram colhidos, armazenados em frascos de penicilina e nomeados com a identificação do isolado e do respectivo meio em que foi cultivado, e permaneceram no dessecador até secagem e evaporação de todo solvente.

Os extratos brutos foram submetidos a prévia avaliação da atividade citotóxica.

### 4.5.2 Avaliação do potencial citotóxico

As análises preliminares de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro* foram realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bahia. Os ensaios foram conduzidos pela equipe do pesquisador Dr. Daniel Pereira Bezerra. Ressaltamos que as análises fazem parte de um *screening* inicial para determinar o potencial anticâncer das amostras.

As amostras foram pesadas na quantidade de 1 mg, posteriormente foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mg/mL (para extratos) ou 5 mg/mL (para compostos puros). As células utilizadas nos testes foram células de carcinoma de cólon humano (HCT116) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

O cultivo das células foi realizado em garrafas para cultura de células e o meio utilizado foi o RPMI 1640 suplementados com 10 % de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de $CO_2$ a 37 ºC e diariamente foi acompanhado o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingiu confluência necessária para renovação de nutrientes. Para manutenção das células aderidas foi utilizada tripsina (0,25 %) para que as células se desprendam das paredes das garrafas. As culturas se apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela coloração com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias, o ensaio do *Alamar Blue* foi realizado após 72 h de exposição aos extratos bacterianos. O *Alamar Blue*, identificado como resazurina (O'BRIEN *et al*., 2000), é um indicador fluorescente-colorimétrico com propriedades redox. Assim, com os sais de tetrazólio, o *Alamar Blue*

se reduz em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do *Alamar Blue* reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al*., 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 µL/poço de uma solução de 0,3 x $10^6$ células/mL para células em suspensão e 0,7 x $10^5$ células/mL para células aderidas). Após 24 h de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de *Alamar Blue* (resazurina) foram adicionados em cada poço.

As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al*., 1994). A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração para determinado suas IC50 realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

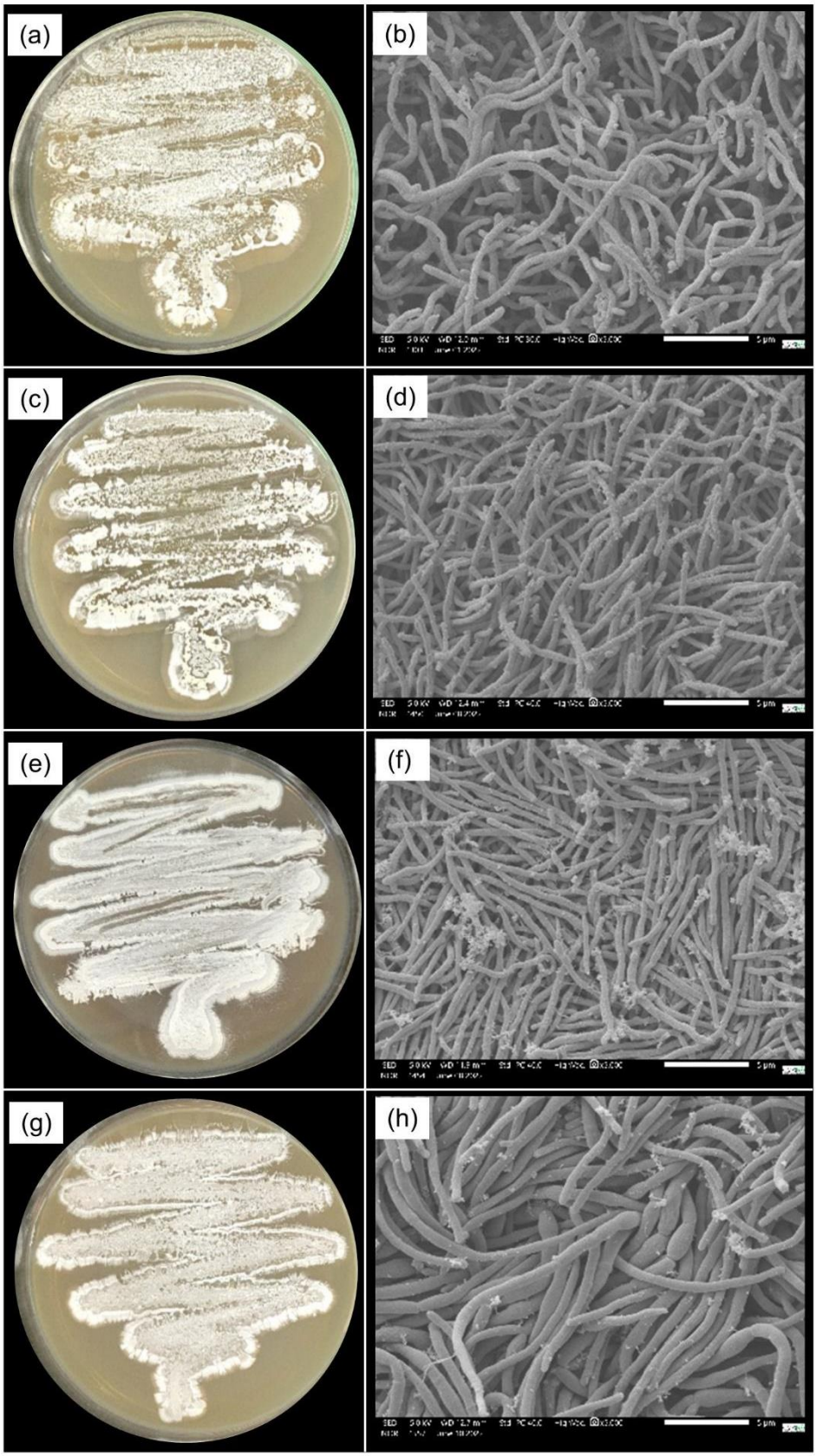
## 5.1 Caracterização morfológica das linhagens de *Streptomyces*

Com base na avaliação morfológica dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159, constatou-se que todos apresentavam características macroscópicas e microscópicas similares. Essas características incluíam a coloração predominantemente branca das hifas aéreas e dos micélios vegetativos, assim como a forma das colônias (Figura 2) quando cultivadas em meio de cultura ISP2 após 7 dias de crescimento a 28 ºC. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se hifas filamentosas septadas, característica típica do gênero *Streptomyces* spp. (SIDDIQUE *et al*., 2014; AYED, 2018; AREFA, SARKER, RAHMAN, 2021; KONWAR, BASAK, DEVI, 2023).

No que se refere ao isolado MPUR-31.3, observou-se variação na cor do substrato quando foram submetidos aos testes de antagonismo contra os fitopatógenos (Figura 26). Pode-se predizer que essa variação de coloração é resultado da liberação de metabólitos de defesa no meio de cultura, onde diferentes condições de cultivo ou a mudança de apenas um parâmetro, como a luminosidade, poderia influenciar no crescimento, na coloração dos micélios e na síntese de metabólitos desses microrganismos.

As condições de luz, (claro ou escuro) desempenham um papel significativo no crescimento de *Streptomyces* spp. e na produção de pigmentos (KOYAMA *et al*., 1976; BOUKAEW *et al*., 2021). Takano *et al*., (2005) relatou pela primeira vez que a indução de luz azul foi capaz de atuar como fator de desbloqueio de um gene que direciona a transcrição do *cluster* para a biossíntese de carotenóides por *S. coelicolor* A3.

**Figura 2 -** Características morfológicas e a microscopia eletrônica de varredura




Fonte: O autor (2023).

Nota: (a) e (b) MPUR-28.3, (c) e (d) MPUR-31.3, (e) e (f) MPUR-51.7 e (g) e (h) SOL-159, representam, respectivamente as características morfológicas e microscópicas (escala de ampliação: 5 µm) dos isolados cultivados em meio ISP2.

## 5.2 Sequenciamento e montagem do genoma

Os genomas dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 foram sequenciados por meio da plataforma *Ilumina* e informações sobre tamanho do genoma, CDS's, RNA, conteúdo de G+C, distribuição dos *contigs*, N50 e L50 foram obtidas para cada isolado. O termo N50 e L50 são medidas usadas para descrever a qualidade e a fragmentação de um genoma. O N50 indica o tamanho médio dos *contigs* ou *scaffolds* maiores que representam metade do tamanho do genoma e o L50 é o número de *contigs* ou *scaffolds* necessários para atingir o valor do N50 (PRASAD, LORENZEN, WESTBURY, 2021). Portanto, quanto maior o valor do N50 e menor o valor do L50, melhor é a qualidade da montagem. Esses dados são relevantes para compreender a estrutura e a composição genética das amostas.

O tamanho do genoma do isolado MPUR-28.3 é de 7.409.550 pares de bases (pb), com 639 *contigs,* valor de N50 e L50 são 23.506 e 92, respectivamente, e conteúdo de G+C é de 73,12%. Foram identificadas 7.090 sequências codificantes (CDS's) e 90 RNA's (Tabela 4). Para o isolado MPUR-31.3 o tamanho do genoma é de 8.646.630 pb, 3.841 *contigs,* valor de N50 é 6.589 e o de L50 é 354, respectivamente, e o conteúdo de G+C é de 71,28%. Foram identificadas 10.396 CDS's e 88 RNA's (Tabela 4).

**Tabela 4 -** Montagem dos genomas dos isolados de *Streptomyces* MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159

| Características | MPUR-28.3 | MPUR-31.3 | MPUR-51.7 | SOL-159 |
|---|---|---|---|---|
| Tamanho do genoma (pb) | 7.409.550 | 8.646.630 | 6.994.977 | 8.122.866 |
| Conteúdo G+C (%) | 73.12 | 71.28 | 73.19 | 72.24 |
| *Contigs* | 639 | 3.841 | 959 | 147 |
| N50 | 23.506 | 6.589 | 14.128 | 92.707 |
| L50 | 92 | 354 | 144 | 25 |
| CDS's | 7.090 | 10.396 | 6.962 | 7.787 |
| RNA's | 90 | 88 | 78 | 78 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: Sequências Codificantes (CDS's).

O isolado MPUR-51.7 possui o tamanho do genoma de 6.994.977 pb, 959 *contigs, v*alor de N50 e L50 são 14.128 e 144, respectivamente, e o conteúdo de G+C

é de 73,19%. Foram identificadas 6.962 CDS's e 78 RNA's (Tabela 4). Já o tamanho do genoma do isolado SOL-159 é de 8.122.866 pb, 147 *contigs,* valor de N50 é de 92.707 e o de L50 é de 25, respectivamente, e o conteúdo de G+C é de 72,24%. Foram identificadas 7.787 CDS's e 78 RNA's (Tabela 4).

### 5.3 Identificação filogenômica das linhagens de *Streptomyces*

A identificação filogenômica dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 foi realizada por meio de comparação dos valores de dDDH com os 10 genomas de espécies tipo mais proximamente relacionados, disponíveis no banco de dados *Type Genome Server* (TYGS). Também foi obtida uma árvore filogenômica dos isolados com os seus representantes filogeneticamente mais próximos (MEIER-KOLTHOFF e GÖKER, 2019).

Com base nos valores de dDDH fórmulas d0, d4, d6 e GGDC (fórmulas d2), em relação à espécie tipo filogeneticamente mais próxima, neste trabalho foram identificadas duas novas espécies de *Streptomyces* (Tabela 5).

**Tabela 5 -** Identificação filogenômica das linhagens de *Streptomyces* MPUR 28.3, MPUR 31.3, MPUR 51.7 e SOL 159

| Isolados | Tipo | dDDH (d0, in %) | **dDDH (d2, in %) | dDDH (d4, in %) | dDDH (d6, in %) | G+C content Difference (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MPUR-28.3 | *Streptomyces limosus* NBRC 12790 T | 88,6 | 87,9 | 87,9 | 91,2 | 0,34 |
| MPUR-31.3 | *Streptomyces glomeratus* DSM 41457 T | 37,7 | 34,9* | 34,9* | 36,2 | 0,36 |
| MPUR-51.7 | *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-1271 T | 88,2 | 88,2 | 88,2 | 90,9 | 0,24 |
| SOL-159 | *Streptomyces roseicoloratus* TRM 44457 T | 42,1 | 34,0* | 34,0* | 39,5 | 0,38 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: valores de dDDH obtidos a partir da comparação dos isolados de *Streptomyces* e espécies tipo estreitamente relacionadas identificada pela ferramenta TYGS. *digital DNA-DNA hybridization* (dDDH) > 70 %, mesma espécie. (*) potencial nova espécie. (**) fórmula calculada pelo GGDC. (T) representa a espécie tipo. A fórmula dDDH (d2) foi calculada utilizando o servidor GGDC 2.1, disponível em: <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#> (MeierKolthoff *et al*. 2013). As análises de dDDH foram realizadas em março de 2023.

A análise filogenômica revelou que o isolado MPUR-28.3 pertence à espécie *Streptomyces limosus*, visto que os valores de dDDH são maiores que 70%. Quando

comparados MPUR-28.3 e *Streptomyces limosus* os valores de dDDH foram de 88,6 % (d0), 87,9 % (d2 e d4) e 91,2 % (d6) e a diferença no conteúdo de G+C em relação à espécie de referência é de 0,34 %, conforme apresentado (Tabela 5).

O isolado MPUR-51.7 foi identificado como *Streptomyces albidoflavus,* dDDH 88,2 % (d0, d2 e d4) e 90,9 % (d4). A diferença no conteúdo de G+C em relação à espécie tipo é de 0,24 % (Tabela 5).

A espécie tipo mais relacionada com o isolado MPUR-31.3 foi *Streptomyces glomeratus* DSM 41457O, contudo os valores de dDDH foram de 37,7 % (d0), 34,9 % (d2 e d4) e 36,2 % (d6) e conteúdo de G+C em relação à espécie de referência é de 0,36 % (Tabela 5). Já o isolado SOL-159 também apresentou valores de dDDH abaixo do ponto de corte quando comparado com *Streptomyces roseicoloratus* TRM 44457 a espécie tipo mais relacionada sendo 42,1 % (d0), 34,0% (d2), 34,0 % (d4) e 39,5 % (d6) (Tabela 5). Os valores de dDDH obtidos indicam que segundo este critério os isolados representam duas novas espécies.

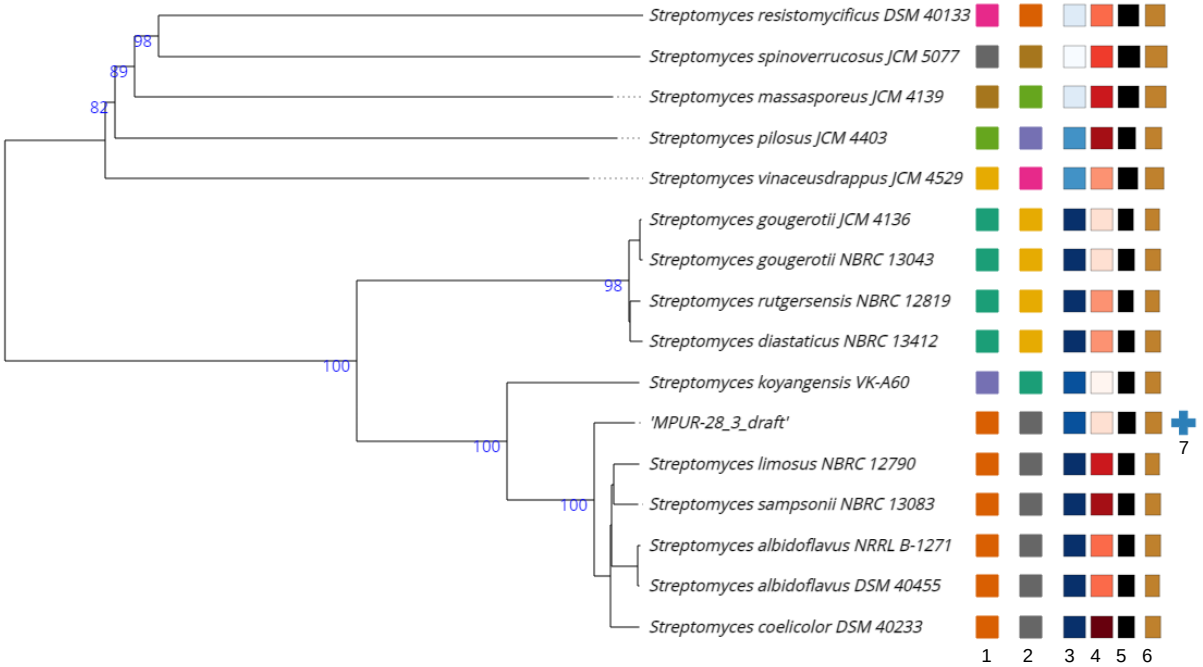
A reconstrução da árvore filogenômica do isolado MPUR-28.3 em relação a 15 espécies mais relacionadas mostrou valores médios de suporte de ramificação de 67,0 % com base nos *pseudo-bootstraps.* Embora o isolado MPUR-28.3 apresente valores de dDDH 87.9 %, calculado por meio das fórmulas d2 e d4 (Tabela 5), indicam que pertencem à mesma espécie *Streptomyces limosus*, diferente do esperado a linhagem MPUR 28.3 formando um clado distinto (Figura 3).

Complementarmente, o isolado MPUR-28.3 também foi comparado com as espécies de referência, onde os valores de δ (delta) variaram de 0,038 a 0,09, com média de 0,064, indicando a variação da distância genômica entre os microrganismos comparados. A porcentagem de conteúdo GC variou de 70,63 a 73,18, enquanto o tamanho dos genomas variou de 6.501.945 a 9.222.591 pb, com números de proteínas codificadas entre 5.631 e 8.531. O comprimento das subunidades menores do RNA ribossômico (SSUrRNA) variou de 891 a 1.515 pb.

Importante destacar que δ é um indicador da distância genômica entre os microrganismos comparados. Quanto menor o valor de delta, maior é a precisão da avaliação. Cabe também ressaltar, que para a análise dos comprimentos das sequências SSUrRNA, devido às baixas divergências intraespecíficas e à alta pressão seletiva, geram topologias muito robustas, tornando essa região uma excelente ferramenta para calcular distâncias genéticas e inferir na construção de árvores

filogenômicas com base nas diferenças das sequências de nucleotídeos (FARRIS, 1972; LE-FORT, DESPER, GASCUE, 2015; ANTONY-BABU *et al*., 2017).

**Figura 3 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado MPUR-28.3



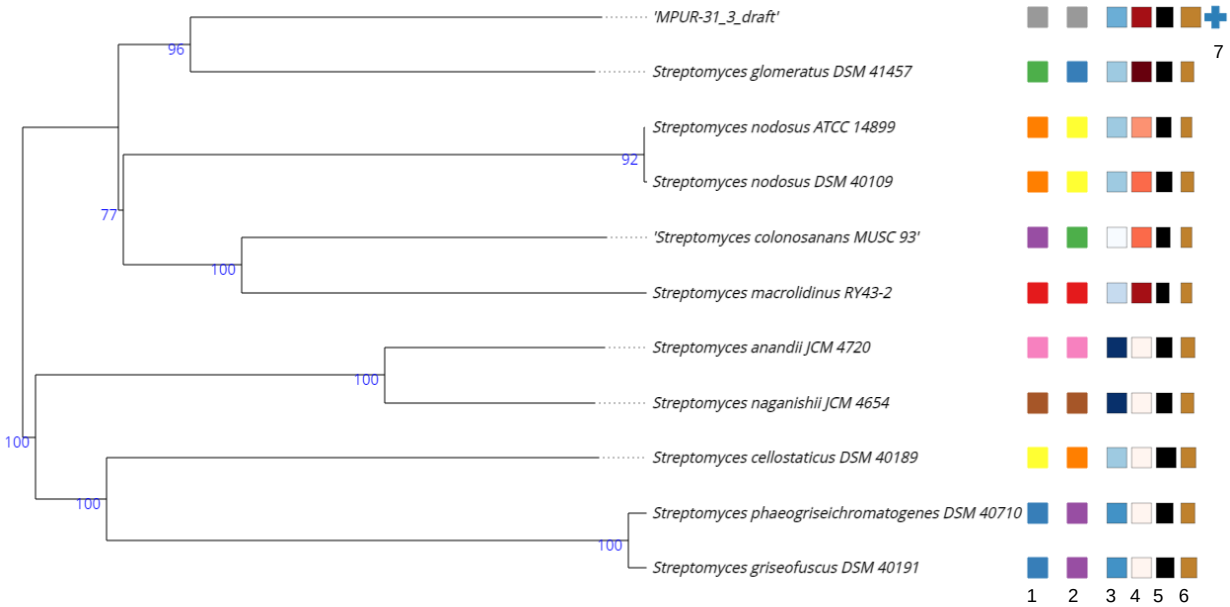

Fonte: O autor (2023).
Nota: Árvore filogenômica baseada no TYGS mostrando a relação entre o isolado MPUR-28.3 e as espécies de referência inferida com FastME 2.1.6.1 do GBDP e as distâncias calculadas a partir de sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos de fórmula de distância GBDP d5. Os números acima ramificações são valores de suporte a *pseudo-bootstrap* GBDP > 60 % de 100 replicações, com um suporte médio de ramificação de 67,0 %. A árvore estava enraizada no ponto médio. A tonalidade das cores refere-se às características similares compartilhadas entre as linhagens. Deste modo, as linhagens de bactérias podem ser agrupadas entre elas de acordo ao nível de espécie (1), subespécie (2), quanto ao conteúdo GC (3), valor δ (4), tamanho do genoma (5), Número de proteínas (6). O símbolo da cruz em (7) indica a posição do isolado MPUR-28.3.

A reconstrução da árvore filogenômica do isolado MPUR-31.3 em relação às 10 espécies mais relacionadas (Figura 4) mostrou valores médios de suporte de ramificação de 95,6 % com base nos *pseudo-bootstraps.* MPUR-31.3 formou um clado irmão com *Streptomyces glomeratus* DSM 41457, contudo o valor de dDDH entre eles é baixo, 34,9 %, calculado por meio das fórmula d2 e d4 (Tabela 5).

Complementarmente, o isolado MPUR-31.3 também foi comparado com as espécies de referência, onde os valores δ variam de 0,081 a 0,166 com média de 0.113, indicando a variação da distância genômica entre os microrganismos comparados. A porcentagem de conteúdo GC variou de 69,90 a 72,62, enquanto o tamanho dos genomas variou de 6.772.233 a 9.680.787 pb, com números de

proteínas codificadas nos genomas entre 5.859 a 10.092. O comprimento das SSUrRNA variou de 1.119 a 1.515 pb.

**Figura 4 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado MPUR-31.3



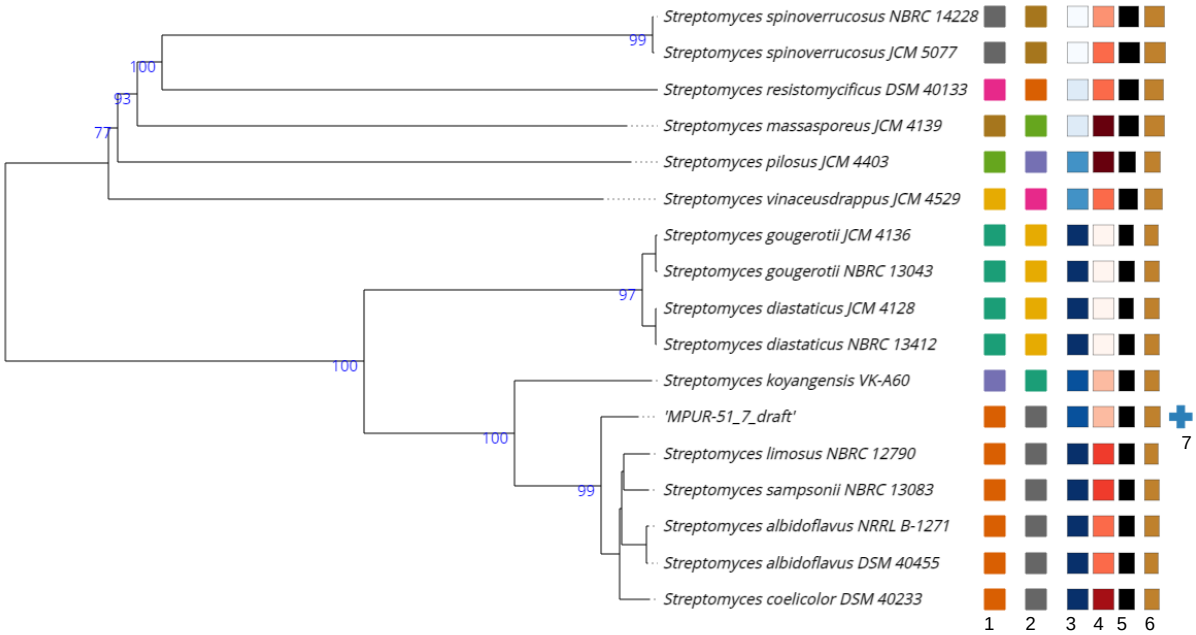

Fonte: O autor (2023).
Nota: Árvore filogenômica baseada no TYGS mostrando a relação entre o isolado MPUR-28.3 e as espécies de referência inferida com FastME 2.1.6.1 do GBDP e as distâncias calculadas a partir de sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos de fórmula de distância GBDP d5. Os números acima ramificações são valores de suporte a *pseudo-bootstrap* GBDP > 60 % de 100 replicações, com um suporte médio de ramificação de 95,6 %. A árvore estava enraizada no ponto médio. A tonalidade das cores refere-se às características similares compartilhadas entre as linhagens. Deste modo, as linhagens de bactérias podem ser agrupadas entre elas de acordo ao nível de espécie (1), subespécie (2), quanto ao conteúdo GC (3), valor δ (4), tamanho do genoma (5), Número de proteínas (6). O símbolo da cruz em (7) indica a posição do isolado MPUR-31.3.

A reconstrução da árvore filogenômica para o isolado MPUR-51.7 em relação às 16 espécies selecionadas (Figura 5) mostrou valores médios de suporte de ramificação de 67,9 % com base nos *pseudo-bootstraps.* Embora o isolado MPUR-51.7, tenha formado um clado distinto com um valor de dDDH 88.2 %, calculado por meio das fórmulas d2 e d4 (Tabela 5), pode-se predizer que este isolado possui alta relação com seu representante mais próximo o *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-1271, pois apresentam um t*hreshold* para subespécie acima 79 %. Ademais, forma um agrupamento com as espécies *S. albidoflavus* DSM 40455, *S. coelicolor* DSM 40233, *S. limosus* NBRC 12790 e *S. sampsonii* NBRC 13083, convergindo para um ancestral comum.

Complementarmente, o isolado MPUR-51.7 também foi comparado com as espécies de referência, onde os valores de δ variam de 0.025 a 0.094 com média de

0.056, indicando a variação da distância genômica entre os microrganismos comparados. A porcentagem de conteúdo GC variou de 70.69 a 73.65, enquanto o tamanho dos genomas variou de 6.501.945 a 9.222.591 pb e com números de proteínas dos genomas entre 5.631 a 8.531. O comprimento das SSUrRNA variou de 891 a 1.515 pb.

**Figura 5 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado MPUR-51.7



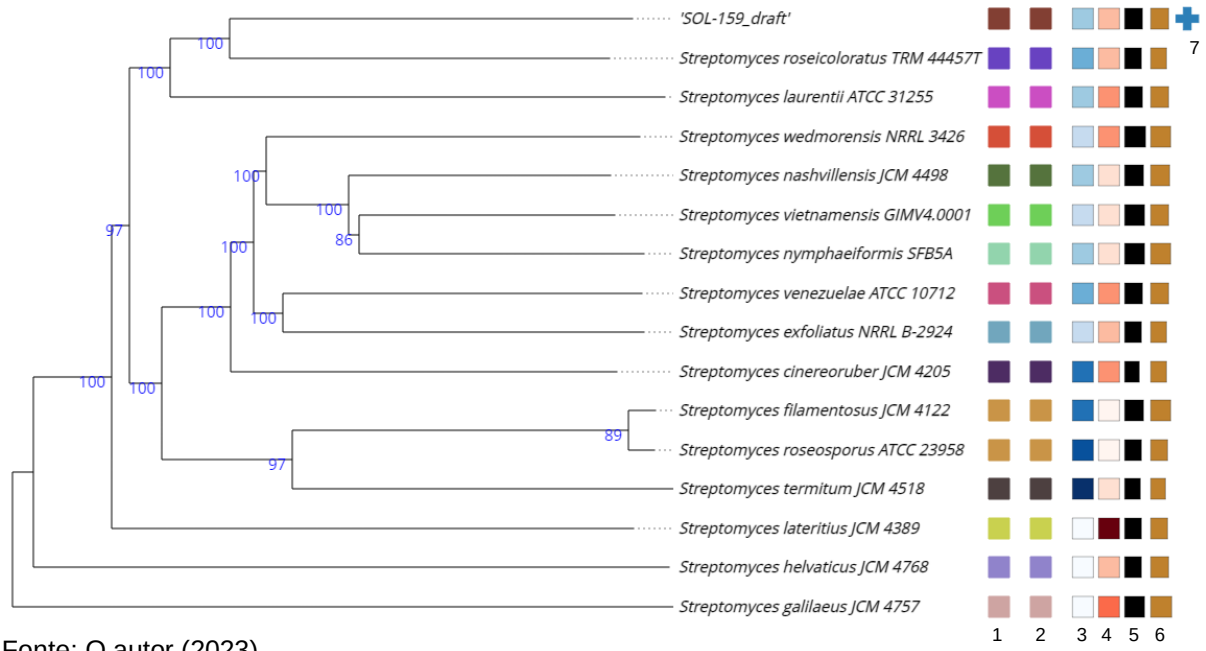

Fonte: O autor (2023).
Nota: Árvore filogenômica baseada no TYGS mostrando a relação entre o isolado MPUR-51.7 e as espécies de referência inferida com FastME 2.1.6.1 do GBDP e as distâncias calculadas a partir de sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos de fórmula de distância GBDP d5. Os números acima ramificações são valores de suporte a *pseudo-bootstrap* GBDP > 60 % de 100 replicações, com um suporte médio de ramificação de 67,9 %. A árvore estava enraizada no ponto médio. A tonalidade das cores refere-se às características similares compartilhadas entre as linhagens. Deste modo, as linhagens de bactérias podem ser agrupadas entre elas de acordo ao nível de espécie (1), subespécie (2), quanto ao conteúdo GC (3), valor δ (4), tamanho do genoma (5), Número de proteínas (6). O símbolo da cruz em (7) indica a posição do isolado MPUR-51.7.

O isolado SOL-159 em relação às 15 espécies mais relacionadas (Figura 6), mostrou valores médios de suporte de ramificação de 97,6 % com base nos *pseudo-bootstraps*. O isolado SOL-159, formou um clado irmão com *Streptomyces roseicoloratus* TRM 44457T. Contudo, como mostrado anteriormente o valor dDDH 34,0 % calculado por meio das fórmulas d2 e d4 (Tabela 5).

Complementarmente, o isolado SOL-159 também foi comparado com as espécies de referência, onde os valores δ variam de 0,126 a 0,287 com média de 0.173, indicando a variação da distância genômica entre os microrganismos

comparados. A porcentagem de conteúdo GC variou de 71.2 a 73.86, enquanto o tamanho dos genomas variou de 7.010.414 a 9.380.839 pb, com números de proteínas codificadas nos genomas entre 6.327 a 8.522. O comprimento das SSUrRNA variou de 965 a 1.514 pb.

**Figura 6 -** Árvore filogenômica da sequência genômica do isolado SOL-159




Fonte: O autor (2023).
Nota: Árvore filogenômica baseada no TYGS mostrando a relação entre o isolado SOL-159 e as espécies de referência inferida com FastME 2.1.6.1 do GBDP e as distâncias calculadas a partir de sequências genômicas. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos de fórmula de distância GBDP d5. Os números acima ramificações são valores de suporte a *pseudo-bootstrap* GBDP > 60 % de 100 replicações, com um suporte médio de ramificação de 97,6 %. A árvore estava enraizada no ponto médio. A tonalidade das cores refere-se às características similares compartilhadas entre as linhagens. Deste modo, as linhagens de bactérias podem ser agrupadas entre elas de acordo ao nível de espécie (1), subespécie (2), quanto ao conteúdo GC (3), valor δ (4), tamanho do genoma (5), Número de proteínas (6). O símbolo da cruz em (7) indica a posição do isolado SOL-159.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos pelos cálculos de dDDH obtidos para a identificação filogenômica, outros algoritmos como AAI, OrthoANI, ANI, ANIb, ANIm também foram obtidos para efeito de comparação.

Conforme descrito por Lee *et al.* (2016), o cálculo do ANI, mede a identidade média de nucleotídeos entre dois genomas bacterianos e tem sido amplamente utilizado para identificar e classificar taxonomicamente as espécies bacterianas. Afirmam ainda que a ferramenta é internacionalmente aceita pela comunidade científica. Assim como o dDDH, o ANI também usa as informações de genomas completos ou rascunhos de genomas para a inferência.

**Tabela 6 -** Análise genômica comparativa por valores de ANI, OrtoANI, AAI, ANIb e ANIm dos isolados de *Streptomyces* MPUR 28.3, MPUR 31.3, MPUR 51.7 e SOL 159

| Isolados | ANI (%) | OrthoANI (%) | AAI (%) | ANIb (%) | ANIm (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| MPUR-28.3 | 98,68 | 96,68 | 98,35 | 98,07 | 98,68 |
| MPUR-31.3 | 87,88 | 88,14 | 85,29 | 86,79 | 89,19 |
| MPUR-51.7 | 98,69 | 98,77 | 98,31 | 98,33 | 98,71 |
| SOL-159 | 87,09 | 87,84 | 85,34 | 87,07 | 89,27 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise genômica comparativa do isolado MPUR-28.3 com a espécie de referência *Streptomyces limosus* NBRC 12790, isolado MPUR-31.3 com *Streptomyces glomeratus* DSM 41457, MPUR-51.7 com *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-1271, SOL-159 com *Streptomyces roseicoloratus* TRM 44457T. Identidade Média de Nucleotídeos (ANI), OrthoANI, Blast+ (ANIb) e MUMmer (ANIm). Como ponto de corte para pertencer à mesma espécie valores > 95~96 %; Identidade Média de Aminoácidos (AAI) > 95 %; Os acessos às plataformas foram realizados no período de março a abril de 2023.

A tabela 6 mostra os valores da identidade genômica comparativa entre os isolados bacterianos e as espécies de referência para cada métrica, além disso, fornece informações importantes sobre a classificação taxonômica desses isolados. Essas análises podem subsidiar futuras análises taxonômicas e evolutivas para isolados de *Streptomyces*, em especial de rios amazônicos.

Os resultados confirmam os dados obtidos com base no dDDH, onde os isolados MPUR-28.3 e MPUR-51.7 representam espécies já conhecidas, e os valores obtidos com os diferentes algoritmos estão acima do valor de corte quando comparado com a espécie mais relacionada, o *Streptomyces limosus* NBRC 12790, e *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-1271 (Tabela 6).

Por outro lado, os isolados MPUR-31.3 e SOL-159 apresentaram valores abaixo do *threshold* nos diferentes métodos quando comparado com as espécies mais relacionadas, o *Streptomyces glomeratus* DSM 41457 e *Streptomyces roseicoloratus* TRM 44457T respectivamente. Para ambos os isolados todos os valores obtidos nos diferentes algoritmos foram baixo 90% (Tabela 6), sendo indicativo de novas espécies e corroborando com os dados de dDDH. Contudo, além da abordagem genômica realizada, outras análises como testes de resistência, caracterização da parede celular e análises bioquímicas são complementares para confirmação dessas duas novas espécies.

## 5.4 Anotação de genes e classificação em subsistemas

A anotação automática dos genomas dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 foi realizada pela plataforma RAST, e inferida pelo algoritmo RASTk, no dia 24 de abril de 2023.

Os genes anotados foram classificados em duas categorias principais: "*in subsystem*" e "*not in subsystem*". A primeira categoria significa que os genes foram associados a subsistemas funcionais específicos, como transporte de íons, biossíntese de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, entre outros. Já a segunda categoria indica que os genes não foram associados a nenhum subsistema funcional específico. Isso pode ocorrer devido a genes não caracterizados ou funções não mapeadas, bem como a genes não codificantes (OVERBEEK *et al.,* 2014). Essa classificação fornece *insights* importantes sobre a funcionalidade dos genes anotados e auxilia na compreensão dos processos biológicos relacionados aos genomas desses isolados.

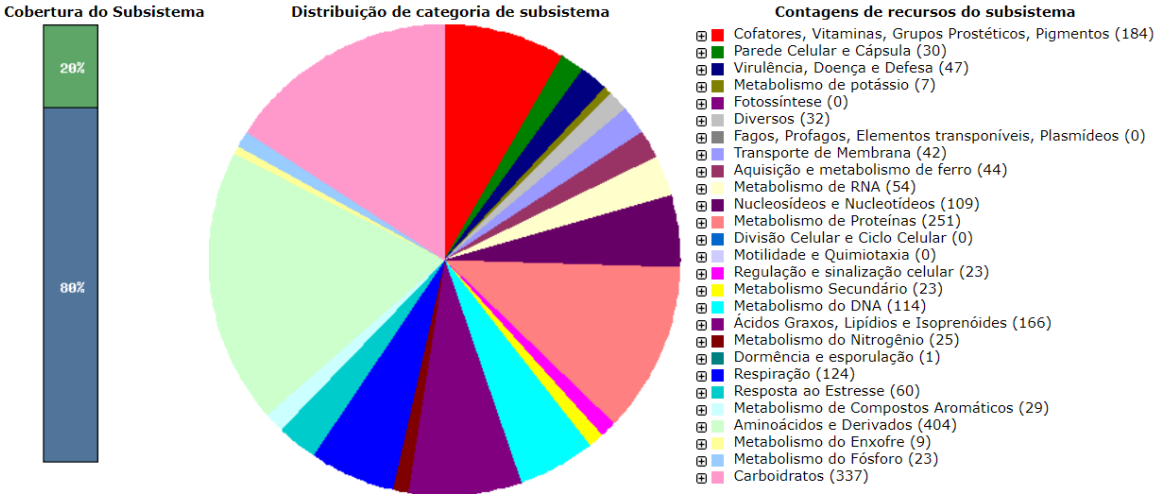
No genoma do isolado MPUR-28.3, foram preditas 7.090 sequências codificantes (CDS's). Dentre essas, 5.730 CDS's (80 %) foram classificados como "*not in subsystem*", ou seja, não foram associados a nenhum subsistema funcional específico. Por outro lado, 1.360 CDS's (20 %) foram classificados como "*in subsystem*", indicando que foram associados a subsistemas funcionais específicos. Além disso, foram identificados 90 genes de RNA's (Tabela 4, Figura 7).

As sequências codificadoras mais representativas do genoma do isolado foram classificadas em diversas categorias funcionais, incluindo aminoácidos e derivados (404), carboidratos (337), metabolismo de proteínas (251), cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos (184), ácidos graxos, lipídios e isoprenóides (166).

Além disso, dos 7.090 genes codificadores identificados, 25 foram associados a degradação proteica, 44 à aquisição e metabolismo de ferro, sendo 36 deles relacionados a sideróforos. Identificou-se 23 genes relacionados ao metabolismo secundário, incluindo 12 envolvidos na síntese de tiazol/oxazol, e 11 genes de lantionina sintetases. Adicionalmente, foram encontrados 25 genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio, 60 genes associados à resposta ao estresse, com 15 desses genes envolvidos em respostas osmóticas, 23 em respostas oxidativas e 20 sem subcategorias específicas. Foram também identificados 9 genes relacionados ao

metabolismo do enxofre, 23 genes relacionados ao metabolismo do fósforo e 47 genes associados à virulência, doença e defesa.

**Figura 7 -** Anotação funcional do isolado MPUR-28.3




Fonte: O autor (2023).
Nota: A anotação proposta pelo RAST apresenta a diversidade genética e a classifica os CDS's em subsistemas de acordo com o grupo funcional. As categorias são expansíveis até o gene específico e os 23 subsistemas mais abundantes são representados por uma cor específica indicada na coluna da direita e com sua respectiva contagem.

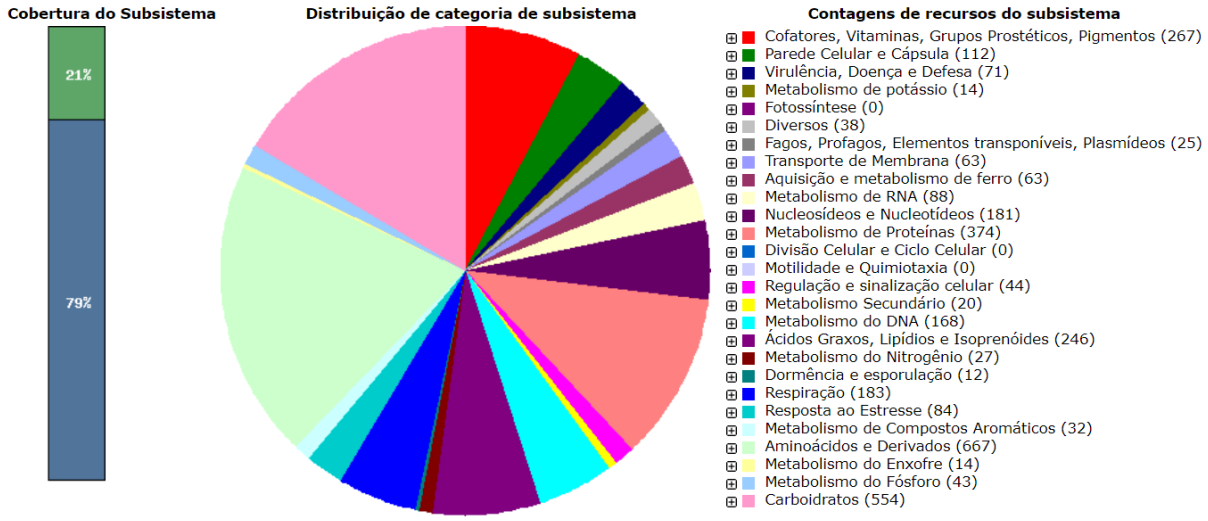
No genoma da linhagem MPUR-31.3 foram preditas 10.396 sequências codificadoras. Dentre essas, 8.259 CDS's (79 %) foram classificados como "*not in subsystem*", ou seja, não foram associados a nenhum subsistema funcional específico. Por outro lado, 2.137 CDS's (21 %) foram classificados como "*in subsystem*", indicando que foram associados a subsistemas funcionais específicos. Adicionalmente, foram identificados 88 genes de RNA's (Tabela 4, Figura 8).

As sequências codificadoras mais representativas do genoma do isolado MPUR-31.3 foram classificadas em diversas categorias funcionais, incluindo aminoácidos e derivados (667), carboidratos (554), metabolismo de proteínas (374), cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos (267), ácidos graxos, lipídios e isoprenóides (246).

Além disso, dos 8.259 genes codificadores identificados, 44 foram associados à degradação proteica, 63 à aquisição e metabolismo de ferro, sendo 41 deles relacionados a sideróforos. Identificou-se também 20 genes relacionados ao metabolismo secundário, incluindo 12 envolvidos na síntese de tiazol/oxazol, e 27 genes de metabolismo do nitrogênio. Adicionalmente, foram encontrados 84 genes associados à resposta ao estresse, com 9 desses genes envolvidos em respostas

osmóticas, 17 em respostas oxidativas e 49 sem subcategorias específicas. Foram identificados também 14 genes relacionados ao metabolismo do enxofre, 43 genes relacionados ao metabolismo do fósforo e 71 genes associados à virulência, doença e defesa.

**Figura 8 -** Anotação funcional do isolado MPUR-31.3




Fonte: O autor (2023).
Nota: A anotação proposta pelo RAST apresenta a diversidade genética e a classifica os CDS's em subsistemas de acordo com o grupo funcional. As categorias são expansíveis até o gene específico e os 24 subsistemas mais abundantes são representados por uma cor específica indicada na coluna da direita e com sua respectiva contagem.

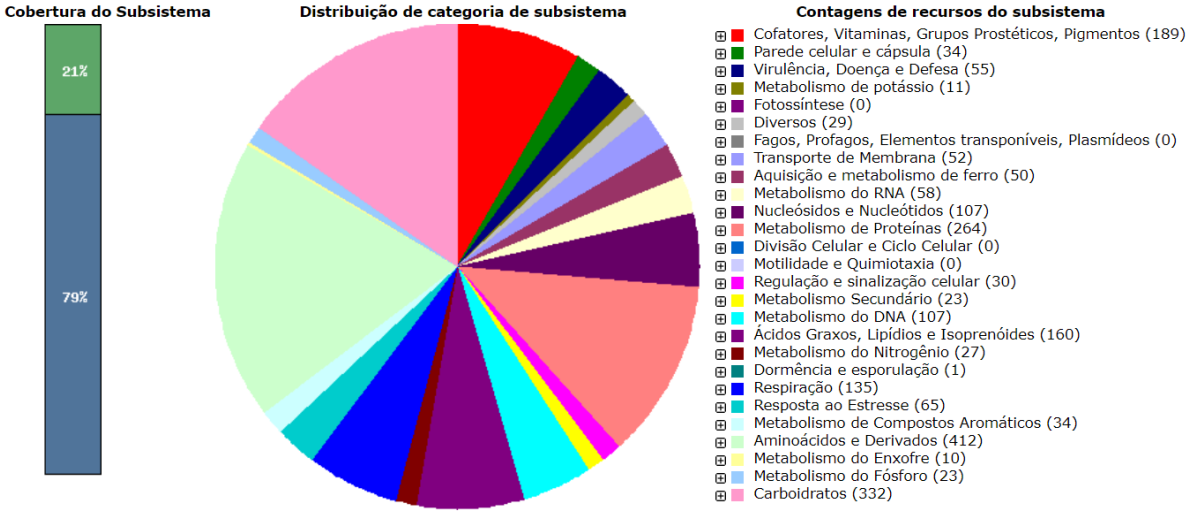
O genoma do isolado MPUR-51.7 apresentou a previsão de 6.962 sequências codificadoras. Dentre essas, 5.565 CDS's (79 %) foram classificados como "*not in subsystem*", ou seja, não foram associados a nenhum subsistema funcional específico. Por outro lado, 1.397 CDS's (21 %) foram classificados como "*in subsystem*", indicando que foram associados a subsistemas funcionais específicos. Adicionalmente, foram identificados 78 genes de RNA's (Tabela 4, Figura 9).

As sequências codificadoras mais representativas do genoma do isolado MPUR-51.7 foram classificadas em diversas categorias funcionais, incluindo aminoácidos e derivados (412), carboidratos (332), metabolismo de proteínas (264), cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos (189), ácidos graxos, lipídios e isoprenóides (160).

Além disso, dos 6.962 genes codificadores identificados, 24 foram associados à degradação proteica, 50 à aquisição e metabolismo de ferro, sendo 41 deles relacionados a sideróforos. Identificou-se também 23 genes relacionados ao

metabolismo secundário, incluindo 12 envolvidos na síntese de tiazol/oxazol, e 11 genes de lantionina sintetases. Adicionalmente, foram encontrados 27 genes associados ao metabolismo do nitrogênio, 65 genes associados à resposta ao estresse, com 13 desses genes envolvidos em respostas osmóticas, 24 em respostas oxidativas e 26 sem subcategorias específicas. Foram também identificados 10 genes relacionados ao metabolismo do enxofre, 23 genes relacionados ao metabolismo do fósforo e 55 genes associados à virulência, doença e defesa.

**Figura 9 -** Anotação funcional do isolado MPUR-51.7



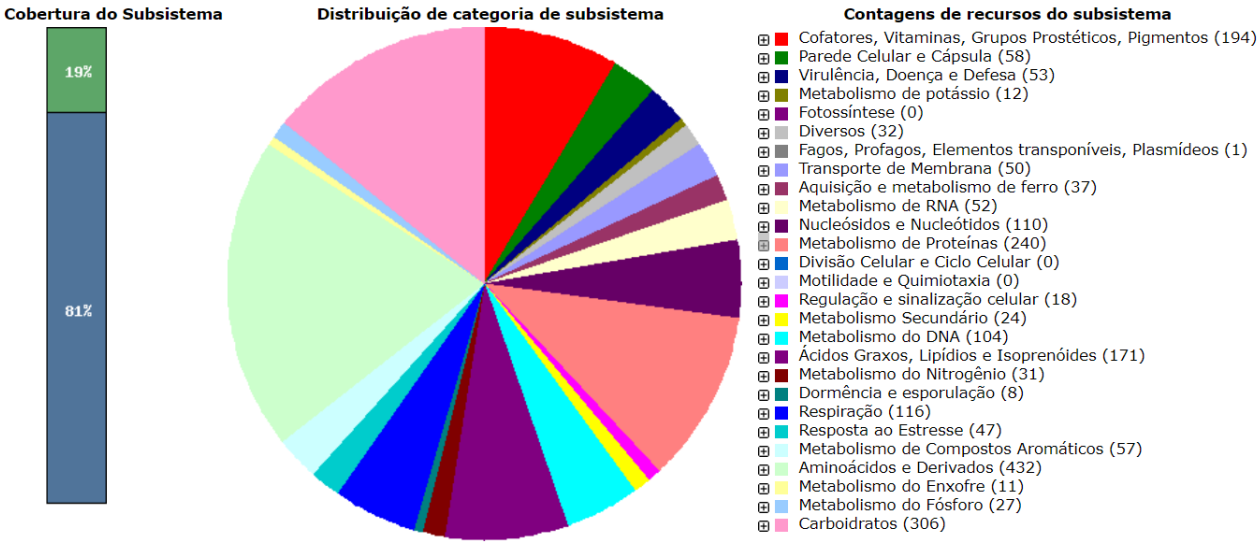

Fonte: O autor (2023).
Nota: A anotação proposta pelo RAST apresenta a diversidade genética e a classifica os CDS's em subsistemas de acordo com o grupo funcional. As categorias são expansíveis até o gene específico e os 23 subsistemas mais abundantes são representados por uma cor específica indicada na coluna da direita e com sua respectiva contagem.

O genoma da linhagem SOL-159 apresentou a previsão de 7.787 sequências codificadoras. Dentre essas, 6.380 CDS's (81 %) foram classificados como "*not in subsystem*", ou seja, não foram associados a nenhum subsistema funcional específico. Por outro lado, 1.407 CDS's (19 %) foram classificados como "*in subsystem*", indicando que foram associados a subsistemas funcionais específicos. Adicionalmente, foram identificados 78 genes de RNA's (Tabela 4 e Figura 10).

As sequências codificadoras mais representativas do genoma da linhagem SOL-159 foram classificadas em diversas categorias funcionais, incluindo aminoácidos e derivados (432), carboidratos (306), metabolismo de proteínas (240), cofatores, vitaminas, grupos prostéticos e pigmentos (194), ácidos graxos, lipídios e isoprenóides (171).

Além disso, dos 6.380 genes codificadores identificados, 29 foram associados à degradação proteica, 37 à aquisição e metabolismo de ferro, sendo 26 deles relacionados a sideróforos. Identificou-se também 24 genes relacionados ao metabolismo secundário, incluindo 7 envolvidos na síntese de tiazol/oxazol, e 10 genes de lantionina sintetases. Adicionalmente, foram encontrados 31 genes associados ao metabolismo do nitrogênio, 47 genes associados à resposta ao estresse, com 7 desses genes envolvidos em respostas osmóticas, 14 em respostas oxidativas e 24 sem subcategorias específicas. Foram identificados também 11 genes relacionados ao metabolismo do enxofre, 27 genes relacionados ao metabolismo do fósforo e 53 genes associados à virulência, doença e defesa.

**Figura 10 -** Anotação funcional do isolado SOL-159




Fonte: O autor (2023).
Nota: A anotação proposta pelo RAST apresenta a diversidade genética e a classifica os CDS's em subsistemas de acordo com o grupo funcional. As categorias são expansíveis até o gene específico e os 24 subsistemas mais abundantes são representados por uma cor específica indicada na coluna da direita e com sua respectiva contagem.

A anotação funcional das categorias dos subsistemas mais representativos em todos os isolados apresentou majoritariamente os mesmos grupos funcionais. Os principais foram os aminoácidos e derivados, carboidratos, metabolismo de proteínas, cofatores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos, ácidos graxos, lipídios e isoprenóides, respectivamente nessa ordem, variando apenas na quantidade de genes entre os isolados.

A classificação funcional dos genes codificadores oferece *insights* significativos sobre as principais vias metabólicas e processos biológicos presentes no genoma dos

isolados estudados. Esses resultados são de extrema importância para a compreensão da funcionalidade e das possíveis características adaptativas desses microrganismos. Além do mais, abre caminho para estudos mais detalhados acerca de suas características genômicas e seus potenciais para aplicações na biotecnologia, em especial, as pesquisas relacionadas à agricultura e à saúde.

É relevante ressaltar que, embora todos os isolados de *Streptomyces* apresentam genes agrupados no subsistema de "virulência, doença e defesa", é importante mencionar que esses genes estão, na verdade, relacionados à resistência a antibióticos e compostos tóxicos, e nenhum estão associados a características de virulência ou doença.

Além disso, a anotação funcional dos genomas revelou que os isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 possuem genes relacionados ao metabolismo do fósforo, enxofre e à resposta ao estresse. Esses genes são de particular importância para o desenvolvimento de plantas de interesse agrícola, uma vez que estão envolvidos em processos fundamentais para o crescimento, aumento da produtividade e para saúde das plantas.

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, desempenhando um papel fundamental em processos como a síntese de ATP (adenosina trifosfato), a transferência de energia, o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, além de estar envolvido na formação de ácidos nucléicos e fosfolipídios das membranas celulares (SOETAN, OLAIYA, OYEWOLE, 2010; PANDEY, 2018). As plantas com acesso adequado ao fósforo exibem um crescimento vigoroso, maior produção de grãos e frutos, além de apresentarem maior resistência a doenças e estresses ambientais (PANDEY, 2018).

O enxofre é outro elemento essencial para o crescimento das plantas e está presente em aminoácidos, vitaminas, coenzimas e em compostos antioxidantes importantes para o estresse oxidativo (PANDEY, 2018). O enxofre é especialmente importante na síntese de cisteína e metionina, que são aminoácidos essenciais para a formação de proteínas (KOPRIVA, MALAGOLI, TAKAHASHI, 2019; STIPANUK, 2020). Além disso, o enxofre está envolvido na síntese de fitoalexinas, que são compostos de defesa produzidos pelas plantas em resposta a infecções por patógenos (TIKU, 2020). A regulação genética do metabolismo do enxofre é fundamental para garantir que as plantas tenham acesso suficiente a esse nutriente e

possam sintetizar os compostos necessários para o seu desenvolvimento e proteção contra estresses bióticos e abióticos (KOPRIVA, MALAGOLI, TAKAHASHI, 2019).

Embora as plantas possuam mecanismos de resposta e adaptação, elas estão sujeitas a uma série de estresses ambientais, altas temperaturas, salinidade, fitopatógenos e insetos que podem afetar seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência. Os *Streptomyces* spp. podem estabelecer uma relação simbiótica benéfica com as plantas, contribuindo e potencializando a nutrição, saúde e resistência dos vegetais aos diversos tipos de estresses (WINDY, HUEY-WEN, 2020; PANG, SOLANKI, WANG, 2022).

Outro aspecto relevante é a presença, em todos os isolados, de genes relacionados ao subsistema do "metabolismo secundário", incluindo genes associados a microcinas modificadas por síntese de tiazol/oxazol (TOMM) e lantionina sintetases (exceto MPUR-31.3). Esses genes desempenham um papel importante na produção de compostos secundários, que podem ser de interesse em estudos biotecnológicos e na busca por novos produtos naturais com potenciais aplicações terapêuticas ou industriais.

Os TOMM’s, constituem um subtipo de peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-tradução (RiPPs). Essas moléculas apresentam atividade antimicrobiana e têm sido associadas a ganhos funcionais em *clusters* gênicos biossintéticos. Isso inclui benefícios como maior absorção de nutrientes e produção de compostos benéficos para simbiose. De forma notável, os TOMMs formam uma classe diversa de produtos naturais, com uma vasta gama de funções estruturais e biológicas (MELBY, NARD, MITCHELL, 2011; MELBY, LI, MITCHELL, 2014).

Dentre as funções conhecidas, destacam-se alguns exemplos, como a goadsporina, que atua como indutor do metabolismo secundário, a yersiniabactina, um sideróforo, a tiostreptona, um inibidor do ribossomo 50S, o Ritonavir, inibidor da protease do HIV-1, a trunkamida, com potencial anti-câncer, e a microcina B17, um inibidor da DNA girase. Apesar dessa diversidade de funções já conhecidas, ainda há muitos TOMMs cujas propriedades e aplicações necessitam de investigações experimentais para serem completamente compreendidas e exploradas (COLLINS, MAXWELL, 2019; KALIA, *et al*., 2022; COSTA et al., 2022). Nesse contexto, essas

moléculas bioativas possuem um grande potencial de aplicação em diversas áreas na biotecnologia, como a medicina, a agricultura e a indústria.

As lantioninas sintetases são enzimas que desempenham um papel importante na biossíntese de peptídeos contendo lantionina, um aminoácido modificado encontrado em algumas classes de peptídeos bacterianos conhecidos como lantibióticos. Os lantibióticos são RiPPs conhecidos por exibir atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de bactérias, especialmente contra as Gram-positivas, incluindo bactérias patogênicas, como, *Staphylococcus aureus* (infecções da pele, infecções do trato respiratório e infecções hospitalares - nisina e a epidermicina), *Streptococcus pneumoniae* (infecções respiratórias, incluindo pneumonia, sinusite e otite média - mutacina e a pneumocandina), *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (patógenos oportunistas que podem causar infecções graves, especialmente em ambientes hospitalares - nisina e a gallidermina) (GOTO, *et al.*, 2010; BAINDARA, NAYUDU, KORPOLE, 2019; JOSHI *et al*., 2023).

Os lantibióticos têm sido estudados e explorados como potenciais agentes terapêuticos para combater infecções bacterianas em humanos e animais. No entanto, a utilização dos lantibióticos no controle de doenças em plantas ainda carece de estudos mais aprofundados. Apesar disso, antimicrobianos têm sido empregados contra doenças em várias culturas agrícolas, como tomateiros, pimentão (para controle do cancro cítrico causado por *Xanthomonas campestris*), feijão e árvores frutíferas (para controle de manchas foliares causadas por *Pseudomonas syringae*), bem como tomateiros, batateiras e bananeiras (para controle da murcha causada por *Ralstonia solanacearum*) (MANSFIELD *et al.,* 2012).

Nesse contexto, a utilização desta molécula para controle de doenças em plantas representa uma área promissora de pesquisa que pode trazer benefícios significativos para a agricultura, auxiliando no manejo de doenças que afetam culturas agrícolas importantes.

É de suma importância destacar que a anotação permite uma compreensão cada vez mais precisa das funções gênicas do genoma bacteriano, ademais, é um procedimento complexo e em contínua evolução. Com o auxílio de ferramentas bioinformáticas, como o RAST, à medida que novas informações e dados são produzidos, as anotações podem ser revisadas e aprimoradas, resultando em uma compreensão mais aprofundada das funções genéticas e dos sistemas bacterianos.

Portanto, os resultados da anotação dos genomas dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 indicam que esses microrganismos são promissores candidatos para pesquisas futuras e na descoberta de novos compostos bioativos e novas terapias, especialmente nas áreas relacionadas à agricultura e a saúde.

### 5.5 Identificação de *clusters* gênicos biossintéticos (BGCs)

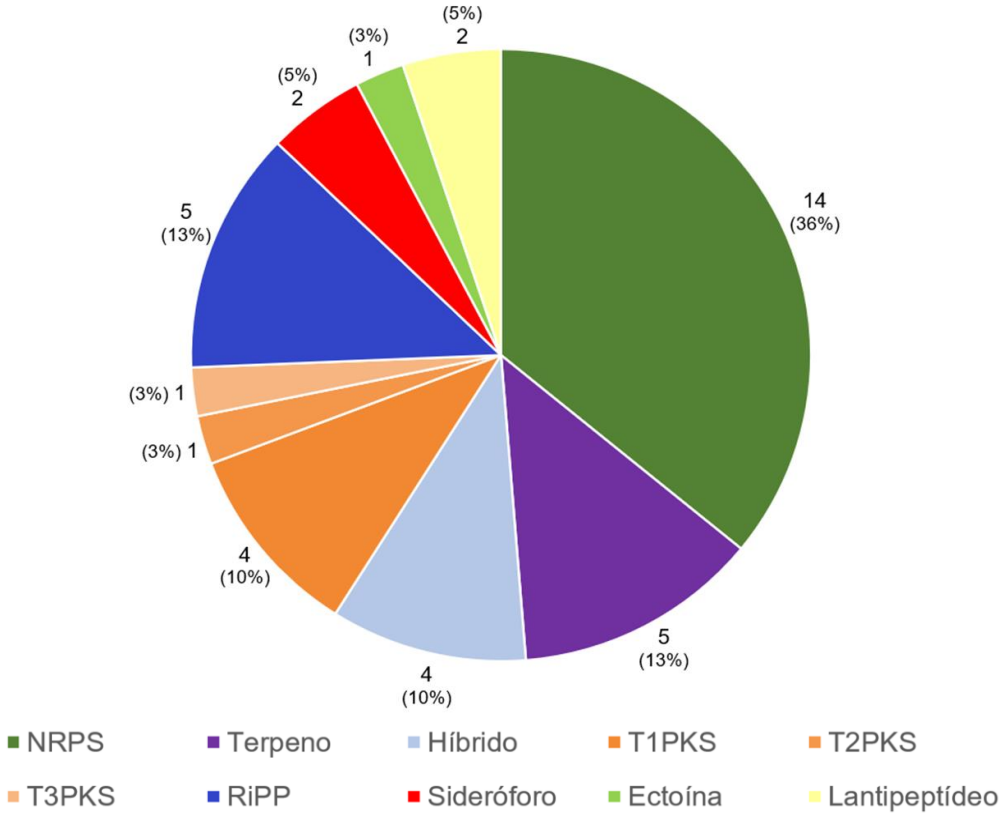
A partir da análise do genoma completo dos isolados bacterianos pela plataforma *antiSMASH* foram identificados 39 BGCs para MPUR-28.3 (Apêndice A), 55 BGCs para MPUR-31.3 (Apêndice B), 45 BGCs para MPUR-51.7 (Apêndice C) e 24 BGCs para SOL-159 (Apêndice D).

Quanto a distribuição das diferentes classes de BGCs, no isolado MPUR-28.3 foram identificados 14 *clusters* (36 %) relacionados com vias de biossíntese de NRPS, 6 PKS, sendo 4 (10 %) T1PKS, 1 (3 %) T2PKS e 1 (3 %) T3PKS, 5 (13 %) Terpeno, 4 (10 %) Híbridos, 5 (13 %) RiPP, 2 (5 %) Sideróforo, 1 (3 %) Ectoína e 2 (5 %) Lantipeptídeo (Figura 11).

Dos 39 BGCs preditos na linhagem MPUR-28.3, sete (18 %) exibiram 100 % de similaridade com BGCs caracterizados no MIBiG, sete (18 %) apresentaram similaridade moderada, 10 (26 %) tiveram baixa similaridade e 15 (38 %) não apresentaram nenhuma similaridade (Apêndice A).

Com base nos BGCs que apresentaram 100 % de similaridade foi possível indicar que o isolado MPUR-28.3 possui todos os genes para a biossíntese das seguintes moléculas: Antimicina (Figura 15), Albaflavenona (Figura 16), Desferrioxamina B (Figura 17) e Ectoína (Figura 18), Geosmina (Figura 19), SGR PTMs (Figura 20) e Naringenina (Figura 21).

**Figura 11 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem MPUR-28.3




Fonte: O autor (2023).
Nota: Híbrido refere-se a BGCs híbridos compostos por genes pertencentes a mais de uma classe de moléculas. Sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS), policetídeo sintase tipo 1 (T1PKS), policetídeo sintase tipo 2 (T2PKS), policetídeo sintase tipo 3 T3PKS, sintases de peptídeos ribossomalmente sintetizados e modificados pós-tradução (RiPP).

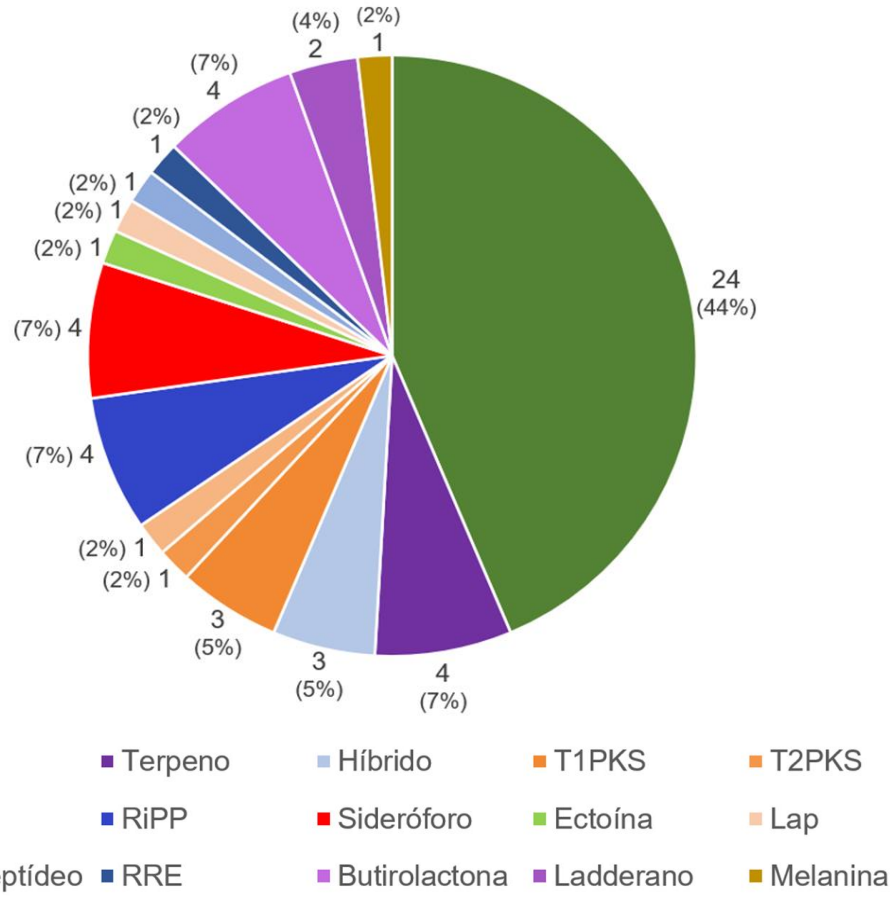
Na linhagem de *Streptomyces* MPUR-31.3 foram identificados 24 *clusters* (44 %) relacionados com vias de síntese de NRPS, 5 PKS, sendo 3 (5 %) T1PKS, 1 (2 %) T2PKS e 1 (2 %) T3PKS, 4 (7 %) RiPP, 4 (7 %) Sideróforo, 4 (7 %) Terpeno, 4 (7 %) Butirolactona, 3 (5 %) Híbridos, 2 (4 %) Ladderano, 1 (2 %) Ectoína, 1 (2 %) Lap, 1 (2 %) Lassopeptídeo, 1 (2 %) RRE e 1 (2 %) Melanina (Figura 12).

Dos 55 BGCs preditos para esse isolado, 5 (9 %) exibiram alta porcentagem de similaridade com BGCs disponíveis no banco de dados do MIBiG, 6 (11 %) apresentaram similaridade moderada, 19 (35 %) tiveram baixa similaridade e 25 (45 %) não apresentaram nenhuma similaridade (Apêndice B) com os *clusters* já descritos.

Apenas 5 *clusters* apresentaram 100 % de similaridade (Apêndice B) com BGCs já caracterizados e disponíveis no banco de dados do MIBiG. Predizendo que este isolado é geneticamente capaz de sintetizar as seguintes moléculas:

Albaflavenona (Figura 16), Ectoína (Figura 18), Geosmina (Figura 19), Polilisina (ε-Poly-L-lysine) (Figura 23) e Hidrocarboneto (1-heptadeceno) (Figura 24).

**Figura 12 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem MPUR-31.3




Fonte: O autor (2023).
Nota: Híbrido refere-se a BGCs híbridos compostos por genes pertencentes a mais de uma classe de moléculas. Sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS), policetídeo sintase tipo 1 (T1PKS), policetídeo sintase tipo 2 (T2PKS), policetídeo sintase tipo 3 T3PKS, sintases de peptídeos ribossomalmente sintetizados e modificados pós-tradução (RiPP), *Cluster* contendo elemento RRE, peptídeo linear contendo azol ou azolina (Lap).

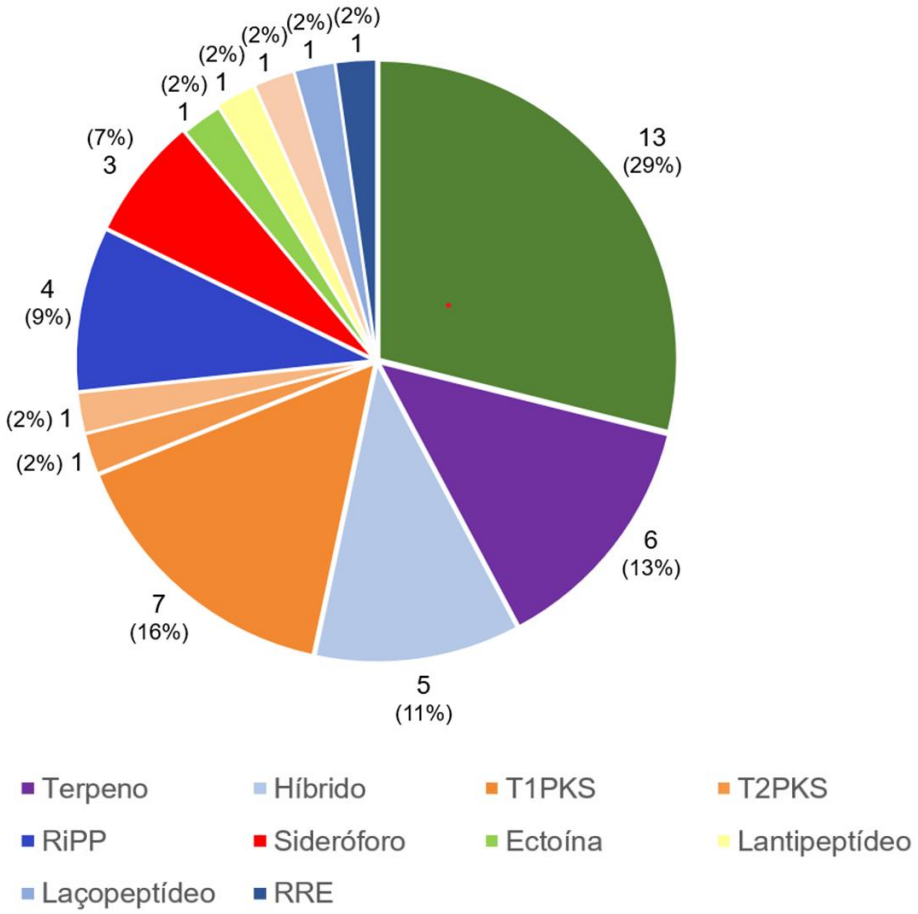
Na linhagem de *Streptomyces* MPUR-51.7 foram identificados 13 *clusters* (29 %) relacionados com vias de síntese de NRPS, 9 PKS, sendo 7 (16 %) T1PKS, 1 (2 %) T2PKS e 1 (2 %) T3PKS, 6 (13 %) Terpeno, 5 (11 %) Híbrido, 4 (9 %) RiPP, 3 (7 %) Sideróforo, 1 (2 %) Ectoína, 1 (2 %) Lantipeptídeo, 1 (2 %) Lap, 1 (2 %) Lassopeptídeo e 1 (2%) RRE (Figura 13).

Dos 45 BGCs preditos no *Streptomyces* MPUR-51.7, 11 (24 %) exibiram alta porcentagem de similaridade com BGCs disponíveis no banco de dados do MIBiG, 6 (13 %) apresentaram similaridade moderada, 9 (20 %) tiveram baixa similaridade e 19

(42 %) não apresentaram nenhuma similaridade (Apêndice C) com os *clusters* já descritos.

Apenas 6 *clusters* apresentaram 100 % de similaridade (Apêndice C) com BGCs já caracterizados e disponíveis no banco de dados do MIBiG, predizendo assim, que este isolado é geneticamente capaz de sintetizar as seguintes moléculas: Antimicina (Figura 15), Albaflavenona (Figura 16), Ectoína (Figura 18), Geosmina (Figura 19), SGR PTMs / SGR PTM Composto b / SGR PTM Composto c / SGR PTM Composto d (Figura 20) e Naringenina (Figura 21).

**Figura 13 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem MPUR-51.7



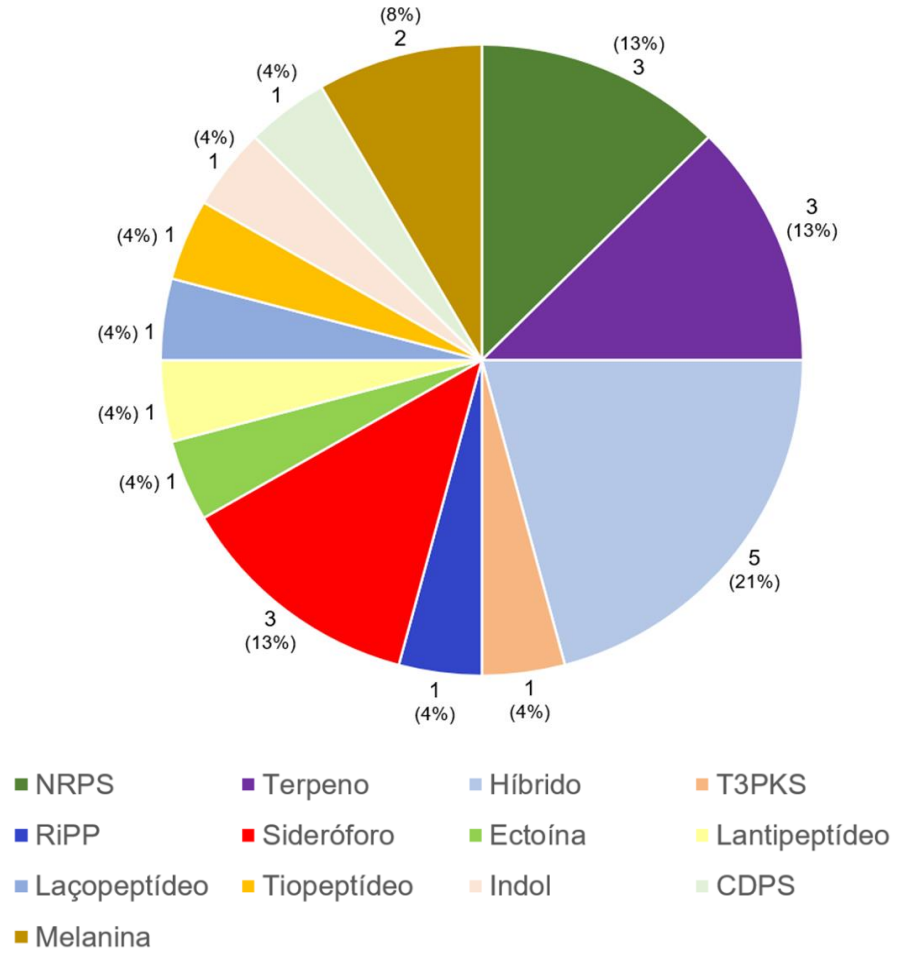

Fonte: O autor (2023).
Nota: Híbrido refere-se a BGCs híbridos compostos por genes pertencentes a mais de uma classe de moléculas. Sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS), policetídeo sintase tipo 1 (T1PKS), policetídeo sintase tipo 2 (T2PKS), policetídeo sintase tipo 3 T3PKS, sintases de peptídeos ribossomalmente sintetizados e modificados pós-tradução (RiPP), *Cluster* contendo elemento RRE, peptídeo linear contendo azol ou azolina (Lap).

Quanto a distribuição das diferentes classes de BGCs, no isolado SOL-159 foram identificados 3 *clusters* (13 %) relacionados com vias de síntese de NRPS, 1 (4 %)

PKS, sendo apenas uma T3PKS, 3 (13 %) Terpeno, 5 (21 %) Híbridos, 1 (4 %) RiPP, 3 (13 %) Sideróforo, 1 (4 %) Ectoína, 1 (4 %) Lantipeptídeo, 1 (4 %) Lassopeptídeo, 1 (4 %) Tiopeptídeo, 1 (4 %) Indol, 1 (4 %) CDPS, 2 (8 %) Melanina (Figura 14).

Dos 24 BGCs preditos para esse isolado, 5 (21 %) exibiram alta porcentagem de similaridade com BGCs disponíveis no banco de dados do MIBiG, destes 3 *clusters* apresentaram 100 % de similaridade (Apêndice D). Predizendo que este isolado é geneticamente capaz de sintetizar as seguintes moléculas: Desferrioxamina B (Figura 17), Citrulassina D (Figura 22), e Malacidina A - Malacidina B (Figura 25). Já os demais BGCs 5 (21%) apresentaram similaridade moderada, 13 (54%) tiveram baixa similaridade e 1 (4%) não apresentou nenhuma similaridade (Apêndice D).

**Figura 14 -** Distribuição das classes de BGCs preditos no genoma da linhagem SOL-159




Fonte: O autor (2023).
Nota: Híbrido refere-se a BGCs híbridos compostos por genes pertencentes a mais de uma classe de moléculas. Sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS), policetídeo sintase tipo 3 T3PKS, sintases de peptídeos ribossomalmente sintetizados e modificados pós-tradução (RiPP), ciclodipeptídeos sintases dependentes de RNAt (CDPS).

Os BGCs que não apresentaram nenhuma similaridade com os *clusters* disponíveis no banco de dados MIBiG, podem indicar que os genomas dos *Streptomyces* spp. estudados estão relacionados com a biossíntese de novos produtos naturais ou estão relacionados com moléculas já conhecidas quimicamente, mas que não possuem vias de biossíntese elucidadas até o momento.

*Clusters* gênicos biossintéticos que codificam novos produtos bioativos são de grande importância industrial, ambiental e agrícola, e com base na alta similaridade de alguns *clusters* com ortólogos disponíveis em bancos de dados podemos predizer diversas biomoléculas (ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, *et al.,* 2015; KHUSHBOO *et al.*, 2022). Contudo, em condições de laboratório, a maioria dos BGCs podem estar silenciadas ou não são expressas devido à ausência das condições mínimas necessárias, seja nutricional, fisiológicos ou em resposta a elicitores (MANTECA, YAGÜE, 2019; ALAM *et al.*, 2022).

Nesse contexto, os diversos BGCs identificados nos genomas dos isolados podem ser uma fonte para prospecção de novos produtos naturais. Além disso, os *clusters* que possuem atividade antifúngica reportada na literatura, podem estar envolvidos na atividade antagonista dos isolados em análises *in vitro.* Deste modo, os BGCs fornecem informações valiosas sobre o potencial dessas linhagens para o biocontrole.

### 5.5.1 Atividade biológica de moléculas relacionadas a BGC's identificados por mineração direta

A atividade biológica das moléculas relacionadas aos BGCs identificados por mineração direta nos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 são diversificadas. Os BGCs preditos com 100% de similaridade com moléculas disponíveis no banco de dados são responsáveis pela biossíntese de Antimicina, Albaflavona, Desferrioxamina B, Ectoína, Geosmina, SGR PTMS (compostos b, c e d), Naringenina, Citrulassina D, Polilisina, hidrocarboneto 1-heptadeceno e Malacidina A e B.

O BGC relacionado à biossíntese de Antimicina foi identificado nas linhagens MPUR-28.3 e MPUR-51.7. Os primeiros estudos com o antibiótico *antimycin* (ANT) datam de 1960 (TAPPEL, 1960). No entanto, o agrupamento de genes que codifica a biossíntese da Antimicina foi descoberto apenas em 2011, onde revelou uma ampla

família de produtos naturais com 44 compostos distintos. Este antibiótico é sintetizado principalmente por microrganismos do gênero de *Streptomyces*. (YAN *et al*., 2012; JOYNT, SEIPKE, 2018; WENHAO *et al.,* 2022). A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Antimicina foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 15).

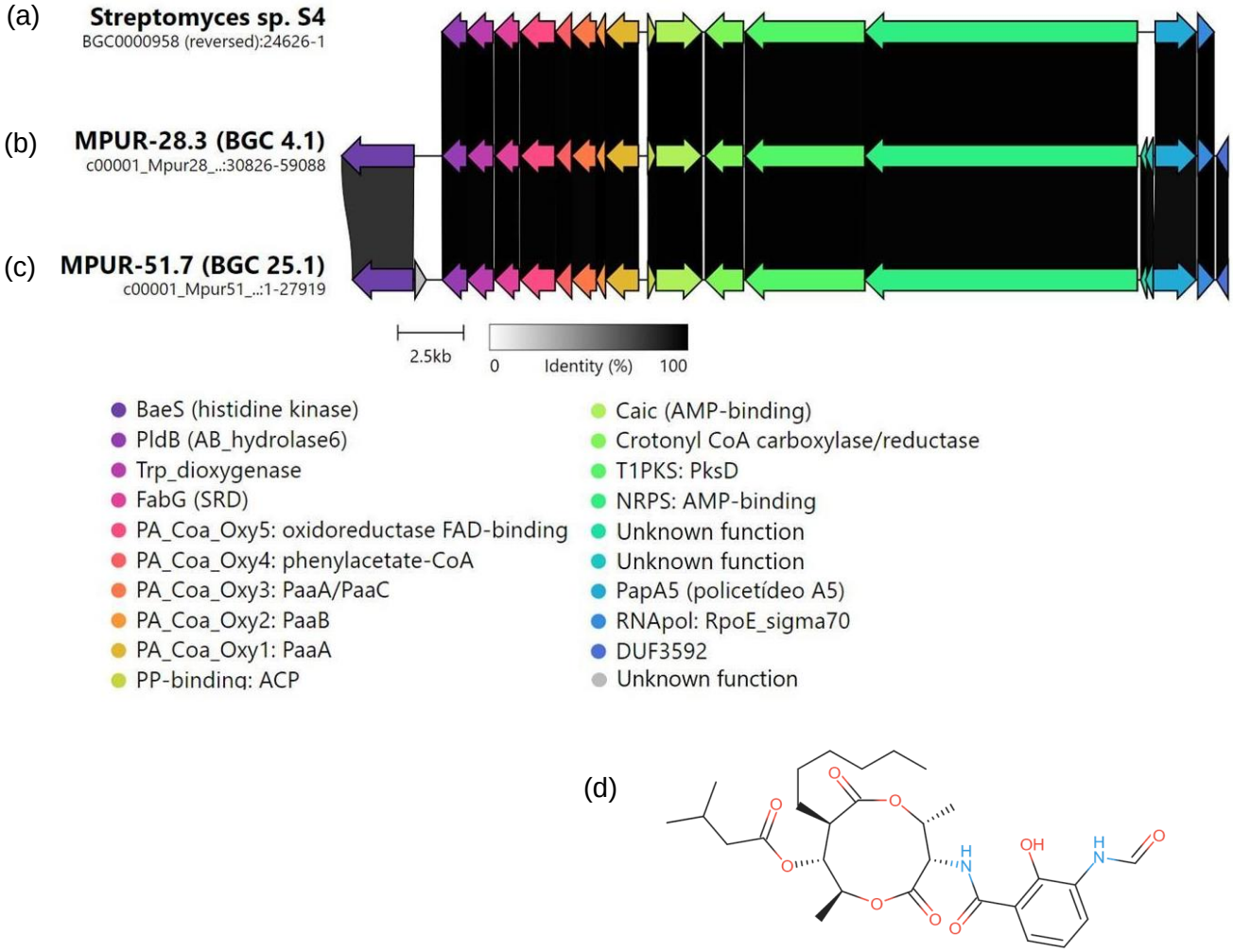
A molécula é sintetizada a partir de linhas de montagem híbridas das classes NRPS e PKS. São caracterizadas por um núcleo de dilactona de 9 membros, com variações em C7 e C8, que é conectado por uma ligação amida a uma porção de ácido 3-formamidosalicílico (JOYNT, SEIPKE, 2018; BECERRIL, *et al*., 2018; BILYK *et al.*, 2020).

A Antimicina A tem como modo de ação a inibição do citocromo C redutase na cadeia de transporte de elétrons, assim interrompe a respiração mitocondrial e esgota os níveis celulares de ATP. Ela é amplamente utilizada como piscicida na indústria de criação de bagres e possui potente atividade contra insetos, ácaros, nematóides, fungo e fitopatógenos (JOYNT, SEIPKE, 2018).

Através de análise metabolômica e genômica, Li *et al.,* (2022) identificaram no isolado *Streptomyces* NBU3104 oito novos análogos de Antimicina, os quais exibiram excelentes atividades inibitórias contra os fungos fitopatogênicos *Candida albicans, Penicillium expansum, Penicillium citrinum e Botrytis cinerea*.

Diversos estudos revelam que a Antimicina age como um inibidor potente e seletivo das proteínas antiapoptóticas mitocondriais Bcl-2 e Bcl-xL as quais são super produzida em células cancerígenas que são resistentes a agentes quimioterápicos indutores de apoptose, podendo também ser usada em combinação com quimioterápicos existentes. (TZUNG *et al*., 2001; JOYNT, SEIPKE, 2018; WENHAO *et al*., 2022).

**Figura 15 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Antimicina A



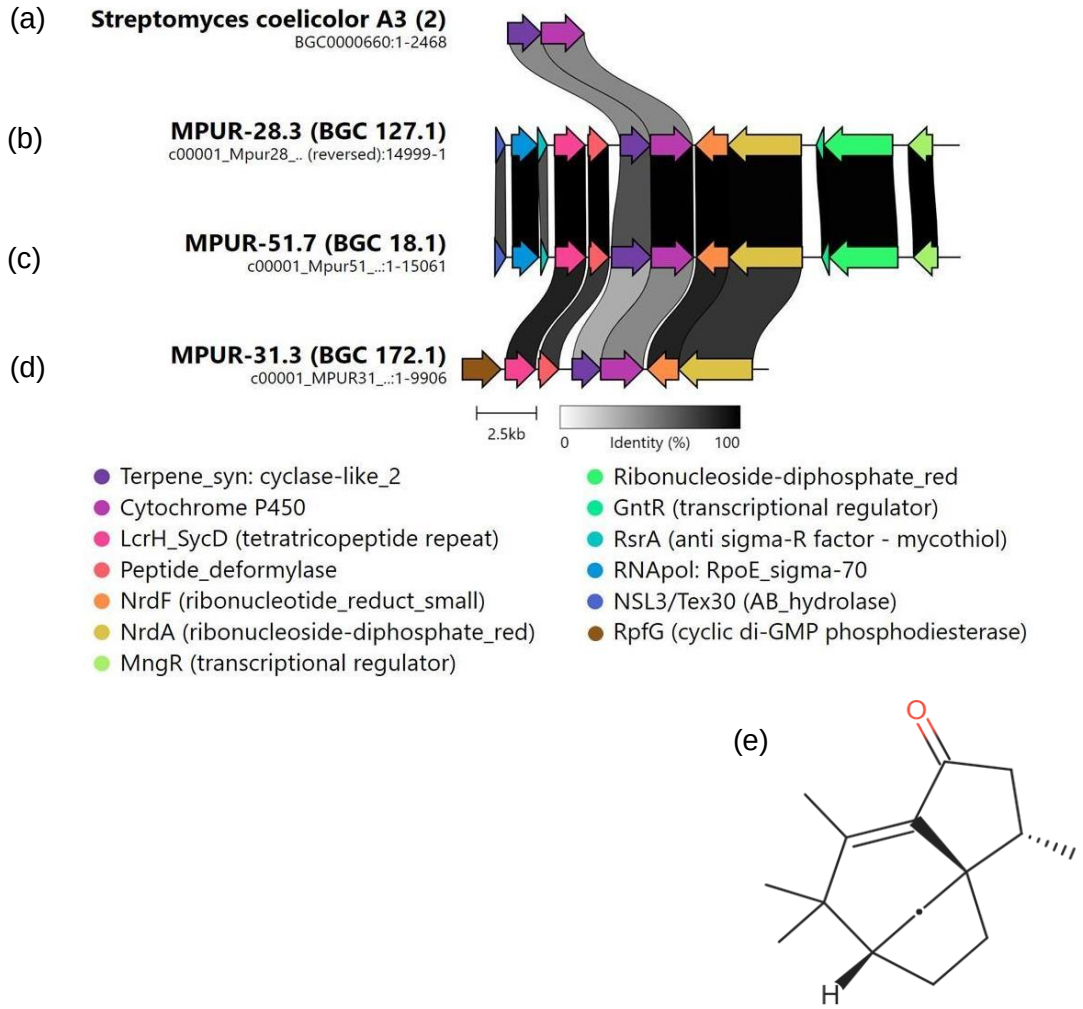

Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Antimicina A. (a) *Streptomyces* sp. S4 (BGC0000958). (b) MPUR-28.3 (BGC 4.1). (c) MPUR-51.7 (BGC 25.1). (d) Biomolécula de Antimicina A (fórmula molecular: $C_{28}H_{40}N_2O_9$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

O BGC relacionado à biossíntese de Albaflavona foi identificado nas linhagens MPUR-28.3, MPUR-31.3 e MPUR-51.7. Esta molécula é um antibiótico sesquiterpênico tricíclico, biossintetizado por diversas espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* (MOODY *et al.*, 2012), tal como, *S. coelicolor* (ČIHÁK *et al.,* 2017), *Streptomyces sp. Strain BSE7F* (HANDAYANI *et al.,* 2018), *S. seoulensis* (SHIN *et al.,* 2020). A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Albaflavona foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 16).

Segundo Dewick (2002) e Kelly, Kelly (2013), às vias biossintéticas para muitos antibióticos em bactérias são frequentemente associadas à presença de citocromo P450 (P450), o qual foi identificado na Albaflavona. Ademais, essas enzimas biotecnologicamente valiosas desempenham um papel importante no metabolismo de drogas e na biossíntese de esteróides, lipídios, vitaminas, antibióticos e outros metabólitos secundários naturais.

Zhang et al. (2016), avaliou a atividade citotóxica de dois compostos terpenóides contra quatro linhagens de células tumorais humanas e mesmo que em baixas concentrações, os compostos mostraram citotoxicidade contra as linhagens HCT116 e HepG2 de células tumorais humanas.

**Figura 16 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Albaflavona




Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Albaflavona. (a) *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (BGC0000660). (b) MPUR-28.3 (BGC 127.1). (c)

MPUR-51.7 (BGC 18.1). (d) MPUR-31.3 (BGC 172.1). (e) Biomolécula de Albaflavona (fórmula molecular: $C_{15}H_{22}O_1$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

O BGC relacionado à biossíntese de Desferrioxamina B foi identificado nas linhagens MPUR-28.3 e SOL-159. A Desferrioxamina B é um importante produto natural pertencente a uma ampla família de desferrioxaminas. É um sideróforo hidroxamato não peptídico e atuam no transporte de ferro. Os principais gêneros responsáveis pela síntese desses compostos são os *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora* (KEBERLE, 1964; SCHUPP *et al*., 1987; ARULPRAKASAM E DHARUMADURAI, 2021).

A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Desferrioxamina B foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 17).

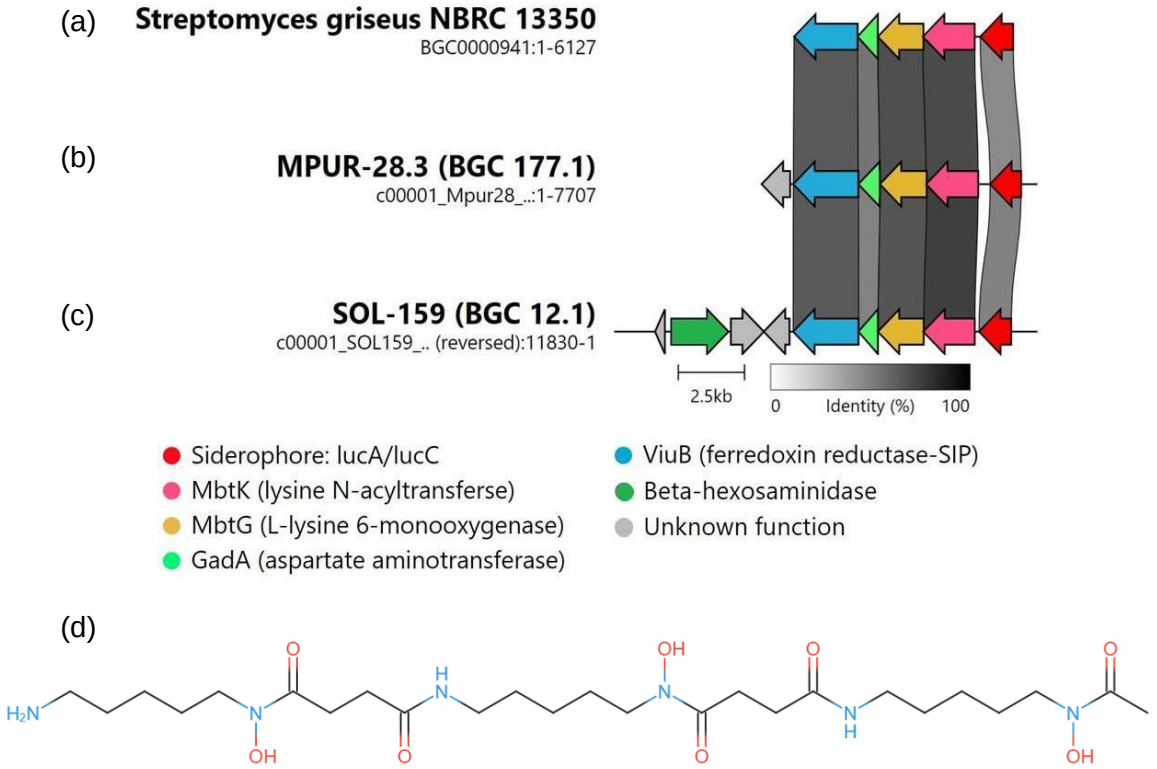
Challis (2014), analisou a sequência do genoma do *S. coelicolor A3* e propôs que um grupo de quatro genes (sco2782–sco2785) direcionam a biossíntese da Desferrioxamina B. Conclui-se que as desferrioxaminas funcionam como sideróforos em *S. coelicolor* e para ocorrer a biossíntese da biomolécula, primeiramente deve ocorrer a descarboxilação da L-lisina.

Chouyia, Ventorino e Pepe (2022) relataram diversos isolados de S*treptomyces* como produtores de sideróforos, incluindo a Desferrioxamina B. Os estudos conduzidos em casa de vegetação demonstraram que esses microrganismos, quando inoculados no vegetal, promovem significativamente o crescimento de plantas de arroz e feijão. Portanto, são extremamente importantes para a agricultura e podem ser aplicados como biofertilizante potencialmente seguro e ambientalmente correto para a agricultura.

A Desferrioxamina B também pode ser utilizada para o tratamento da sobrecarga de ferro em humanos. Essa biomolécula comercializada como Desferal, tem sido usada clinicamente para o tratamento de patologias em várias condições, como sobrecarga de ferro transfusional em pacientes com talassemia ou anemias sideroblásticas. Além disto, considerável atenção tem sido dedicada à importância nutricional, regulação genética, fator de virulência e função de absorção dessas moléculas. Ademais, compreender esses processos pode facilitar o desenvolvimento

de potenciais novas biomoléculas, tais como agentes antibacterianos (BARONA-GÓMEZ *et al*. 2004; CHIANI *et al.* 2010).

**Figura 17 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Desferrioxamina B




Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Desferrioxamina B. (a) *Streptomyces griseus* NBCR 13350 (BGC0000941). (b) MPUR-28.3 (BGC 177.1). (c) SOL-159 (BGC 12.1). (d) Biomolécula de Desferrioxamina B (fórmula molecular: $C_{25}H_{48}N_6O_8$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

O BGC relacionado à biossíntese de Ectoína foi identificado nas linhagens MPUR-28.3, MPUR-31.3 e MPUR-51.7. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Ectoína foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 18). A biossíntese de ectoína ocorre a partir do aspartato e é realizada por catálise sequencial das enzimas (ONO *et al.,* 1999).

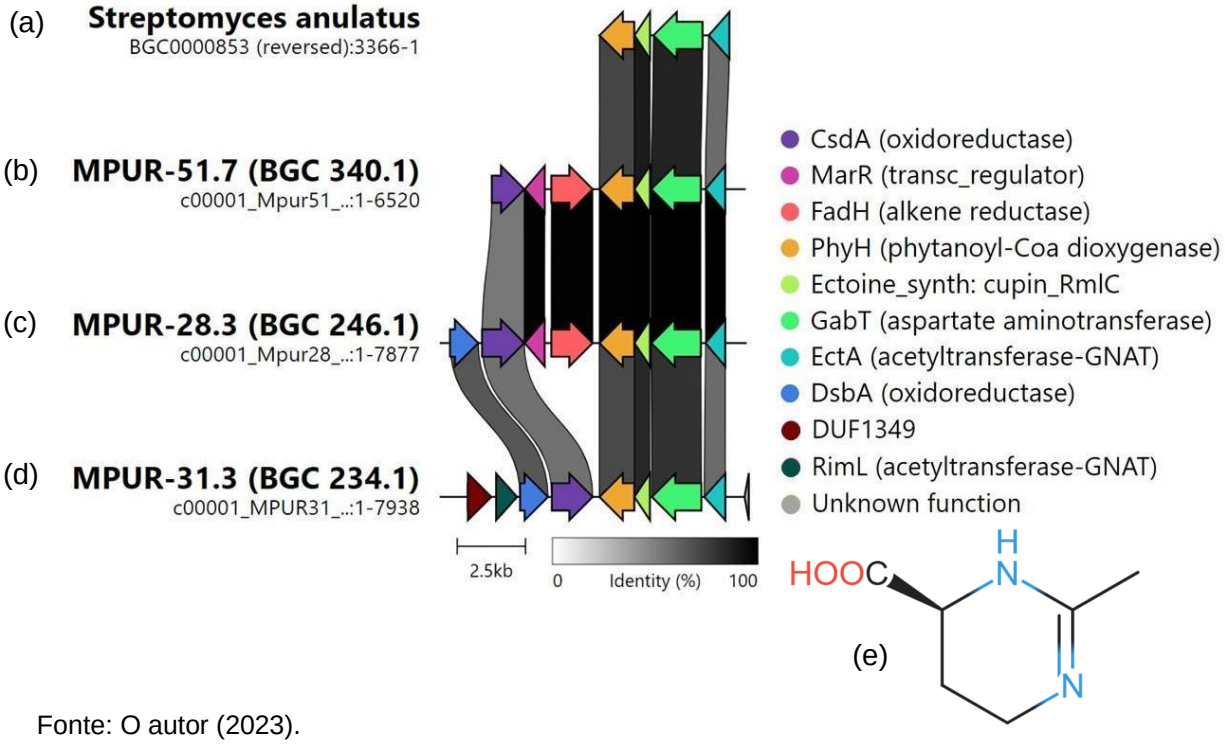
Moléculas da classe das ectoína, são capazes de proteger enzimas, membranas e células inteiras contra estresses hiperosmótico causados por exposição ao sal, aquecimento, congelamento e dessecação. Também é usada como hidratante em cosméticos e produtos para cuidados com a pele (LIPPERT, GALINSKI, 1992; MOTITSCHKE *et al.*, 2000).

O derivado hidroxilado da ectoína, o hidroxiectoína, atua como um agente protetor de proteínas e enzimas sensíveis que, em diferentes aplicações, tal como, na estabilização enzimática da desidrogenase láctica e fosfofrutoquinase, possui propriedades superiores às da ectoína. Além disso, possuem atividade termoestabilizante enzimática para proteção contra aquecimento, congelamento e secagem celular. (CÁNOVAS *et al.*, 1989; LIPPERT, GALINSKI, 1992; PRABHU *et al.*, 2004).

A ectoína tornou-se um produto importante e de alta demanda devido às diversas aplicações biotecnológicas. Sheikhpour *et al.* (2019) realizou um estudo *in vitro* apoptótico em células de câncer de pulmão que obtiveram pela primeira vez que tanto a ectoína e hidroxiectoína inibiram o rápido e irregular crescimento das células cancerígenas.

Liu *et al.* (2021) demonstrou a importância da a ectoína e a hidroxiectoína para indústria biotecnológica. Essas moléculas são excelentes estabilizadores biofuncionais, protetores cutâneos e potenciais fármacos para doenças, como Alzheimer e rinoconjuntivite.

**Figura 18 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Ectoína




Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Ectoína. (a) *Streptomyces anulatus* (BGC0000853). (b) MPUR-51.7 (BGC 340.1). (c) MPUR-28.3 (BGC 246.1). (d) MPUR-31.3 (BGC 234.1). (e) Biomolécula de Ectoína (fórmula molecular: $C_6H_{10}N_2O_2$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes

na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

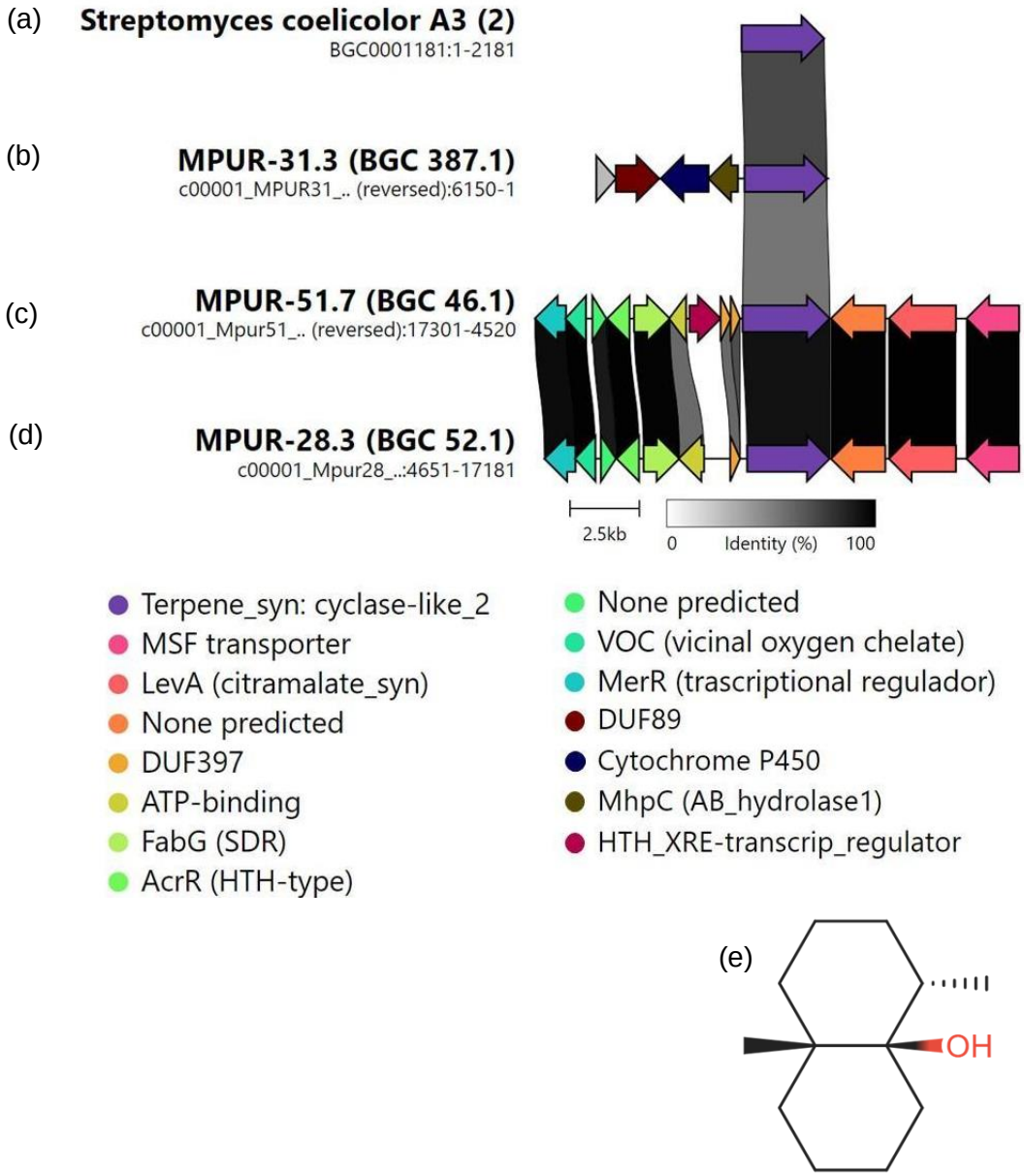
O BGC relacionado à biossíntese de Geosmina foi identificado nas linhagens MPUR-28.3, MPUR-31.3 e MPUR-51.7. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Geosmina foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 19).

O terpeno geosmina, descoberto em 1965, é um metabólito volátil responsável pelo cheiro característico do solo úmido, da terra recém-arada. Também é responsável pelos sabores desagradáveis na água potável e nos alimentos (GERBEREH, LECHEVALIER, 1965; JIANG *et al.*, 2007).

A geosmina é produzida por vários microrganismos, incluindo a maioria dos isolados de *Streptomyces*, algumas espécies de cianobactérias e fungos. A detecção e eliminação deste metabólito é de considerável importância econômica devido à sua associação com mofo ou sabores indesejados na água potável, vinho, peixe entre outros alimentos (GERBEREH, LECHEVALIER, 1965; LA-GUERCHE *et al.,* 2005).

Garbeva *et al*., (2023), realizaram uma revisão sobre as aplicações da geosmina e demonstraram que devido sua ampla distribuição nos microrganismos, sugere que este composto tem uma importante função ecológica. As funções incluem sinalização (atrativo ou repelente) ou como um metabólito especializado protetor contra estresses (bióticos ou abióticos). Ademais, também pode fornecer informações sobre a disponibilidade de água para as plantas. No entanto, para a agricultura, até o momento, não há nenhum estudo que tenha explorado o efeito da geosmina no desenvolvimento das plantas e das raízes.

**Figura 19 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Geosmina




Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Geosmina. (a) *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (BGC0001181). (b) MPUR-31.3 (BGC 387.1). (c) MPUR-51.7 (BGC 46.1). (d) MPUR-28.3 (BGC 52.1). (e) Biomolécula de Geosmina (fórmula molecular: $C_{12}H_{22}O_1$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

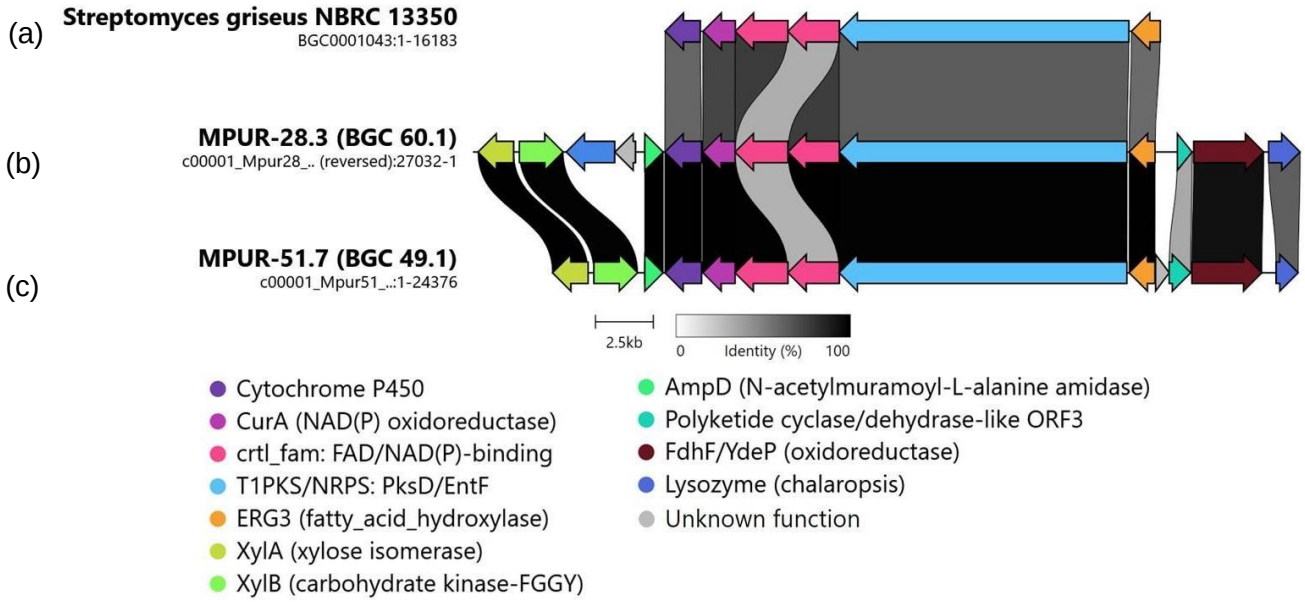
Os BGC's relacionados à biossíntese de SGR PTMs/SGR PTM (Tetramato Policíclico Macrolactâmicos - PTMs) Composto b, Composto c e Composto d foram identificados nas linhagens MPUR-28.3 e MPUR-51.7. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo do Tetramato Policíclico Macrolactâmicos foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 20).

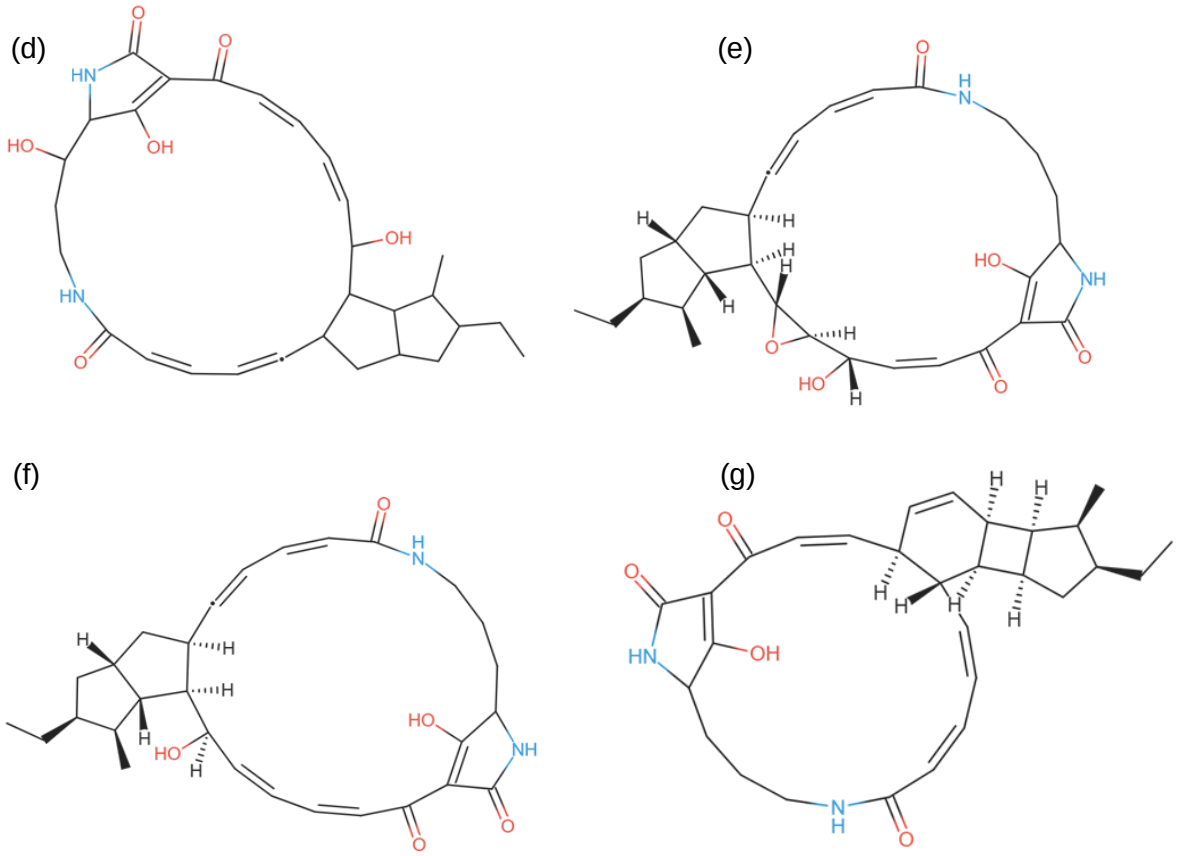
Os PTMs são derivados da origem comum de uma via híbrida de policetídeo sintase (PKS) e sintases de peptídeos não-ribossomais (NRPS) em que a porção PKS é usada iterativamente para gerar duas cadeias de policetídeos separadas. Estes produtos naturais são uma classe amplamente distribuída com mais de 30 membros já relatados. São estruturalmente complexos, pois compartilham um anel lactâmico macrocíclico contendo tetramato fundido a um subconjunto de anéis carbocíclicos (LUO *et al.,* 2013; ZHANG *et al*., 2016).

Segundo Luo *et al.* (2013) e Ding *et al.* (2021) as moléculas pertencentes a essa classe de produtos naturais exibem diversas e importantes atividades biológicas. As atividades incluem ação antibacteriana, antioxidantes, antiprotozoária e antifúngicas, específicamente, pelas moléculas de ikarugamicina, diidromaltofilina, frontalamidas e xantobacina A, todas sintetizadas por espécies de *Streptomyces.*

Complementarmente, Lacey e Rutledge (2021) avaliaram quatro compostos PTMs contra dois fitopatógenos fúngicos e linhagens celulares de mamíferos. Os compostos apresentaram atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* e *Alternaria brassicae* e citotoxicidade para linhagens de células de câncer humano, HCT116 (cólon) e K562 (leucemia mielóide).

**Figura 20 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Tetramato Policíclico Macrolactâmicos






Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Tetramato Policíclico Macrolactâmicos (PTMs). (a) *Streptomyces griseus* NBRC 13350 (BGC0001043). (b) MPUR-28.3 (BGC 60.1). (c) MPUR-51.7 (BGC 49.1). (d) Biomolécula de PTMs (fórmula molecular: $C_{29}H_{38}N_2O_6$). (e) PTMs Composto b (fórmula molecular: $C_{29}H_{38}N_2O_6$). (f) PTMs Composto c (fórmula molecular: $C_{29}H_{38}N_2O_5$). (g) PTMs Composto d (fórmula molecular: $C_{29}H_{38}N_2O_4$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

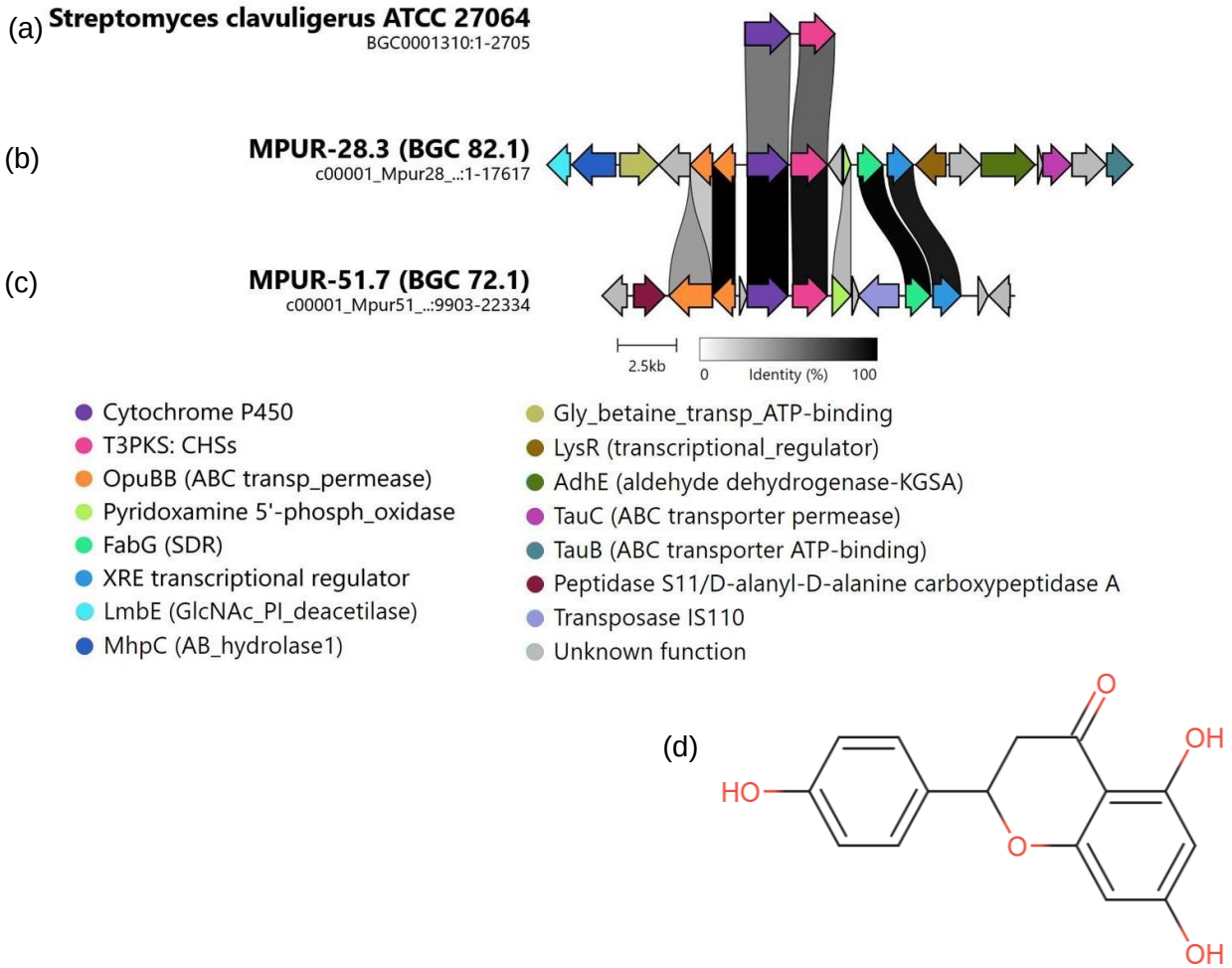
O BGC do tipo T3PKS relacionado à biossíntese de Naringenina foi identificado nas linhagens MPUR-28.3 e MPUR-51.7. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Naringenina foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 21).

A naringenina é um intermediário precursor de diferentes tipos de flavonoides. Essas substâncias possuem atividade antioxidante, atuando nas células como agente anti-inflamatório, quimioprotetor e antitumoral. Além dessa grande importância na indústria farmacêutica, também é empregado na indústria alimentícia e cosmética, sendo sintetizado naturalmente em fungos, plantas e são raros em actinomicetos, (ÁLVAREZ-ÁLVAREZ *et al.,* 2015; SHRESTHA *et al.,* 2021).

De acordo com Dung e Thuan (2021), a naringenina pode ser um medicamento promissor para reduzir os níveis plasmáticos de lipídios, lipoproteínas, colesterol total e LDL-colesterol, contribuindo positivamente para saúde de pacientes com hipertensão, dislipidemia e infarto do miocárdio.

Martin e Liras (2022) através do processo de expressão heteróloga, produziram a naringenina em leveduras. Além disso, demonstraram que novos compostos bioativos derivados da naringenina podem ser sintetizados por expressão heteróloga. Além disso, essa biomolécula também tem a função de bloquear a neoangiogênese, processo necessário para a progressão do tumor sólido e é útil no tratamento de várias infecções virais.

**Figura 21 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Naringenina




Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Naringenina. (a) *Streptomyces clavuligerus* (BGC0001310). (b) MPUR-28.3 (BGC 82.1). (c) MPUR-51.7 (BGC 72.1). (d) Biomolécula de Naringenina (fórmula molecular: $C_{15}H_{12}O_5$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

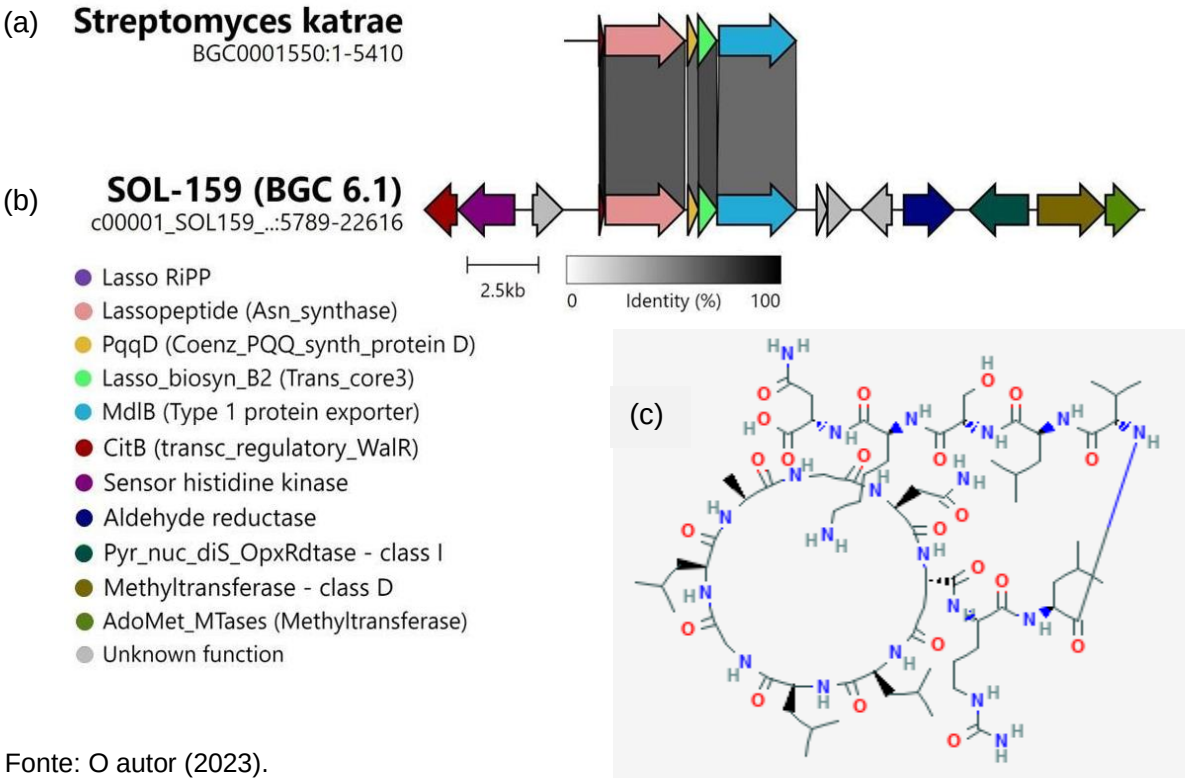
O BGC relacionado à biossíntese de Citrulassina D foi identificado apenas na linhagem SOL-159. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Citrulassina D foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 22).

A Citrulassina D é um lassopeptídeo, uma subclasse de peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-tradução (RiPPs). Pertence à família das citrulassinas, que são sintetizadas a partir do processo de Citrulinação, onde ocorre à deiminação de Arg para produzir citrulina de aminoácido não proteinogênico (Cit), catalisado pela enzima peptidil-arginina desaminase (PAD). Não havia relatos dessa biomolécula em RiPPs até que o lassopeptídeo citrulassina A foi descoberto a partir de *Streptomyces albulus* (NRRL B-3066) através da ferramenta de mineração de genoma (TIETZ *et a*l., 2017; DUAN *et al.,* 2022).

Segundo Makrygiannakis *et al.,* (2006) a citrulinação está presente em uma ampla gama de tecidos inflamatórios e anticorpos dirigidos contra peptídeos ou proteínas citrulinadas (anti-CCP) são encontrados principalmente em pacientes com artrite reumatóide (AR) e nos pacientes com artrite de início recente, a identificação desse processo é uma importante ferramenta para predizer evolução para AR, e marcador de evolução mais agressiva.

Segundo Fipke e Vidal (2016), dos aminoácidos existentes, vinte estão envolvidos diretamente na formação de proteínas e os demais são conhecidos como aminoácidos não proteinogênicos (AANP). As moléculas que os AANP estão presentes, podem possuir diferentes funções, incluindo atividade anti-herbivoria, antimicrobiana, proteção contra o estresse, sinalização celular, armazenamento de nitrogênio. Nas plantas, são capazes de liberar metabólitos que podem influenciar, tanto positivamente, como negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas vizinhas. Estudos complementares com Citrulassina D são necessários para elucidar tais atividades.

**Figura 22 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Citrulassina D




Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Citrulassina D. (a) *Streptomyces katrae* (BGC0001550). (b) SOL-159 (BGC 6.1). (c) Biomolécula de Citrulassina D (fórmula molecular: $C_{15}H_{12}O_5$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

O BGC relacionado à biossíntese de ε-Poly-L-lysine (ε-PL) ou Polilisina foi identificado apenas na linhagem MPUR-31.3. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Polilisina foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 23).

A Polilisina é um dos oito homo-poliaminoácidos naturais, é composto de 25-35 resíduos de L-lisina. O peptídeo é conectado através de uma ligação amida entre o grupo α-carboxi e o grupo ε-amino (BADAOUI-NAJJAR, KASHTANOV, CHIKINDAS *et al*., 2007; PUREV *et al*., 2020).

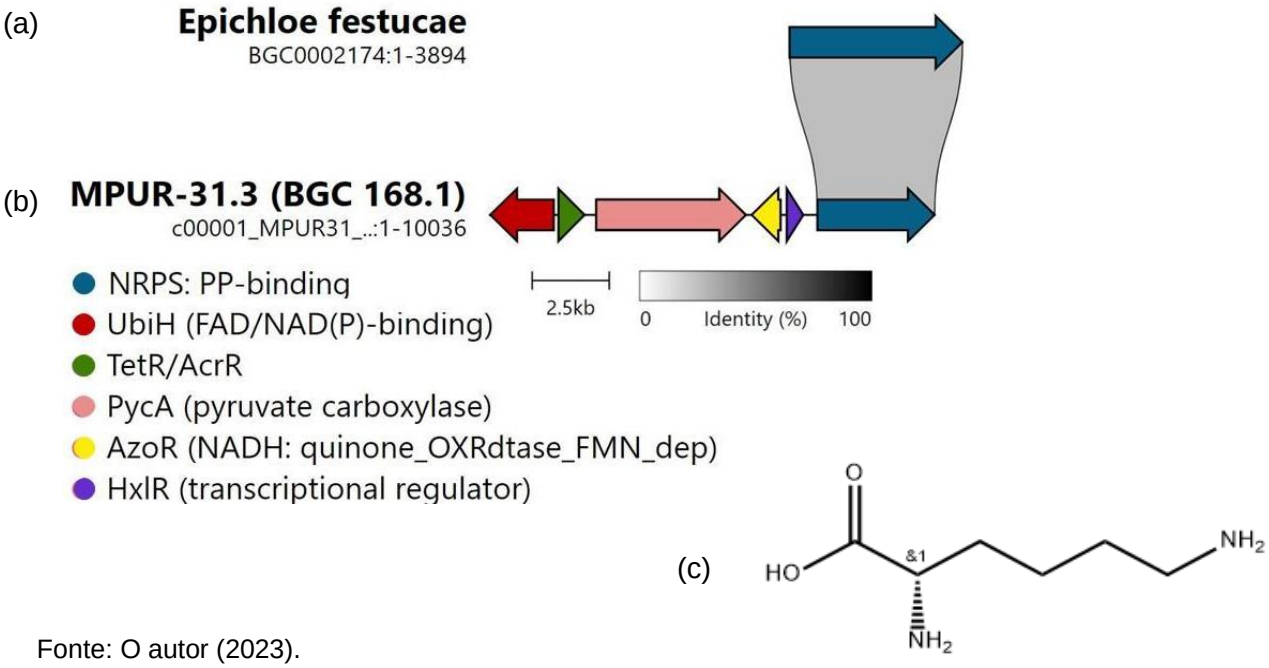
Essa biomolécula é sintetizada por diversas linhagens de *Streptomyces*, embora seja obtida principalmente *Streptomyces albulus*as. Possui atividade antibacteriana e devido à baixa toxicidade, serem solúveis em água, comestíveis, biodegradáveis e não tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente, pois se degradam em lisina sem quaisquer efeitos colaterais têm sido amplamente utilizada na biotecnologia (YOSHIDA, NAGASAWA, 2003).

Segundo Purev *et al*., (2020) e Yang *et al*., (2023) a polilisina tem atividades antimicrobianas contra um amplo espectro de bactérias, leveduras e bolores, pois inibe o crescimento dos microrganismos pela destruição da estrutura da membrana celular, causando a interrupção da transmissão de material, energia e informações das células e, por fim, levando à morte celular.

Na indústria agrícola, possui atividade contra doenças fúngicas pós-colheita, como mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), mofo azul (*Penicillium expansum)* e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em frutos de abacate, manga e mamão (BAI, *et al.*, 2022).

Na indústria alimentícia, são utilizadas como conservante natural de alimentos, incluindo refrigerantes, queijos, molhos para salada, peixes, alimentos à base de batata e pratos à base de ovos (FADLI *et al*., 2012). Além disso, seu uso na indústria farmacêutica tem inúmeras aplicações, como carreadores de fármacos, nanopartículas, inibidores de lipase, hidrogéis, materiais de revestimento, carreadores de genes, lipossomas, indutores de interferon (BANKAR, SINGHAL, 2013).

**Figura 23 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Polilisina



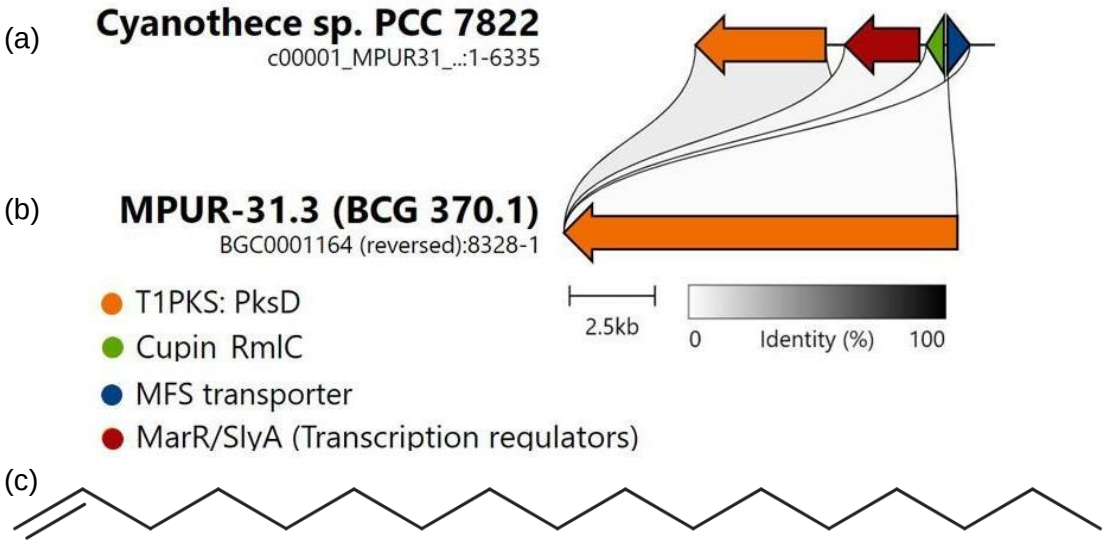

Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Polilisina. (a) *Epichloe festucae* (BGC0002174). (b) MPUR31.3 (BGC 168.1). (c) Biomolécula de Polilisina (fórmula molecular: $C_6H_{14}N_2O_2$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

O BGC da classe T1PKS relacionado à biossíntese de Hidrocarboneto 1-heptadeceno foi identificado apenas na linhagem MPUR-31.3. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo do hidrocarboneto foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 24).

Os hidrocarbonetos são produzidos a partir de ácidos graxos. Estudos descrevem a capacidade universal das cianobactérias como microrganismos com potencial de produzir esses hidrocarbonetos. Embora sejam produzidos também em algas, leveduras e bactérias, a síntese de hidrocarbonetos por bactérias pode contribuir para suprir a alta demanda por combustíveis de baixo custo, particularmente gasolina, diesel, combustível de aviação e energia elétrica. O aumento das pesquisas para a obtenção de biocombustíveis nas últimas décadas é devido aos crescentes impactos ambientais causados pelo uso dos combustíveis fósseis (HAN *et al.,* 1967; COATES *et al.,* 2014).

Porém, apesar da predição do BGC para a síntese desse hidrocarboneto, estudos complementares necessitam ser realizados para compreendermos todo o potencial desse *cluster,* em especial nas bactérias do gênero *Streptomyces*.

**Figura 24 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Hidrocarboneto 1-heptadeceno



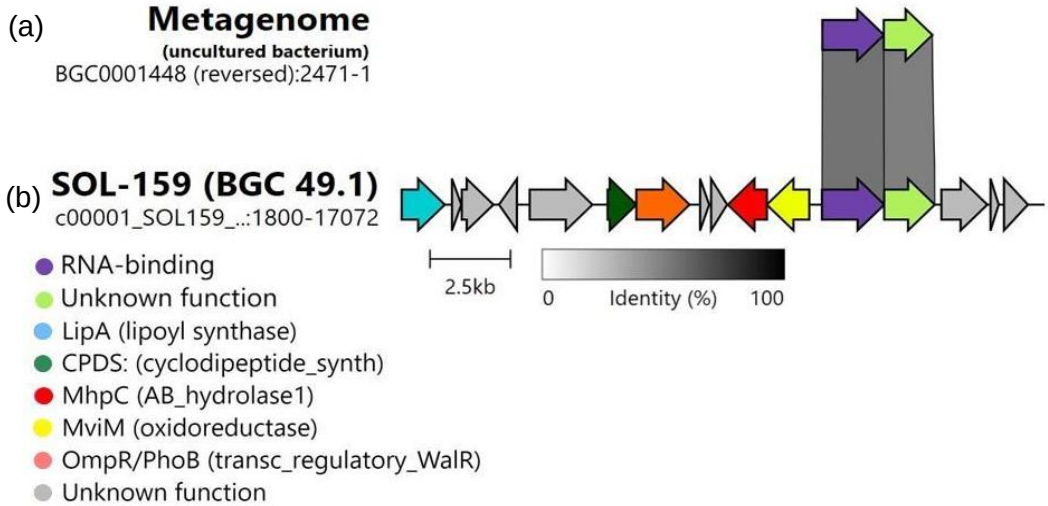

Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Hidrocarboneto 1-heptadeceno. (a) *Cynotheces* sp. (BGC0001164). (b) MPUR-32.3 (BGC 370.1). (c) Biomolécula de Naringenina (fórmula molecular: $C_{17}H_{34}$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

Os BGCs relacionados à biossíntese de Malacidina A e Malacidina B foram identificados apenas na linhagem SOL-159. A presença de genes biossintéticos responsáveis pela produção do composto bioativo da Malacidina A e Malacidina B foi confirmada por meio da análise de sintenia (Figura 25).

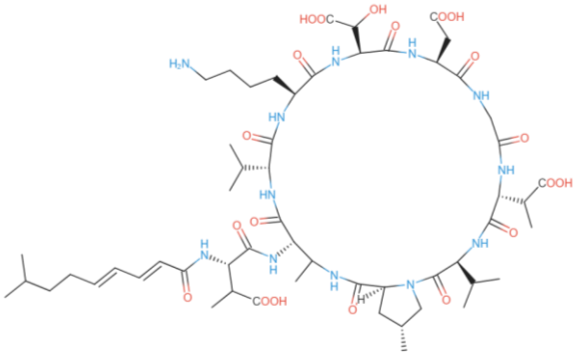
As Malacidinas A e B são produtos naturais sintetizados por bactérias. A estrutura da biomolécula é composta por lipopeptídeos macrocíclicos de 10 membros, descobertos por meio de análises dos metagenomas de amostras do solo. São estruturalmente semelhantes a outras drogas macrocíclicas, como Daptomicina e Friulimicina B, no entanto, a Malacidina A e B agem por meio dos seus próprios mecanismos distintos. Através de um mecanismo dependente do cálcio, ligam-se ao lípido II (molécula precursora da parede celular bacteriana) (HOVER *et al.,* 2018; WOOD, MARTIN, 2019). Sua ação antibacteriana é objeto de estudos, pois interrompe a síntese da parede celular, levando à morte celular de um amplo espectro em bactérias Gram-positivas (HOVER *et al*., 2018).

Segundo Li *et al*., (2020) embora este mecanismo seja semelhante ao da vancomicina, a Malacidina A e B retém sua atividade contra patógenos resistentes à vancomicina. Os patógenos suscetíveis incluem o *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE). Diferente de outros antibióticos, a Malacidina A e B também retém sua atividade na presença de surfactantes pulmonares. Ambas as biomoléculas não apresentam toxicidade observada ou efeito hemolítico em células de mamíferos em concentrações de até 100-250 µg/mL. Essa dose é mais de 100 vezes o MIC para patógenos afetados.

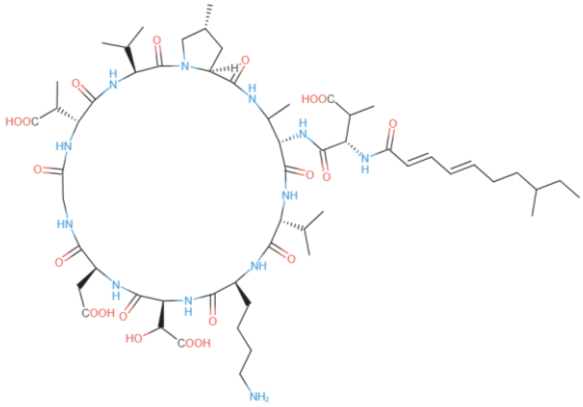
**Figura 25 -** Sintenia de genes responsáveis pela síntese de Malacidina A e B



(c)



(d)



Fonte: O autor (2023).
Nota: Análise de sintenia para identificação dos genes presentes nos BGCs responsáveis pela síntese de Malacidina A e B. (a) Metagenoma (BGC0001448). (b) SOL-159 (BGC 49.1). (c) Biomolécula de Malacidina A (fórmula molecular: $C_{56}H_{88}N_{12}O_{20}$). (d) Malacidina B (fórmula molecular: $C_{56}H_{88}N_{12}O_{20}$). As linhas paralelas e verticais indicam a similaridade entre os genes de acordo com a escala. Os genes na cor cinza, representam genes não homólogos ou com função não conhecida. Figura gerada em Clinker (https://cagecat.bioinformatics.nl/). Acesso em: julho de 2023.

A caracterização dos *clusters* e a identificação das atividades biológicas das moléculas relacionadas a BGC's preditos por mineração genômica é um processo contínuo, possibilitando a caracterização de novos *clusters* e biomoléculas mediante novos dados disponibilizados nos bancos de dados, pois existem BGC's caracterizados completamente e outros não. Nesse contexto, todos os isolados possuem BGC's não caracterizados completamente e que podem representar novas vias metabólicas ou mesmo novos compostos bioativos.

As análises de sintenia mostraram que as regiões centrais são altamente similares. Os *clusters* nos genomas minerados são conservados em seus parentes próximos de *Streptomyces* spp., permitindo propor um produto associado a esses *clusters*.

Portanto, através das análises *in silico* por meio da plataforma *antiSMASH* e Clinker é possível predizer que os isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 podem sintetizar diversas biomoléculas com amplas atividades

biotecnológicas. Destacando-se as atividades anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, as quais são de importância industrial, agrícola, ambiental, médica, veterinária e de alimentos.

### 5.6 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

Nos testes *in vitro* realizados, o isolado MUPUR-28.3 apresentou inibição contra todos os 13 fitopatógenos (Tabela 7, Figura 26), sendo que a porcentagem de inibição variou de 20,2 % a 85,2 %. A maior porcentagem de inibição foi observada contra *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (85 %), e inibição acima de 50 % foi observada para os seguintes patógenos: CPAA 609 (73 %), INPA 2910 (71,9 %), INPA 2071 (66,7 %), INPA 2908 (54 %) e Coll 2N (51,5 %).

A linhagem de *Streptomyces* MPUR-31.3 foi capaz de inibir *in vitro* 10 dos 13 fitopatógenos (Tabela 7, Figura 26), sendo a maior inibição de 90,2 % contra *Rhizoctonia sp.* INPA 2973. A inibição entre 54 e 30 % foram observadas contra INPA 2942 (54 %), CPAA Mp01 (46,2 %), INPA 2671 (42,6 %), CPAA Fdc307 (40,8 %), INPA 2910 (38,3 %), INPA 2908 (35 %), Coll 2N (33,3 %), INPA 2939 (31,5 %).

*Streptomyces* MPUR-51.7, foi capaz de inibir *in vitro* 10 dos 13 fitopatógenos avaliados (Tabela 7, Figura 26), sendo que a porcentagem de inibição variou de 0% a 65,9%. Sendo a maior inibição contra *Colletotrichum scovillei* INPA 2910 (65,9) e *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (64,2 %). Inibição entre 50 e 40 % foram observadas contra INPA 2908 (50,8 %), INPA 2973 e CPAA Fdc307 (50,4 %), Coll 2N (49,2 %), INPA 2671 (46,8 %), INPA 2942 (42,6 %), INPA 2941 (41,7 %). Não foi observado antibiose para os patógenos MCT 10621 e CPAA 609 (0 %), INPA 2943 (0,8 %).

*Streptomyces* SOL-159 foi o que inibiu o menor número de fitopatógenos, apenas 5 dos 13 testados, quando comparado com as demais linhagens (Tabela 7, Figura 26). A porcentagem de inibição variou de 0 % a 42 %, sendo as melhores porcentagens de inibição observadas contra *C. guaranicola* INPA 2939 (42 %) e *C. scovillei* INPA 2910 (31 %).

**Tabela 7 -** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de fitopatógenos de importância agrícola por linhagens de *Streptomyces*

| Fitopatógeno | MPUR-28.3 | MPUR-31.3 | MPUR-51.7 | SOL-159 |
|---|---|---|---|---|
| *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 | 85,2 % | 31,5 % | 64,2 % | 42 % |
| *Colletotrichum scovillei* INPA 2910 | 71,9 % | 38,3 % | 65,9 % | 31 % |
| *Colletotrichum siamense* Coll 2N | 51,5 % | 33,3 % | 49,2 % | 0 % |
| *Colletotrichum sp.* INPA 2973 | 41,9 % | 0,0 % | 50,4 % | 0 % |
| *Colletotrichum spaethianum* INPA 2908 | 54,8 % | 35,0 % | 50,8 % | 2 % |
| *Corynespora cassicola* INPA 2671 | 66,7 % | 42,6 % | 46,8 % | 11 % |
| *Fusarium decemcellulare* CPAA-Fdc307 | 45,0 % | 40,8 % | 50,4 % | 6 % |
| *Moniliophthora perniciosa* CPAA-MCT 10621 | 34,2 % | 0,0 % | 0,0 % | 0 % |
| *Fusarium sp.* CPAA-Mp01 | 46,7 % | 49,2 % | 50,4 % | 0 % |
| *Neopestalotiopsis formicarum* CPAA-609 | 73,3 % | 0,0 % | 0,0 % | 0 % |
| *Rhizoctonia sp.* INPA 2943 | 20,2 % | 90,2 % | 0,8 % | 0 % |
| *Rhizoctonia sp.* INPA 2942 | 38,9 % | 54,0 % | 42,6 % | 0 % |
| *Sclerotium rolfsii* INPA 2941 | 41,0 % | 24,2 % | 41,7 % | 0 % |

Fonte: O autor (2023).
Nota: INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. CPAA - Embrapa Amazônia Ocidental. % - porcentagem de inibição do crescimento micelial.

Em resumo, o melhor resultado de inibição foi do isolado MPUR-28.3 que inibiu todos os 13 fitopatógenos. Em seguida, os isolados os MPUR-31.3 e MPUR-51.7, inibiram 10 dos 13 fitopatógenos. E por fim, o isolado SOL-159, que inibiu apenas 5 dos 13 fitopatógenos, sendo que contra apenas 2 fungos foi superior a 30 %. Estes resultados podem estar correlacionados aos resultados da atividade biológica de moléculas relacionadas a BGCs identificados por mineração direta.

Na avaliação da atividade biológica de moléculas relacionadas a BGCs identificados por mineração direta, os isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3 e MPUR-51.7 apresentaram *clusters* para síntese de biomoléculas com atividade antifúngica, entre eles destacam-se as biomoléculas de Antimicina, PTMs, Polilisina. No entanto, entre os *clusters* preditos para o isolado SOL-159, foi identificada apenas a atividade antimicrobiana pela biomolécula de Malacidina A e B, a qual não está relacionada com atividade antifúngica.

A atividade antifúngica *in vitro* dos isolados pode ser potencializada através da ativação de BGCs que podem estar silenciados ou crípticos, sendo necessário a aplicação de técnicas de desbloqueio para serem expressos.

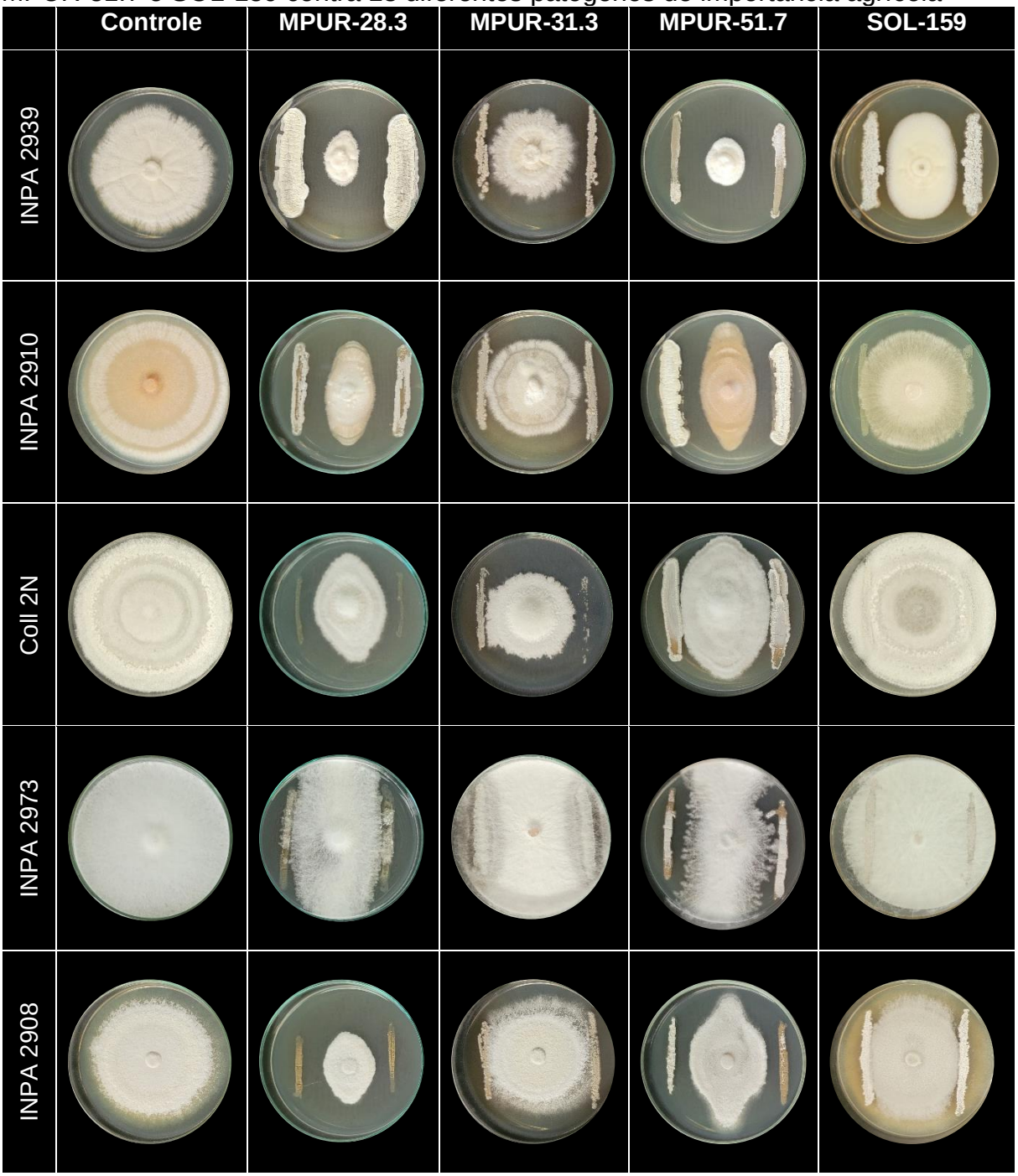
Diversos estudos demonstram que os *Streptomyces* spp. possuem atividade contra fitopatógenos. Liotti *et al,* (2019) avaliou a atividade antagonista de isolados de *Streptomyces* contra fitopatógenos. O isolado *S. griseocarneus* R132, *S. prasinopilosus* R199 e *S. acidiscabies* R403 suprimiram o crescimento micelial dos fitopatógenos *Colletotrichum guaranicola* INPA2408 (70,77 %, 57,90 %, 36,49 %), *Colletotrichum gloeosporioides* MPU99 (70,45 %, 52,23 %, 42,56 %), *Fusarium decemcellulare* FDC307 (59,44 %, 39,56 %, 22,86 %) e *Fusarium oxysporum* (57,24 %, 33,31 %, 19,73 %) respectivamente. Ademais, o isolado *S. griseocarneus* R132 promoveu o crescimento das plantas de pimenta, aumentando em 42% a massa seca da parte aérea.

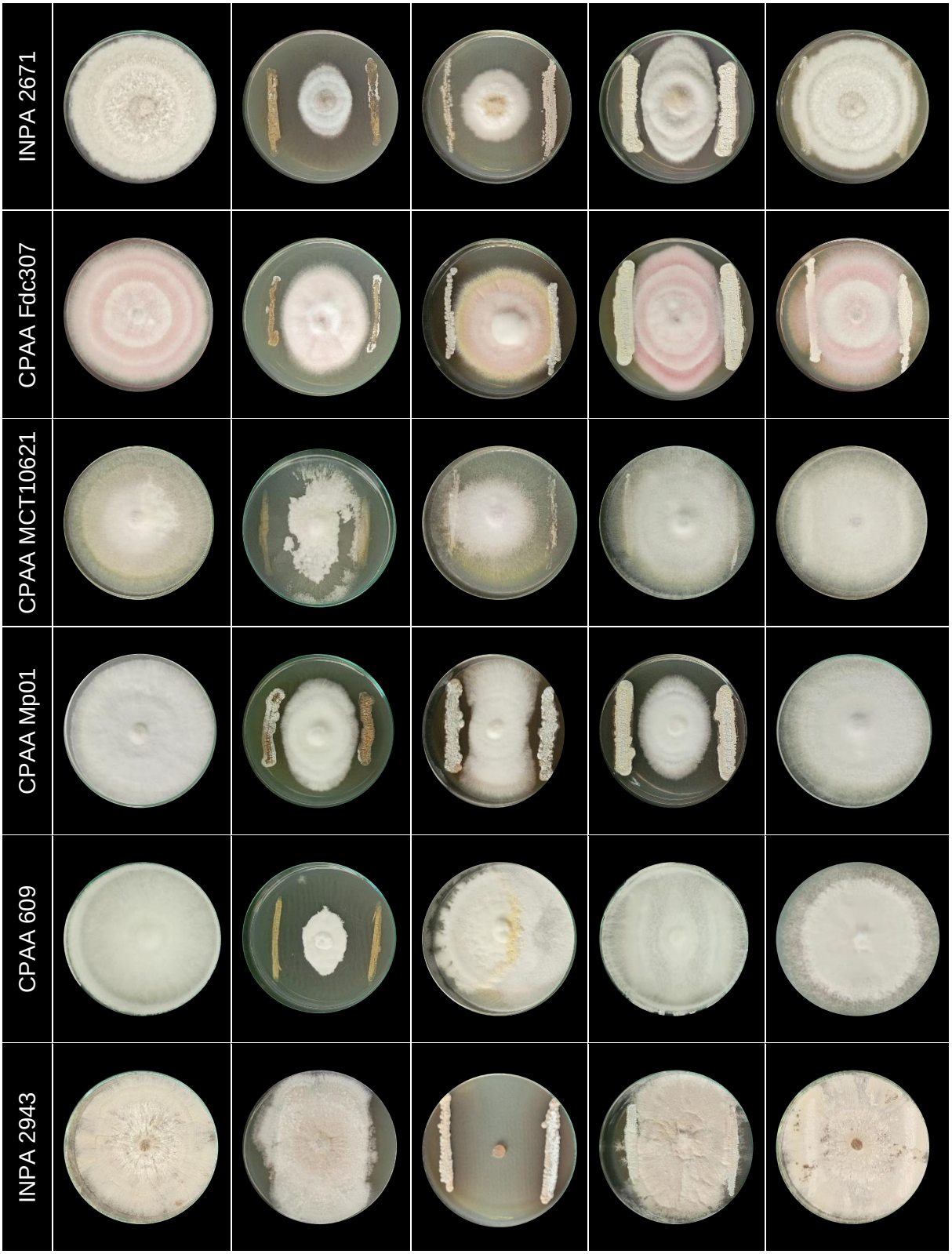
Yang *et al.,* (2019) utilizou o *Streptomyces corchorusii* AUH-1 para bioensaios *in vitro* contra 8 fitopatógenos. Os resultados mostraram que o isolado bacteriano tem atividade antagonista de amplo espectro contra uma variedade de fitopatógenos. Sendo a maior inibição contra *Fusarium. oxysporum* f. sp. *niveum* (81,81 %), *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (78,99 %), *Rhizoctonia solani* (68,25 %), *Phytophthora capsica* (67,23 %), *Botryosphaeria dothidea* (29,66 %), *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (28,25 %), *Verticillium dahliae* (24,67 %) e *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* (37,05 %).

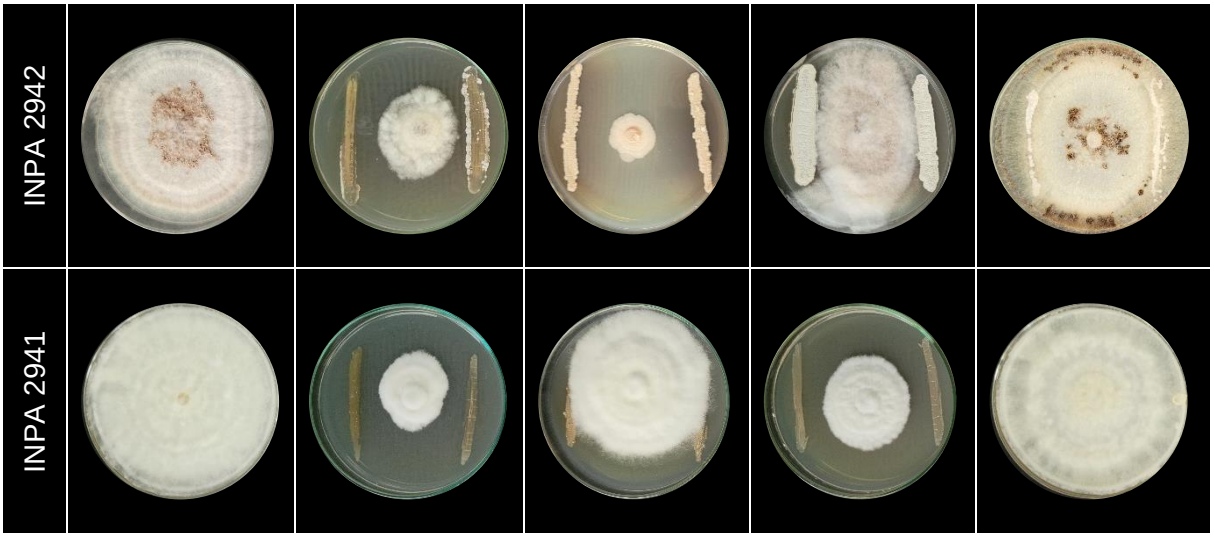
No estudo de Abo-Zaid *et al.,* (2021) foram testados *in vitro* dez isolados de *Streptomyces* como potenciais agentes de controle biológico por seu efeito antagonista no crescimento de *Sclerotium rolfsii.* O isolado *Streptomyces cellulosae* Actino 48 foi mais eficaz, com inibição de 98,7 % do crescimento micelial do fitopatógeno, seguido do S*treptomyces* sp. Actino 32, que foi de 95 % de inibição.

Os resultados dos testes de antagonismo que apresentaram atividade antifúngicas, em especial aquelas acima de 50 %, são promissores para ensaios *in planta*. Segundo Wei *et al*., (2020), isolados de *Streptomyces* com porcentagem de inibição de crescimento micelial de 57 % revelaram ser eficazes em testes *in planta* para controle de doenças e promoção de crescimento.

**Figura 26 -** Atividade antifúngica *in vitro* dos isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 contra 13 diferentes patógenos de importância agrícola




INPA 2671
CPAA Fdc307
CPAA MCT10621
CPAA Mp01
CPAA 609
INPA 2943




Fonte: O autor (2023).
Nota: INPA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. CPAA - Embrapa Amazônia Ocidental.

Vale ressaltar que os ensaios de antagonismos *in vitro* realizados neste trabalho ocorreram em condições de cultivo favoráveis aos fitopatógenos, logo, ensaios em condições favoráveis aos isolados de *Streptomyces* podem resultar em maiores porcentagens de inibição. Segundo Barthélemy *et al.,* (2021) fatores como indução ou desbloqueio de vias metabólicas por OSMAC podem potencializar a produção de metabólitos secundários e consequente a inibição do crescimento dos fitopatógenos pelos isolados bacterianos.

Portanto, as linhagens de *Streptomyces* isolados de sedimentos de rios amazônicos são valiosas fontes de recursos que podem ajudar no desenvolvimento de produtos e processos voltados à agricultura sustentável.

## 5.7 Abordagem OSMAC e atividade citotóxica dos extratos

Os testes preliminares para avaliar a atividade citotóxica dos extratos obtidos dos isolados de *Streptomyces* contra as linhagens de células de carcinoma de cólon humano (HCT116) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2) não foram promissores (Tabela 8). A atividade citotóxica é considerada ativa apenas em compostos com inibição acima de 75 % de proliferação celular (SUFFNESS, PEZZUTO, 1990; KROLL, 2001).

Apesar dos resultados da atividade citotóxica dos extratos do isolados MPUR-28.3, MPUR-31.3, MPUR-51.7 e SOL-159 não serem promissores, há diversos estudos que apresentam os *Streptomyces* spp. como sintetizadores de biomoléculas

com atividade anticancerígenas (ABD-ELNABY, 2015; ALAM *et al.,* 2022; BHAT, NAYAKA, KUMAR, 2022).

A atividade não promissora do ensaio citotóxico pode ser justificada devido a maioria dos *clusters* gênicos em *Streptomyces* spp. estarem provavelmente silenciados no genoma. Esse fator contribui para que os metabólitos secundários não sejam detectáveis nas análises *in vitro* em testes com esses microrganismos. No entanto, através da biologia sintética, a manipulação de genes reguladores pode ser empregada para ativar os BGCs crípticos desses isolados bacterianos (BARAL, AKHGARI, METSA-KETELA, 2018).

Portanto, análises complementares de mineração genômica são necessárias para descobrir os BGCs responsáveis pela atividade anticancerígena e dessa forma desbloquear todo o potencial biotecnológico desses isolados de *Streptomyces*.

**Tabela 8 -** Porcentagem de inibição de proliferação em células tumorais

| Meio de Cultivo | Isolado | HCT116 | HepG2 |
|---|---|---|---|
| GYM | MPUR-28.3 | 2,60 ± 0,97 | 1,91 ± 0,29 |
| | MPUR-31.3 | 14,6 ±13,5 | 14,33 ± 6,92 |
| | MPUR-51.7 | 12,83 ± 1,45 | 13,35 ± 1,01 |
| | SOL-159 | 13,1 ± 1,54 | 6,09 ± 1,43 |
| | Controle | 6,99 ± 1,72 | 9,39 ± 1,06 |
| BD | MPUR-28.3 | 9,48 ± 1,09 | 4,28 ± 1,27 |
| | MPUR-31.3 | 13,43 ± 1,38 | 4,29 ± 0,87 |
| | MPUR-51.7 | 7,65 ± 1,36 | 7,36 ± 1,03 |
| | SOL-159 | 7,32 ± 2,34 | 3,19 ± 0,25 |
| | Controle | 6,98 ± 0,39 | 4,28 ± 1,57 |
| ISP2 | MPUR-28.3 | 15,4 ± 4,41 | 4,90 ± 0,23 |
| | MPUR-31.3 | 7,23 ± 1,50 | 3,93 ± 0,70 |
| | MPUR-51.7 | 7,99 ± 1,18 | 8,98 ± 1,18 |
| | SOL-159 | 3,70 ± 0,33 | 15,05 ± 1,81 |
| | Controle | 13,8 ± 1,43 | 17,88 ± 3,19 |
| YM | MPUR-28.3 | 16,65 ± 1,53 | 21,78 ± 2,76 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | MPUR-31.3 | 12,67 ± 1,99 | 16,36 ± 6,96 |
| | MPUR-51.7 | 14,59 ± 3,03 | 6,55 ± 5,71 |
| | SOL-159 | 13,86 ± 3,65 | 17,56 ± 1,29 |
| | Controle | 12,7 ± 1,08 | 15,00 ± 2,00 |
| Simplificado A | MPUR-28.3 | 1,06 ± 0,12 | 6,18 ± 0,63 |
| | MPUR-31.3 | 2,97 ± 0,51 | 1,36 ± 0,30 |
| | MPUR-51.7 | 9,74 ± 1,74 | 21,8 ± 4,89 |
| | SOL-159 | 11,74 ± 4,14 | 15,69 ± 1,28 |
| | Controle | 15,78 ± 1,77 | 12,11 ± 1,52 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: Carcinoma de cólon humano (HCT116); Carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

# 6 CONCLUSÃO

O estudo dos genomas dos isolados bacterianos dos rios Purus e Solimões permitiu uma análise taxonômica das linhagens e a exploração do potencial biossintético para a produção de produtos naturais.

Na identificação filogenômica, foi possível concluir que o *Streptomyces* sp. MPUR-31.3 e *Streptomyces* sp. SOL-159 são duas novas espécies do gênero *Streptomyces*. Foi possível também relacionar o *Streptomyces* sp. MPUR-28.3 e *Streptomyces* sp. MPUR-51.7 as espécies *Streptomyces limosus* NBRC 12790 T e *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-1271 T, respectivamente.

Com as análises de BGC's relacionados à produção de metabólitos secundários, foram identificados 39 BGC's no *Streptomyces* sp. MPUR-28.3, 55 BGC's no *Streptomyces* sp. MPUR-31.3, 45 BGC's no *Streptomyces* sp. MPUR-51.7 e 24 BGC no *Streptomyces* sp. SOL-159. Por meio da mineração direta nos BGC's que apresentaram 100 % de similaridade foi possível indicar que os isolados são geneticamente capazes de sintetizar as seguintes moléculas: Antimicina, Albaflavenona, Desferrioxamina B, Ectoína, Geosmina, Tetramato Policíclico Macrolactâmicos, Naringenina, Citrulassina D, Polilisina, Hidrocarboneto 1-heptadeceno, Malacidina A e B. Estas moléculas possuem diversas atividades, destacam-se as anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, as quais são de importância industrial, agrícola, ambiental, médica, veterinária e de alimentos.

Os testes de inibição *in vitro* dos isolados contra os fitopatógenos foram promissores. O *Streptomyces* sp. MPUR-28.3 inibiu todos os 13 fitopatógenos, a melhor inibição foi contra *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (85,2 %). O *Streptomyces* sp. MPUR-31.3 e *Streptomyces* sp. MPUR-51.7 inibiram 10 dos 13 fitopatógenos, a melhor inibição foi contra *Rhizoctonia* sp. INPA 2943 (90,2 %) e *Colletotrichum scovillei* INPA 2910 (65,9 %). O *Streptomyces* sp. SOL-159 inibiu apenas 5 fitopatógenos, sendo a melhor inibição contra *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (42 %).

Os testes preliminares da atividade citotóxica dos extratos obtidos dos quatros isolados de *Streptomyces* contra as linhagens de células de carcinoma de cólon

humano (HCT116) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2) não foram significativos.

Perspectivas futuras para esse trabalho envolvem a caracterização da parede celular, testes de resistência entre outras análises, a fim depositar os isolados em pelo menos dois bancos de culturas bacterianas de referência internacional. Realizar análises complementares de mineração genômica nos quatro isolados para desbloquear, por meio da abordagem OSMAC ou expressão heteróloga, as vias biosintéticas dessas biomoléculas. Assim como, analisar os diversos BGCs preditos que possuem baixa similaridade e que podem codificar diferentes moléculas desconhecidas, que podem permitir o melhor entendimento em relação a biossíntese dessas moléculas. Avaliar *in planta* a atividade inibitória dos isolados que apresentaram efeitos significativos *in vitro* maiores que 50 %.

Portanto, estudos futuros podem abordar a descoberta de novas biomoléculas com amplo potencial biotecnológico oriundas dos *clusters* gênicos biossintéticos dos isolados de *Streptomyces* de sedimentos de rios Amazônicos.

## 7 REFERÊNCIAS


ABADI. T. B.; RIZVANOV, A. A.; HAERTLÉ, T.; BLATT, N. L. (2019). World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance. **BioNanoScience**. v. 9. P 778-788. DOI: 10.1007/s12668-019-00658-4.

ABDELMOTELEB, A.; GONZÁLEZ-MENDOZA, D. (2020). A novel *Streptomyces* rhizobacteria from desert soil with diverse anti-fungal properties. **Rhizosphere.** 100243. DOI: 10.1016/j.rhisph.2020.100243.

ABD-ELNABY, H.; ABO-ELALA, G.; ABDEL-RAOUF, U.; ABD-ELWAHAB, A.; HAMED, M. (2015). Antibacterial and anticancer activity of marine *Streptomyces* parvus: optimization and application. **Biotechnology & Biotechnological Equipment.** v. 30(1), p180–191. DOI:10.1080/13102818.2015.1086280.

ABO-ZAID, G.; ABDELKHALEK, A.; MATAR, S.; DARWISH, M.; ABDEL-GAYED, M. (2021). Application of Bio-Friendly Formulations of Chitinase-Producing *Streptomyces cellulosae* Actino 48 for Controlling Peanut Soil-Borne Diseases Caused by *Sclerotium rolfsii*. **J. Fungi**. v. 7, 167. DOI: 10.3390/jof7030167.

ADEYEMO, O. M.; ONILUDE, A. A. (2018). Antimicrobial Potential of a Rare Actinomycete Isolated from Soil: Crossiella sp.-EK18. **Journal of Advances in Microbiology.** v. 11(2), p. 1–15. DOI: 10.9734/JAMB/2018/41989

AKBER, Muhammad. A.; Mubeen, M.; Sohail, M. A.; Khan, S. W.; Solanki, M. K.; Khalid, R.; Abbas, A.; Divvela, P. K.; Zhou, L. (2023). Global distribution, traditional and modern detection, diagnostic, and management approaches of *Rhizoctonia solani* associated with legume crops. *J. Frontiers in Microbiology*. v 13. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1091288.

ALAM, K.; MAZUMDER, A.; SIKDAR, S.; ZHAO, Y. M.; HAO, J.; SONG, C.; WANG, Y.; SARKAR, R.; ISLAM, S.; ZHANG, Y.; LI, A. (2022). *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. **Front Microbiol**. v. 29;13:968053. DOI: 10.3389/fmicb.2022.968053.

ALBUQUERQUE, F. C. (1960). **Antracnose do guaraná Rio de janeiro**: Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola. 27 p. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131442/1/Antracnose.pdf. Acesso em: 22 de julho de 2023.

ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R.; BOTAS, A.; ALBILLOS, S.M. (2015). Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Microb Cell Fact.** v. 14, (178). DOI: 10.1186/s12934-015-0373-7.

AMALFITANO, S.; COCI, M.; CORNO, G.; LUNA, G. M. (2014). A microbial perspective on biological invasions in aquatic ecosystems. **Hydrobiologia**. v. 746 (1). p. 13–22. DOI: 10.1007/s10750-014-2002-6.

ANA. Agência Nacional de Águas (2015). **Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil:** informe 2014. Brasília.103 p. ISBN: 978-85-8210-028-8. Disponível em: <https://www.snirh.gov.br/portal/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/crisehidrica2014.pdf>. Acesso em: 01 de dezembro de 2022.

ANTONY-BABU, S.; STIEN, D.; EPARVIER, V.; PARROT, D.; TOMASI, S.; SUZUKI, M. T. (2017). Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. **Sci Rep**. 7, 11089. DOI: 10.1038/s41598-017-11363-1.

ANWAR, U. B.; ZWAR, I. P.; DE SOUZA, A. O. (2020). **Chapter 12 - Biomolecules produced by extremophiles microorganisms and recent discoveries.** In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. p. 247–270. DOI: 10.1016/b978-0-444-64301-8.00012-3.

ARAGÓN, L. E. (2018). A dimensão internacional da Amazônia: um aporte para sua interpretação. **Revista Nera**. ano 21, n. 42, p. 14-33. ISSN: 1806-6755. 2018.

ARASU, M. V.; DURAIPANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S.; (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal of Medical Mycology**. v. 19(1):22-28. DOI: 10.1016/j.mycmed.2008.12.002.

AREFA, N.; SARKER, A. K.; RAHMAN, M. A. (2021). Resistance-guided isolation and characterization of antibiotic-producing bacteria from river sediments. **BMC Microbiology.** v. 21(1). DOI: 10.1186/s12866-021-02175-5.

ARIFIYANTO, A.; SURTININGSIH, SETYANINGRUM, E.; NUKMAL, N.; AENY, T. N. (2021). In vitro antimicrobial and antimalarial screening of a crude extract of *Streptomyces* sp. AB8 isolated from Lapindo Mud Volcano Area, Sidoarjo, Indonesia. **Biodiversitas**. v. 22. n. 7. p. 2817-2823. DOI: 10.13057/biodiv/d220731.

ASTOLFI-FILHO, S. (2001). **Um programa estratégico para o desenvolvimento da bioindústria na Amazônia: Probem/Amazônia.** In: Seminário Especial A Biodiversidade como Estratégia Moderna de Desenvolvimento da Amazônia. Estudos e Pesquisas n. 16. Disponível em: <https://acervo.socioambiental.org/sites /default/f iles/documents /10D00479.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2022.

AYED, A.; SLAMA, N.; MANKAI, H.; BACHKOUEL, S.; ELKAHOUI, S.; TABBENE, O.; LIMAM, F. (2018). *Streptomyces tunisialbus* sp. nov. a novel *Streptomyces* species with antimicrobial activity. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 111(9), p. 1571–1581. DOI: 10.1007/s10482-018-1046-4.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**. v. 8;9:75. DOIi: 10.1186/1471-2164-9-75.

BADAOUI-NAJJAR, M.; Kashtanov, D.; Chikindas, M. L. (2007). Epsilon-poly-L-lysine and nisin A act synergistically against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Lett Appl Microbiol.** v. 45(1):13-8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02157.x.

BAI, J. L.; WANG, H. H.; ZHANG, J. M.; WU, Q. P.; MO, S. P.; HE, Y. L. (2022). Postharvest quality maintenance of wax apple and guava fruits by use of a fermented

broth of an ε-poly-L-lysine-producing *Streptomyces*. strain. **PloS One**. 17(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0265457.

BAINDARA, P..; NAYUDU, N..; KORPOLE, S. (2019). Whole genome mining reveals a diverse repertoire of lanthionine synthetases and lanthipeptides among the genus *Paenibacillus.* **Journal of Applied Microbiology***.* DOI: 10.1111/jam.14495.

BALD, D. R.; RANGEL, C. P.; VARGAS, A.; GIRÃO, K. T.; PASSAGLIA, L. M. P. (2001) Microbiota do solo: a diversidade invisível e a sua importância. **Revista Bio Diverso.** v. 1, n. 1. Disponível em: https://www.seer.ufrgs.br/index.php/biodiverso /article/view/120742. Acesso em: 03 de dezembro de 2022.

BANKAR, S. B.; SINGHAL, R. S. (2013). *Panorama of poly-ε-lysine.* **RSC Advances***.* 3(23), 8586. DOI:10.1039/c3ra22596h.

BARAL, B.; AKHGARI, A.; AND METSA-KETELA, M. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: avenues and challenges. **Synth. Syst. Biotechnol.** v. 3, p. 163–178. DOI: 10.1016/j.synbio.2018.09.001.

BARBUTO FERRAIUOLO, S.; CAMMAROTA, M.; SCHIRALDI, C.; RESTAINO, O. F. (2021) Streptomycetes as platform for biotechnological production processes of drugs. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 105, 551–568. DOI: 10.1007/s00253-020-11064-2.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**. v. 80 (1). p. 1-43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15.

BARTHÉLEMY M, ELIE N, GENTA-JOUVE G, STIEN D, TOUBOUL D, EPARVIER V. (2021). Identification of Antagonistic Compounds between the Palm Tree Xylariale Endophytic Fungi and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. **J Agric Food Chem.** v. 22;69(37):10893-10906. doi: 10.1021/acs.jafc.1c03141.

BECERRIL, A.; ÁLVAREZ, S.; BRAÑA, A. F.; RICO, S.; DÍAZ, M.; SANTAMARÍA, R. I., MÉNDEZ, C. (2018). Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces* argillaceus: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches**. PLOS ONE**. v. 13(5) e0198145. DOI: 10.1371/journal.pone.0198145.

BECKER, B. K. (2005). Geopolítica da Amazônia. Conferência do Mês do Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo. **Estudos Avançados.** v. 19 (53). ISSN: 0103-4014. Versão on-line ISSN: 1806-9592.

BENTES, J. L. S.; BARRETO, R. W. (2004). Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazonica**. v. 34(1), p. 129–131. DOI:10.1590/s0044-59672004000100017.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDEÑO-TÁRRAGA A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; WOODWARD, J.; BARRELL, B G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces* coelicolor A3(2). **Nature**. v. 417 (6885):141-7. DOI: 10.1038/417141a.

BÉRDY, J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of antibiotics.** v. 58 (1). p. 1–26. DOI: 10.1038/ja.2005.1.

BERNARDES, M. F. F.; PAZIN, M.; PEREIRA, L. C.; DORTA, D. J. **Impact of Pesticides on Environmental and Human Health**. In Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment; IntechOpen: London, 2015.

BHAT, M. P.; NAYAKA, S.; KUMAR, R.S. (2022). A swamp forest *Streptomyces* sp. strain KF15 with broad spectrum antifungal activity against chilli pathogens exhibits anticancer activity on HeLa cells. **Arch Microbiol** v. 204, 540. DOI: 10.1007/s00203-022-03147-7.

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial Pathogenesis** v. 111, p. 458–467. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.09.036

BILYK, B.; KIM, S.; FAZAL, A.; BAKER, T. A.; SEIPKE, R. F. (2020). Regulation of Antimycin Biosynthesis Is Controlled by the ClpXP Protease**. mSphere**. v. 5(2). DOI:10.1128/msphere.00144-20.

BLIN, K.; SHAW, S.; KLOOSTERMAN, A. M.; CHARLOP-POWERS, Z.; VAN WEZEL, G. P.; MEDEMA, M. H.; WEBER, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**. v. 49 (W1), p. 29-35. DOI:10.1093/nar/gkab335.

BO, A. B.; KIM, J. D.; KIM, Y. S.; SIN, H. T.; KIM, H. J.; KHAITOV, B.; CHOI, J. S. (2019). Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. **PLOS ONE.** v. 14(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0222933.

BREZA-BORUTA, B.; PALUSZAK, Z. (2016). The Antagonistic Activity of Actinomycetes of *Streptomyces* Genus in Relation to Trichoderma koningii. **Journal of Ecological Engineering.** v. 17 (1), p. 106-113. DOI: 10.12911/22998993/61197.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature.** v. 21;529 (7586):336-43. DOI: 10.1038/nature17042. PMID: 26791724.

CAMERON, L. M.; GILCHRIST, Y. C. (2021) Clinker & Clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. **Bioinformatics**. v. 37 (16), p. 2473–2475. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab007.

CÁNOVAS, D.; BORGES, N.; VARGAS, C.; VENTOSA, A.; NIETO, J. J.; SANTOS, H. (1999). Role of Ngamma-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. **Appl Environ Microbiol**. 65(9):3774-9. DOI: 10.1128/AEM.65.9.3774-3779.1999.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100 Suppl 2:14555-61. DOI: 10.1073/pnas.1934677100.

CHANDRA, G.; CHATER, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. **FEMS Microbiol Rev**. v. 38. p 345-379. DOI: 10.1111/1574-6976.12047.

CHATER, K. F. (1993). Genetics of Differentiation in *Streptomyces*. **Annual Review of Microbiology**. v. 47:685-711. DOI: 10.1146/annurev.mi.47.100193.003345.

CHATER, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. **F1000Research.** v. 30;5:2795. DOI: 10.12688/f1000research.9534.1.

CHAUDHARY, H. S.; YADAV, J.; SHRIVASTAVA, A. R.; SINGH, S.; SINGH, A. K.; GOPALAN, N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). **J Adv Pharm Technol Res**. v. 4 (2). p. 118-23. DOI: 10.4103/2231-4040.111528.

CHOUYIA, F. E.; VENTORINO, V. PEPE, O. (2022) Diversity, mechanisms and beneficial features of phosphate-solubilizing *Streptomyces* in sustainable agriculture: A review. **Front. Plant Sci.** v. 13:1035358. DOI: 10.3389/fpls.2022.1035358.

CHU, J.; KOIRALA, B.; FORELLI, N.; VILA-FARRES, X.; TERNEI, M. A.; ALI, T.; RADY, S. F. (2020). Synthetic-bioinformatic natural product antibiotics with diverse modes of action. **Journal of the American Chemical Society.** v. 142, 33, 14158–14168. DOI: 10.1021/jacs.0c04376.

CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; COSTA, M. S.; ROONEY, A. P.; YI, H.; XU, X. W.; MEYER, S.; TRUJILLO, M. E. (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 68:461–466. DOI: 10.1099/ijsem.0.002516.

ČIHÁK, M.; KAMENÍK. Z.; ŠMÍDOVÁ, K.; BERGMAN, N.; BENADA, O.; KOFROŇOVÁ, O.; PETŘÍČKOVÁ, K.; BOBEK, J. (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. **Front. Microbiol**. 8:2495. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02495.

CIMERMANCIC, P.; MEDEMA, M. H.; CLAESEN, J.; KURITA, K.; WIELAND-BROWN, L. C.; MAVROMMATIS, K.; FISCHBACH, M. A. (2014). Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters. **Cell**. v. 158(2), 412–421. DOI: 10.1016/j.cell.2014.06.034.

COATES, R. C.; PODELL, S.; KOROBEYNIKOV, A.; LAPIDUS, A.; PEVZNER, P.; SHERMAN, DH.; ALLEN, E. E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. (2014). Characterization of cyanobacterial hydrocarbon composition and distribution of biosynthetic pathways. **PLoS One**. v. 27;9(1):e85140. DOI: 10.1371/journal.pone.0085140.

COLLIN, F.; MAXWELL, A. (2019). The Microbial Toxin Microcin B17: Prospects for the Development of New Antibacterial Agents. **Journal of Molecular Biology**. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.050.

COOPER, M.; SHLAES, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline. **Nature**. v. 472. p. 32. DOI: 10.1038/472032a.

CORRÊA, D.B.A.; DO AMARAL, D.T.; DA SILVA, M.J.; DESTÉFANO, S. A. L. (2021). *Streptomyces brasiliscabiei*, a new species causing potato scab in south Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 114. p. 913–931. DOI: 10.1007/s10482-021-01566-y.

COSTA, S. C.; DIAS, T.; VIANA, J. C.; ALMEIDA, J. R.; ROMÃO, M. J.; COSTA, M. C. (2022). Diverse Applications of Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides (RiPPs): From Antibiotics and Enzyme Inhibitors to Nanomaterials and Biotechnology. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(10), 5143. DOI: 10.3390/ijms23105143.

COSTA, T.; CASSIN, E.; MOREIRINHA, C.; MENDO, S.; CAETANO, T. S. (2023) Towards the Understanding of the Function of Lanthipeptide and TOMM-Related Genes in *Haloferax mediterranei*. **Biology** v. *12*, 236. DOI: 10.3390/biology12020236.

DA SILVA, I. J. S.; SOUSA, T. F.; DE QUEIROZ, C. A. DOS SANTOS CASTRO, G.; CANIATO, F. F.; DE MEDEIROS, L. S.; ANGOLINI, C. F. F.; HANADA, R. E.; KOOLEN, H. H. F.; DA SILVA, G. F. (2023) *Penicillium amapaense* sp. nov., section *Exilicaulis*, and new records of *Penicillium labradorum* in Brazil isolated from Amazon River sediments with potential applications in agriculture and biotechnology. ***Mycol Progress*.** v. 22, 23. DOI: 10.1007/s11557-023-01868-7.

DA SILVA, M. O.; AQUINO, S. (2018). Resistência aos Antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.** v. 8. n. 4. p. 472-482. DOI: 10.17058/reci.v8i4.11580.

DEBENEDICTIS, E. A.; CHORY, E. J.; GRETTON, D. W.; WANG, B.; GOLAS, S.; ESVELT, K. M. (2022). Systematic molecular evolution enables robust biomolecule discovery. **Nature Methods**. v. 19, 55–64. DOI: 10.1038/s41592-021-01348-4.

DEKA, P.; ZOTHANPUIA, P. A. K.; SINGH, B. P. (2020). Actinobacteria as a potential natural source to produce antibiofilm compounds: An overview. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: **Microbial Biofilms.** 91–99. DOI: 10.1016/b978-0-444-64279-0.00007-4.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A. (2012). Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites***.* v. 2, 303-336. DOI: 10.3390/metabo2020303.

DING, L.; ZHANG, S.; HAIDAR, A. K.; BAJIMAYA, M.; GUO, Y.; LARSEN, T. O.; GRAM, L. (2021). Polycyclic Tetramate Macrolactams - A Group of Natural Bioactive Metallophores. **Front. Chem***.* v. 9:772858. DOI: 10.3389/fchem.2021.772858.

DOHERTY, M.; YAGER, P. L.; MORAN, M. A.; COLES, V. J.; FORTUNATO, C.S.; KRUSCHE, A.V.; MEDEIROS, P. M.; PAYET, J. P.; RICHEY, J. E.; SATINSKY, B. M.; SAWAKUCHI, H. O.; WARD, N. D.; CRUMP, B. C. (2017). Bacterial Biogeography across the Amazon River-Ocean Continuum. **Frontiers in Microbiology.** v. 8:882. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00882.

DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R.A.; TAUFA, T. (2022). *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. **Microbiol*.* Res.** v. 13, 418-465. DOI: 10.3390/microbiolres13030031.

DUAN, Y.; NIU, W.; PANG, L.; BIAN, X.; ZHANG, Y.; ZHONG, G. (2022). Unusual Post-Translational Modifications in the Biosynthesis of Lasso Peptides. **Int. J. Mol. Sci.** v. *23*, 7231. DOI: 10.3390/ijms23137231.

DULERMO, T.; LEJEUNE, C.; AYBEKE, E.; ABREU, S.; BLETON, J.; DAVID, M.; DENISET-BESSEAU, A.; CHAMINADE, P.; THIBESSARD, A.; LEBLOND, P. (2023). Genome Analysis of a Variant of *Streptomyces coelicolor* M145 with High Lipid Content and Poor Ability to Synthetize Antibiotics. **Microorganisms**. v. 11, 1470. DOI: 10.3390/microorganisms11061470.

DUNCAN, K. R.; CRÜSEMANN, M.; LECHNER, A.; SARKAR, A.; LI, J.; ZIEMERT, N.; JENSEN, P. R. (2015). Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from Salinispora Species. **Chemistry & Biology**. v. 22 (4). p. 460–471. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.03.010.

DYKHUIZEN, D. Species Numbers in Bacteria (2005). **Proc Calif Acad Sci**. v. 56 (6 Suppl 1). p. 62-71. PMID: 21874075; PMCID: PMC3160642.

EBRAHIMI-ZARANDI, M.; BONJAR, G. H. S.; RISEH, R. S.; EL-SHETEHY, M.; SAADOUN, I.; BARKA, E.A. (2021). Exploring Two *Streptomyces* Species to Control *Rhizoctonia solani* in Tomato. **Agronomy**. v. 11, 1384. DOI: 10.3390/agronomy11071384.

EISENHOFER, G.; KLINK, B.; RICHTER, S.; LENDERS, J. W.; ROBLEDO M. (2017). Metabologenomics of Phaeochromocytoma and Paraganglioma: an integrated approach for personalised biochemical and genetic testing. **Clin Biochem Rev**. v. 38(2), p. 69-100. PMID: 29332973; PMCID: PMC5759086.

EMBLEY, T. M.; STACKEBRANDT, E. (1994). The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology.** v. 48 (1). p. 257-289. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.001353

Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2020). **Integrar inovação e sustentabilidade no maior bioma brasileiro.** Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227005/1/27206.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2022.

Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Documentos 88**: Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. 1a Ed. [Eletrônica], 155 p. Jaguariúna, 2012. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/930378/1/Doc881.pdf. Acesso em: 15 de julho de 2023.

EPSTEIN, S.C.; CHARKOUDIAN, L.K.; MEDEMA, M.H. (2018). A standardized workflow for submitting data to the Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster (MIBiG) repository: prospects for research-based educational experiences. **Stand in Genomic Sci**. v. 13, 16. DOI: 10.1186/s40793-018-0318-y.

FADDETTA, T.; VASSALLO, A.; DEL-DUCA, S.; GALLO, G.; FANI, R.; PUGLIA, A. M. (2022). Unravelling the DNA sequences carried by *Streptomyces coelicolor* membrane vesicles. **Sci Rep**. v. 12(1):16651. doi: 10.1038/s41598-022-21002-z.

FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADI, S.; CHEVALIER, J.; MEZRIOUI, N. E.; PAGÈS, J. M.; HASSANI, L. (2012). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**. v. 19 (5), p. 464–471. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.12.003

FAO. United Nations Food and Agriculture Organization. **New Standards to Curb the Global Spread of Plant Pests and Diseases**. Disponível em: https://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode/. Acesso em: 14 de julho de 2023.

FARRIS, J. S. (1972). Estimating Phylogenetic Trees from Distance Matrices. **The American Naturalist.** v.106(951), p. 645–668. Disponível em: jstor.org/stable/2459725.

FIPKE, M. V.; VIDAL, R. A. (2015). Non-proteinogenic amino acids potential use as allelochemicals. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 14(3), p. 256-262. DOI**:** 10.7824/rbh.v14i3.413.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. (2009). *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology.** v. 7. p. 36–49. DOI: 10.1038/nrmicro1968.

GARBEVA, P.; AVALOS, M.; ULANOVA, D.; VAN-WEZEL, G. P.; DICKSCHAT, J. S. (2023). Volatile sensation: The chemical ecology of the earthy odorant geosmin. **Environ Microbiol.** DOI: 10.1111/1462-2920.16381.

GENTRY, A. H. (1982). **Neotropical Floristic "Diversity: phytogeographical connections between central and south america, pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the andean orogeny?** In: Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 69. n. 3. p. 557-593. DOI: 10.2307/2399084.

GIEHL, A.; SANTOS, A. A.; CADAMURO, R. D.; TADIOTO, V.; GUTERRES, I. Z.; PRÁ ZUCHI, I. D.; MINUSSI, G. A.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.; ALVES, S. L., JR. (2023). Biochemical and Biotechnological Insights into Fungus-Plant Interactions for Enhanced Sustainable Agricultural and Industrial Processes. **Plants.** v. 12, 2688. DOI: 10.3390/plants12142688.

GOHAIN, A.; MANPOONG, C.; SAIKIA, R.; DE MANDAL, S. (2020). **Chapter 9 - Actinobacteria:** diversity and biotechnological applications. In: Recent Advancements in Microbial Diversity. Academic Press. p. 217-231. DOI: 10.1016/B978-0-12-821265-3.00009-8.

GOTO, Y.; LI, B.; CLAESEN, J.; SHI, Y.; BIBB, M. J.; VAN DER DONK W. A. (2010). Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. **PLoS Biol.** v. 23; 8 (3):e1000339. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000339.

GUALBERTO, G. F.; CATARINO, A. DE M.; SOUSA, T. F.; CRUZ, J. C.; HANADA, R. E.; CANIATO, F. F. ; SILVA, G. F. (2021). *Pseudopestalotiopsis gilvanii* sp. nov. and *Neopestalotiopsis formicarum* leaves spot pathogens from guarana plant: a new threat to global tropical hosts. **Phytotaxa** (on-line). v. 489, p. 121-139. DOI: 10.11646/phytotaxa.489.2.2.

GUALBERTO, G.; CATARINO, A.; FERNANDES, T.; CRUZ, J. DA; HANADA, R.; CANIATO, F.; SILVA, GILVAN. (2021) *Pseudopestalotiopsis gilvanii* sp. nov. And *Neopestalotiopsis formicarum* leaves spot pathogens from guarana plant: a new threat to global tropical hosts. **Phytotaxa.** v. 489. DOI: 10.11646/phytotaxa.489.2.2.

HAHN, D; GRAUPNER, P.; CHAPIN, E. (2009) Albucidin: a novel bleaching

herbicide from *Streptomyces albus* subsp. *chlorinus* NRRL B-24108. **J Antibiot** v. 62, 191–194. DOI: 10.1038/ja.2009.11.

HAN, J.; McCARTHY, E. D.; HOEVEN, W. V.; CALVIN, M.; BRADLEY, W. H. (1968) Organic geochemical studies, ii. A preliminary report on the distribution of aliphatic hydrocarbons in algae, in bacteria, and in a recent lake sediment. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 59(1), p. 29-33. DOI: 10.1073/pnas.59.1.29.

HANDAYANI, I.; RATNAKOMALA, S.; LISDIYANTI, P.; FAHRURROZI.; ALANJARY, M.; WOHLLEBEN, W.; MAST, Y. (2018). Complete Genome Sequence of *Streptomyces* sp. Strain BSE7F, a Bali Mangrove Sediment *Actinobacterium* with Antimicrobial Activities. **Genome Announcements**. 6 (26). DOI: 10.1128/genomea.00618-18.

HARIR, M.; BENDIF, H.; BELLAHCENE, M.; FORTAS, Z.; POGNI, R. (2018). *Streptomyces* secondary metabolites. **Basic Biol. Appl. Actinobacteria.** v. 6, p. 99–122. DOI: 10.5772/intechopen.79890.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews - Drug Discovery.** v. 14. p. 111-129. DOI: 10.1038/nrd4510.

HOLLAND, B. R.; HUBER, K. T.; DRESS, A.; MOULTON, V. (2002). δ plots: a tool for analyzing phylogenetic distance data. **Mol. Biol. Evol.** 192(12)2051–2059. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004030.

HOPWOOD, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. **Microbiology**. v. 145. p. 2183–2202. DOI: 10.1099/00221287-145-9-2183.

HOPWOOD, D. A. (2006). Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. **Annu Rev Genet**. v. 40. p. 1-23. DOI: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090639.

HOVER, B. M.; KIM, S. H.; KATZ, M.; CHARLOP-POWERS, Z.; OWEN, J. G.; TERNEI, M, A.; MANIKO, J.; ESTRELA, A. B.; MOLINA, H.; PARK, S.; PERLIN, D. S.; BRADY, S. F. (2018). Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Nat Microbiol**. v. 3(4), p. 415-422. DOI: 10.1038/s41564-018-0110-1.

HU, T.; CHITNIS, N.; MONOS, D.; DINH, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: an overview. **Human Immunology**. v. 82 (11), p. 801-811. DOI: doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012

HUI, M. L. Y.; TAN, L. T. H.; LETCHUMANAN, V.; HE, Y. W.; FANG, C. M.; CHAN, K. G.; LAW, J. W. F.; LEE, L. H. (2021). The Extremophilic Actinobacteria: from microbes to medicine. **Antibiotics**. v. 10, 682. DOI: 10.3390/antibiotics10060682.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. **Curr Opin Microbiol**. v. 51:72-80. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2021.) **IBGE atualiza limites de municípios no mapa da Amazônia Legal.** Disponível em:

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2021-06/ibge-atualiza-limites-de-municipios-no-mapa-da-amazonia-legal>. Acesso em: 30 de novembro de 2022.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2018). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. v. 1. 1. ed. 492 p.: il., gráfs., tabs. Brasília. ISBN: 978-85-61842-79-6.

ICNP. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. **Genus *Streptomyces***. In: Standing in Nomenclture (LPSN) and Type-Strain Genome Server. Disponível em: https://lpsn.dsmz.de/genus/streptomyces>. Acesso em: 18 de março de 2023.

JING, T.; ZHOU, D.; ZHANG, M.; YUN, T.; QI, D.; WEI, Y.; CHEN, Y.; ZANG, X.; WANG, W.; XIE, J. (2020). Newly Isolated *Streptomyces* sp. JBS5-6 as a Potential Biocontrol Agent to Control Banana Fusarium Wilt: Genome Sequencing and Secondary Metabolite Cluster Profiles. **Front Microbiol.** v. 3;11:602591. DOI: 10.3389/fmicb.2020.602591.

JONES, J. P. (1961). A leaf spot of cotton caused by *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**. v. 51(5), p. 305-308.

JOSHI, S.; KAR, R. K.; LAHIRI, D.; NAG, M. (2023). Lantibiotics as Alternative Therapeutics. In Advances in Biotechnology and Bioengineering. **Academic Press**. p. 491-502. DOI: 10.1016/B978-0-323-99141-4.00029-1.

JOYNT, R.; SEIPKE, R. F. (2018). A phylogenetic and evolutionary analysis of antimycin biosynthesis. **Microbiology** (Reading). V. 164(1):28-39. DOI: 10.1099/mic.0.000572.

KALIA, V. C.; GONG, C.; SHANMUGAM, R. (2022) Prospecting Microbial Genomes for Biomolecules and Their Applications. **Indian J Microbiol**. v. 62, p. 516–523. DOI: 10.1007/s12088-022-01040-x.

KAMARA, V.; GANGWAR, M. (2015). Antifungal Activity of Actinomycetes from Rhizospheric Soil of Medicinal plants against phytopathogenic fungi. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**. v. (3):182-187.

KAUTSAR, S. A.; BLIN, K.; SHAW, S.; NAVARRO-MUÑOZ, J. C.; TERLOUW, B. R.; CHARKOUDIAN, L. K.; COLLEMARE, J.; LININGTON, R. G.; WEBER, T.; MEDEMA, M. H.(2020). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function**. Nucleic Acids Res**. v. 48(D1): p454-458. DOI: 10.1093/nar/gkz882.

KHUSHBOO; KUMAR, P.; DUBEY, K.K.; USMANI, Z.; SHARMA, M.; GUPTA, V.K. (2022), Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites. Biofuels, **Bioprod. Bioref**. v. 16: 244-264. DOI: 10.1002/bbb.2294.

KIM, E-S. (2021). Recent Advances of Actinomycetes. **Biomolecules.** v. 11 (2). p. 134. DOI: 10.3390/biom11020134.

KONWAR, A.N.; BASAK, S.; DEVI, S.G. (2023). *Streptomyces* sp. MNP32, a forest-dwelling Actinomycetia endowed with potent antibacterial metabolites. **3 Biotech**. v. 13, 257. DOI: 10.1007/s13205-023-03670-4.

KOPRIVA, S.; MALAGOLI, M.;TAKAHASHI, H. (2019). Sulfur nutrition: impacts on plant development, metabolism, and stress responses. **Journal of Experimental Botany**. v. 70(16), p. 4069–4073. DOI: 10.1093/jxb/erz319.

KORMANEC, J.; REZUCHOVA, B.; HOMEROVA, D.; CSOLLEIOVA, D.; SEVCIKOVA, B.; NOVAKOVA, R.; FECKOVA, L. (2019). Recent achievements in the generation of stable genome alterations/mutations in species of the genus *Streptomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103. p. 5463-5482. DOI: 10.1007/s00253-019-09901-0.

KOYAMA, Y.; KATO, F.; YAZAWA, Y. (1976). Effect of light on the pigmentation of bacteria in Actinomycetales. In: Actinomycetales, the boundary microorganisms. p. 65-85. **Toppan Co. LTDA.** Tokyo, Japan.

KROLL, D. J. (2001). Natural Compounds in Cancer Therapy: Promising Nontoxic Antitumor Agents from Plants and Other Natural Sources John Boik. Oregon Medical. **Journal of Natural Products**. v. 64(12), p. 1605–1606. DOI:10.1021/np000765k.

KRONHEIM, S.; SOLOMON, E.; HO, L. (2023). Complete genomes and comparative analyses of *Streptomyces phages* that influence secondary metabolism and sporulation. **Sci Rep.** v. 13, 9820. DOI: 10.1038/s41598-023-36938-z.

KURNIJASANTI, R.; SUDJARWO, S. A. (2022) Identification of *Streptomyces* spp. from garbage dump soils in Surabaya, Indonesia. **Veterinary World**. v. 15(3): 634-639. DOI: 10.14202/vetworld.2022.634-639.

LACEY, H. J.; RUTLEDGE, P. J. (2022). Recently Discovered Secondary Metabolites from *Streptomyces* Species. **Molecules**. v. 27, 887. DOI: 10.3390/molecules27030887.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. (1967). Biology of Actinomycetes. Annual **Review of Microbiology**. v. 21. p. 71-100. DOI: 10.1146/annurev.mi.21.100167.0 00443.

LEE, I.; KIM, Y. O.; PARK, S. C.; CHUN, J. (2016). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 66, p. 1100–1103. DOI: 10.1099/ijsem.0.000760.

LEE, I.; OUK KIM, Y.; PARK, S. C.; CHUN, J. (2016). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 66(2):1100-1103. DOI: 10.1099/ijsem.0.000760. PMID: 26585518.

LEE, N.; HWANG, S.; KIM, J.; CHO, S.; PALSSON, B.; CHO, B. K. (2020). Mini review: genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*, Computational and Structural. **Biotechnology Journal.** v. 18. 1548-1556. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.06.024.

LE-FORT, V.; DESPER, R.; GASCUEL, O. (2015). FastME 2.0: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program. **Mol Biol Evol.** v. 32: 2798–2800. DOI: 10.1093/molbev/msv150.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. (2005). Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**. v. 1. n. 1. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/271644747>. Acesso em: 01 de dezembro de 2022.

LI, L. (2023). Next-generation synthetic biology approaches for the accelerated discovery of microbial natural products. **Engineering Microbiology**. v. 3 (1) DOI: 10.1016/j.engmic.2022.100060.

LI, X.; SUN, Z.; SHANG, Z.; FORELLI, N.; PO, K. H. L.; CHEN, S.; BRADY, S. F. (2020). Total Synthesis of Malacidin A by β-Hydroxyaspartic Acid Ligation Mediated Cyclization and Absolute Structure Establishment. **Angewandte Chemie International**. v. 59 (45). DOI:10.1002/anie.202009092.

LIMA, S. M. A.; PEREIRA, P. S.; SILVA, B. I. M.; RIBEIRO, N. E.; BORBA, E. F. O; OLIVEIRA-TINTINO, C. D. de M.; RANDAU, K. P.; COUTINHO, H. D. M.; LIMA-GOMES, G. M. de S.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; MARTINEZ-MEDINA, G. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T. (2021). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of secondary metabolites from *Streptomyces* sp. isolated of the Amazon-Brazil region. **Research, Society and Development**. v. 10. n. 10. p. e366101018974. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18974.

LIOTTI, R. G., DA SILVA FIGUEIREDO, M. I., DA SILVA, G. F., DE MENDONÇA, E. A. F., & SOARES, M. A. (2018). Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Res.** v. 207, 8–18. DOI: 10.1016/j.micres.2017.10.011.

LIOTTI, R. G.; DA SILVA FIGUEIREDO, M. I.; SOARES, M. A. (2019). *Streptomyces* griseocarneus R132 controls phytopathogens and promotes growth of pepper (*Capsicum annuum*). **Biological Control.** v. 138, 104065. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104065.

LIPPERT, K.; GALINSKI, E. A. (1992). Enzyme stabilization be ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. **Appl Microbiol Biotechnol.** 37:61–65 . DOI: 10.1007/BF00174204.

LIU, M.; LIU, H.; SHI, M. (2021). Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. **Microb Cell Fact**. v. 20, 76. DOI: 10.1186/s12934-021-01567-6.

LIU, W.; ZHANG, W.; JIN, H.; ZHANG, Q.; CHEN, Y.; JIANG, X.; ZHANG, G.; ZHANG, L.; ZHANG ,W.; SHE, Z.; ZHANG, C. (2019). Genome Mining of Marine-Derived *Streptomyces* sp. SCSIO 40010 Leads to Cytotoxic New Polycyclic Tetramate Macrolactams. **Mar Drugs.** v.17(12):663. DOI: 10.3390/md17120663. PMID: 31775228; PMCID: PMC6950151.

LO GRASSO, L.; CHILLURA-MARTINO, D.; ALDUINA, R. (2016). Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. In: Basics and Biotechnological Applications. **InTech.** DOI: 10.5772/61525.

LUO, Y.; HUANG, H.; LIANG, J.; WANG, M.; LU, L.; SHAO, Z.; COBB, R. E.; ZHAO, H. (2013). Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. **Nat Commun**. v. 4:2894. DOI: 10.1038/ncomms3894.

MA, G-Q.; XIA, Z-F.; WAN, C-X.; ZHANG, Y.; LUO, X-X.; ZHANG, L-L. (2017). *Streptomyces* kalpinensis sp. nov., an actinomycete isolated from a salt water beach. **International Journal os Sistematic and Evalutionary Microbiology.** v. 67:4892–4896. DOI 10.1099/ijsem.0.002125.

MA, R.; KARTHIK, L. (2022). Pharmacology of FDA-Approved Medicines from Actinobacteria. In: Actinobacteria. **Springer**. DOI: 10.1007/978-981-16-5835-8_14.

MAKRYGIANNAKIS, D.; KLINT, E.; LUNDBERG, I. E.; LÖFBERG, R.; ULFGREN, A. K.; KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I. (2006). Citrullination is an inflammation-dependent process. **Ann Rheum Dis**. v. 65(9):1219-22. DOI: 10.1136/ard.2005.049403.

MALHI, Y.; TIMMONS ROBERTS, J.; BETTS, A. R.; KILLEEN, T. J.; LI, W.; NOBRE, C. A. (2008). Climate Change, Deforestation, and the Fate of the Amazon. **Science**. v. 319, 169. DOI: 10.1126/science.1146961.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. (2012), Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. v. 13: 614-629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.

MANTECA, Á.; YAGÜE, P. (2019). *Streptomyces* as a Source of Antimicrobials: Novel Approaches to Activate Cryptic Secondary Metabolite Pathways. **IntechOpen.** DOI: 10.5772/intechopen.81812.

MANULLANG, W.; CHUANG, H. (2020). *Streptomyces* sp. mitigates abiotic stress response and promotes plant growth. **Journal of Plant Protection Research**. v. 60(3), p. 263-274. DOI: 10.24425/jppr.2020.133955.

MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. (2022). Comparative Molecular Mechanisms of Biosynthesis of Naringenin and Related Chalcones in Actinobacteria and Plants: Relevance for the Obtention of Potent Bioactive Metabolites. **Antibiotics.** v. 11, 82. DOI: 10.3390/antibiotics11010082.

MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. (2022). Comparative Molecular Mechanisms of Biosynthesis of Naringenin and Related Chalcones in Actinobacteria and Plants: Relevance for the Obtention of Potent Bioactive Metabolites. **Antibiotics**. v. 11, 82. DOI: 10.3390/antibiotics11010082.

MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; DE JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M. A.; BREITLING, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**. v. 39 (suppl_2), p. 339-346. DOI:10.1093/nar/gkr466.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H. P.; GÖKER. M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics.** v.21;14:60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; GÖKER, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. **Nat Commun.** v. 16;10(1):2182. DOI: 10.1038/s41467-019-10210-3.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; SARDÀ CARBASSE, J.; PEINADO-OLARTE, R. L.; GÖKER, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable

genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic Acid Res.** v. 50:D801–D807. DOI: 10.1093/nar/gkab902.

MELBY, J. O., LI, X., & MITCHELL, D. A. (2019). Correction to “Orchestration of Enzymatic Processing by Thiazole/Oxazole-Modified Microcin Dehydrogenases.” Biochemistry. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b01042.

MELBY, J. O.; NARD, N. J.; MITCHELL, D. A. (2011). Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. **Curr Opin Chem Biol**. v. 15(3):369-78. DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.02.027.

MELLO, A. F. (2015). Dilemas e desafios do desenvolvimento sustentável da Amazônia: o caso brasileiro. **Revista Crítica de Ciências Sociais.** n. 10. p. 91-108. DOI: 10.4000/rccs.6025

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 2001. 172 p.

MOREIRA, J. M.; SILVA, S. C. M.; CREMASCO, M. A. (2020). Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth. **Biotechnology Reports**. v. 26, e00440. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00440.

MYRONOVSKYI, M.; ROSENKRÄNZER, B.; STIERHOF, M.; PETZKE, L.; SEISER, T.; LUZHETSKYY, A. (2020). Identification and Heterologous Expression of the Albucidin Gene Cluster from the Marine Strain *Streptomyces Albus* Subsp. *Chlorinus* NRRL B-24108. **Microorganisms**. v. 8, 237. DOI: 10.3390/microorganisms8020237.

NAH, H. J.; PARK, J.; CHOI, S.; KIM, E. S. WblA, a global regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces.* **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** v. 48, Issue 3-4, DOI: 10.1093/jimb/kuab007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod.** v. 27;83(3):770-803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NGUYEN, C.T.; DHAKAL, D.; PHAM, V.T.T.; NGUYEN, H.T.; SOHNG, J. K. (2020). Recent Advances in Strategies for Activation and Discovery/Characterization of Cryptic Biosynthetic Gene Clusters in *Streptomyces*. **Microorganisms**. v. 8, 616. DOI: 10.3390/microorganisms8040616.

NIKITIN, D. A.; IVANOVA, E. A.; SEMENOV, M. V.; ZHELEZOVA, A. D.; KSENOFONTOVA, N. A.; TKHAKAKHOVA, A. K.; KHOLODOV, V. A. (2023). Diversity, Ecological Characteristics and Identification of Some Problematic Phytopathogenic Fusarium in Soil: A Review. **Diversity.** v. 15, 49. DOI: 10.3390/d15010049.

NÚÑEZ-MONTERO, K.; LAMILLA, C.; ABANTO, M.; MARUYAMA, F.; JORQUERA, M. A.; SANTOS. A.; MARTINEZ-URTAZA, J.; BARRIENTOS, L. (2019). Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. **Scientific Reports.** v. 9, 7488. DOI: 10.1038/s41598-019-43960-7.

OKUDA, N.; WATANABE, K.; FUKUMORI, K.; NAKANO, S.; NAKAZAWA, T. (2014). **Chapter 3 - Biodiversity Researches on Microbial Loop in Aquatic Systems.** In:

Biodiversity in Aquatic Systems and Environments, 51–67. doi:10.1007/978-4-431-54150-9_3.

OLANREWAJU, O. S.; BABALOLA, O. O. (2019). Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 103(3):1179-1188. DOI: 10.1007/s00253-018-09577-y.

ONO, H.; SAWADA, K.; KHUNAJAKR, N.; TAO, T.; YAMAMOTO, M.; HIRAMOTO, M.; SHINMYO, A.; TAKANO, M.; MUROOKA, Y. (1999). Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, Halomonas elongata. **J Bacteriol**. v. 181 (1), p. 91-99. DOI: 10.1128/JB.181.1.91-99.1999.

O'SULLIVAN,  C. A; BELT. K.; THATCHER, L. F. (2021). Tackling Control of a Cosmopolitan Phytopathogen: Sclerotinia. **Front Plant Sci.** v. 20;12:707509. DOI: 10.3389/fpls.2021.707509.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Res.** v. 42:D206-14. DOI: 10.1093/nar/gkt1226.

PACIOS-MICHELENA, S.; AGUILAR-GONZÁLEZ, C. N.; ALVAREZ-PEREZ, O. B.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M.; ARREDONDO-VALDÉS, R.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; GOVEA-SALAS, M.; ILYINA, A. (2021). Application of *Streptomyces* Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. **Front. Sustain. Food Syst.** v. 5:696518. DOI: 10.3389/fsufs.2021.696518.

PANDEY, N. (2018). Role of Plant Nutrients in Plant Growth and Physiology. Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance. p. 51–93. DOI:10.1007/978-981-10-9044-8_2.

PANG, F.; SOLANKI, M.K.; WANG, Z. (2022). *Streptomyces* Can Be An Excellent Plant Growth manager. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 38, 193. DOI: 10.1007/s11274-022-03380-8.

PENG, Y.; LI, SJ.; YAN, J.; TANG, Y.; CHENG, J. P.; GAO, A. J.; YAO, X.; RUAN, J. J.; XU, B. L. (2021) Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. **Front. Microbiol.** v. 12:670135. DOI: 10.3389/fmicb.2021.670135.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. D.; ALMEIDA, L. D. (1989). Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica.** v. 1(1), 79-81.

PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FRANÇA, S. C.; Oliveira, L. A. (2017). **Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon.** In: Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. p. 71-103. DOI: 10.1007/978-3-319-55804-2_5.

PHAM, V. T. T.; NGUYEN, H. T.; NGUYEN, C. T.; CHOI, Y. S.; DHAKAL, D.; KIM, T. S. SOHNG, J. K. (2021). Identification and enhancing production of a novel

macrolide compound in engineered *Streptomyces peucetius*. **RSC Advances.** v. 11(5), p. 3168–3173. DOI:10.1039/d0ra06099b.

PRABHU, J.; SCHAUWECKER, F.; GRAMMEL, N.; KELLER, U.; BERNHARD, M. (2004). Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. **Appl Environ Microbiol**. 70 (5):3130-2. DOI: 10.1128/AEM.70.5.3130-3132.2004.

PRASAD, A.; LORENZEN, E. D.; WESTBURY, M. V. (2021). Evaluating the role of reference-genome phylogenetic distance on evolutionary inference. **Molecular Ecology Resources.** v. 22 (1), p. 45-55. DOI:10.1111/1755-0998.13457.

PRIYASHANTHA, A. K. H.; KARUNARATHNA, S. C.; LU, L.; TIBPROMMA, S. (2023). Fungal Endophytes: An Alternative Biocontrol Agent against Phytopathogenic Fungi. **Encyclopedia.** v.3, p. 759-780. DOI: 10.3390/encyclopedia3020055.

PROCÓPIO, R. E.; SILVA, I. R.; MARTINS M. K.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Braz J Infect Dis**. v. 16(5):466-71. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.

PUNJA, Z. K. (1985). The Biology, Ecology, and Control of Sclerotium Rolfsii. **Annual Review of Phytopathology**. v. 23, p. 97-127.

PUREV E, KONDO T, TAKEMOTO D, NIONES JT, OJIKA M. (2020). Identification of ε-Poly-L-lysine as an Antimicrobial Product from an *Epichloë* Endophyte and Isolation of Fungal ε-PL Synthetase Gene. **Molecules.** v. 25(5):1032. DOI: 10.3390/molecules25051032.

QI, Y.; NEPAL, K. K.; BLODGETT, J. A. V. (2021). A comparative metabologenomic approach reveals mechanistic insights into *Streptomyces* antibiotic crypticity. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 118(31):e2103515118. DOI: 10.1073/pnas.2103515118.

QUEIROZ, C. A.; DE, MATOS, K. DA S.; LOBO, I. K. C.; SOUSA, S. B.; DE, MUNIZ, C.R.; YAMAGISHI, M. E. B.; ZOCOLO, G. J.; HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; SOUSA, N. R.; ANDRADE, E. V. DE; CORDEIRO, I. B.; MELO, A. A. M.; SILVA, G.F. DA. (2020) Morpho-anatomical and molecular characterization of the oversprouting symptoms caused by *Fusarium decemcellulare* in guarana plants *(Paullinia cupana* var. sorbilis). **Tropical Plant Biology.** v. 13: 274–286. DOI: 10.1007/s12042-020-09256-1.

RAJIVGANDHI, G. N.; RAMACHANDRAN, G.; MARUTHUPANDY, M.; SARAVANAKUMAR, S.; MANOHARAN, N.; VIJI, R. (2018). Antibacterial Effect of Endophytic Actinomycetes from 2/8 Marine Algae against Multi Drug Resistant Gram Negative Bacteria. **Examines Mar Biol Oceanogr.** v. 1 (4). DOI: 10.31031/EIMBO.2018.01.000522.

RANI, L.; THAPA, K.; KANOJIA, N.; SHARMA, N.; SINGH, S.; GREWAL, A. S.; SRIVASTAV, A. L.; KAUSHAL, J. (2020). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **J. of Cleaner Production.** v. 283, 124657. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.124657

REEN, F.J.; ROMANO, S.; DOBSON, A.D.W.; O'GARA, F. (2015). The Sound of Silence: activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms. **Mar. Drugs**. v. 13, p. 4754-4783. DOI:doi.org/10.3390/md13084754.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition**. Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 106(45). p. 19126–19131. DOI:10.1073/pnas.0906412106.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; OLIVER GLÖCKNER, F.; PEPLIES, J. (2015). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**. v. 32(6). p. 929–931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681.

RISTAINO, J.B.; ANDERSON, P.K.; BEBBER, D.P.; BRAUMAN, K.A.; CUNNIFFE, N.J.; FEDOROFF, N.V.; FINEGOLD, C.; GARRETT, K.A.; GILLIGAN, C.A.; JONES, C.M. (2021). The Persistent Threat of Emerging Plant Disease Pandemics to Global Food Security. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 118, e2022239118. DOI: 10.1073/pnas.2022239118.

RODRÍGUEZ-R, L.; KONSTANTINIDIS, K. (2014). Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species: Culture-independent genomic approaches identify credibly distinct clusters, avoid cultivation bias, and provide true insights into microbial species. **Microbe Magazine**. v. 9. p. 111-118. DOI: 10.1128/microbe.9.111.1.

ROMERO-RODRÍGUEZ, A.; MALDONADO-CARMONA, N.; RUIZ-VILLAFÁN, B.; KOIRALA, N.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, S. (2018). Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 111 (5) p. 761–781. DOI: 10.1007/s10482-018-1073-1.

RONDON, N. M.; LAWRENCE, K. (2021). The fungal pathogen *Corynespora cassiicola*: a review and insights for target spot management on cotton and Soya bean. **J Phytopathol.** v. 169, p. 329- 338. DOI: 10.1111/jph.12992.

ROSS, J.; ADKINS, R. (2020). **Biodiversity and Environmental Conservation**. Ed. Tech Press. United Kingdom. ISBN 978-1-83947-246-6.

SAADOULI, I.; ZENDAH, EL-EUCH I.; TRABELSI, E.; MOSBAH, A.; REDISSI, A.; FERJANI, R.; FHOULA, I.; CHERIF, A.; SABATIER, J. M., SEWALD, N.; OUZARI, HI. (2020) Isolation, Characterization and Chemical Synthesis of Large Spectrum Antimicrobial Cyclic Dipeptide (l-leu-l-pro) from *Streptomyces misionensis*V16R3Y1 Bacteria Extracts. A Novel 1H NMR Metabolomic Approach. **Antibiotics (Basel).** 21;9 (5):270. DOI: 10.3390/antibiotics9050270.

SADEGHIAN, M.; SHAHIDI-BONJAR, G. H.; SHARIFI-SIRCHI, G. R. (2016). Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. **Postharvest Biology and Technology.** v. 112, 46–54. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.09.035.

SAHA, S.; ZHANG, W.; ZHANG, G.; ZHU, Y.; CHEN, Y.; LIU, W.; ZHANG, C. (2017). Activation and characterization of a cryptic gene cluster reveals a cyclization cascade for polycyclic tetramate macrolactams. **Chemical Science**. v. 8(2), p. 1607-1612. DOI:10.1039/c6sc03875a.

SALWAN, R.; SHARMA, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research.** v. 231,126374. DOI: 10.1016/j.micres.2019.126374.

SANCHEZ-MARROQUIN, A. (1962). Constancy of Characteristics in the Streptomycetes. **Journal Bacteriology**. v. 83 (6). p. 1183–1192. DOI: 10.1128/jb.83.6.1183-1192.1962.

SANTOS, A.S.; MORA-OCAMPO, I.Y.; DE NOVAIS, D.P.S.; AGUIAR, E.R.G.R.; PIROVANI, C.P. (2023). State of the Art of the Molecular Biology of the Interaction between Cocoa and Witches' Broom Disease: A Systematic Review. **Int. J. Mol. Sci**. v. 24, 5684. DOI: 10.3390/ijms24065684.

SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, S. (2017.) Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 Biotech**. v. 7, 102. DOI: 10.1007/s13205-017-0736-3.

SAWAI, B.; SIRIPORN, Y.; BENJAMAS, C. (2021). Influences of Culture Media, Temperature and Light/Dark Conditions on Growth and Antifungal Activity of *Streptomyces* spp. Against Botrytis cinerea, in vitro and on Tomato Leaf. **Research Square**. DOI: 10.21203/rs.3.rs-385032/v1.

SCHAAL, K. P.; YASSIN, A. A. (2015). **Actinomyces.** In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00012.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. (2012). *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36 (4). p. 862–876. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x.s.

SENABIO, J. A.; DE CAMPOS-PEREIRA, F.; PIETRO-SOUZA, W.; SOUSA, T. F.; SILVA, G. F.; SOARES, M. A. (2023) Enhanced mercury phytoremediation by *Pseudomonodictys pantanalensis* sp. nov. A73 and *Westerdykella aquatica* P71. **Braz J Microbiol.** v. 54(2). p. 949-964. DOI: 10.1007/s42770-023-00924-4.

SENO, E. T.; CHATER, K. F. (1983). Glycerol Catabolic Enzymes and Their Regulation in Wild-type and Mutant Strains of Streptomyces *coelicolor* A3(2). **Microbiology**. V. 129(5), p. 1403–1413. DOI: 10.1099/00221287-129-5-1403.

SHARMA, O.; SULTAN, A. A.; DING, H.; TRIGGLE, C. R. (2020). A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. **Front Immunol**. v. 14;11:585354. DOI: 10.3389/fimmu.2020.585354.

SHIN, J.; PARK, S.; LEE, J. S.; LEE, E. J.; YOUN, H. D. (2020). Complete genome sequence and comparative analysis of *Streptomyces seoulensis*, a pioneer strain of nickel superoxide dismutase. **Genes Genom.** 42:273–281. DOI: 10.1007/s13258-019-00878-8.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. (1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 16. (3). p. 313–340. DOI: doi:10.1099/00207713-16-3-313.

SIDDIQUE, S.; SYED, Q.; ADNAN, A.; QURESHI, F. A. (2014). Isolation, Characterization and Selection of Avermectin-Producing *Streptomyces avermitilis* Strains From Soil Samples. **Jundishapur J Microbiol**. v. 7(6):e10366. DOI: 10.5812/jjm.10366.

SILVA, L.J.; CREVELIN, E.J.; SOUZA, D.T.; LACERDA-JÚNIOR, G. V.; OLIVEIRA, V. M.; RUIZ, A. L. T. G.; ROSA, L. H.; MORAES, L. A. B.; MELO, I. S. (2020).

Actinobacteria da Antártida como fonte para a descoberta anticancerígena. **Scientific Reports**. v. 10, 13870. DOI: 10.1038/s41598-020-69786-2.

SIVALINGAM, P.; HONG, K.; POTE, J.; PRABAKAR, K. (2019). Extreme Environment *Streptomyces*: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads?. **International Journal of Microbiology**. vol. 2019. p. 20 DOI: 10.1155/2019/5283948.

SMITH, D.J. (2023). From Genome Mining to Protein Engineering: a structural bioinformatics route. In: Selvarajoo, K. (eds) Computational Biology and Machine Learning for Metabolic Engineering and Synthetic Biology. **Methods in Molecular Biology**. vol. 2553. DOI: 10.1007/978-1-0716-2617-7_5.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. (1940). The Species Concept in *Fusarium*. **Amer. J. Botany.** v 27:64–67. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1940.tb14217.x.

SOETAN, K.O.; OLAIYA, C.O.; OYEWOLE, O.E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**. V. 4, 200-222.

SON, S.; KO, S. K.; KIM, S. M.; KIM, E.; KIM, G. S. LEE. B.; R, I. J.; KIM, W. G.; LEE, J. S.; HPMG, Y. S.; JANG, K. H.; AHN, J. S. (2018). Antibacterial Cyclic Lipopeptide Enamidonins with an Enamide-Linked Acyl Chain from a *Streptomyces* Species. **Journal of Natural Products**. v.81(11). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00497

SOUSA, T. F.; SANTOS, A. O. DOS; SILVA, F. M. A. DA; CANIATO, F. F.; QUEIROZ, C. A. DE; SOUZA, T. M. DE; MACIEL, J. B. S.; CATARINO, A. DE M.; GWINNER, R.; PRACHYA, S.; KITTAKOOP, P.; ANGOLINI, C. F.F.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, G. F. (2020). *Arcopilus amazonicus* (Chaetomiaceae), a new fungal species from the Amazon rainforest native plant *Paullinia cupana*. **Phytotaxa**. v. 456 (2). DOI: 10.11646/phytotaxa.456.2.2.

SOUSA, T. F.; VIEIRA REÇA, B. N. P.; CASTRO, G. S.; DA SILVA, I. J. S.; CANIATO, F. F.; DE ARAÚJO JÚNIOR, M. B.; YAMAGISHI, M. E. B.; KOOLEN, H. H. F.; BATAGLION, G. A.; HANADA, R. E.; DA SILVA, G. F. (2023) *Trichoderma agriamazonicum* sp. nov. (Hypocreaceae), a new ally in the control of phytopathogens. **Microbiol Res.** v. 275:127469. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127469.

SOUZA, R. P.; SOUSA, T. F.; QUEIROZ, C. A.; LOPES, E. F.; YAMAGISHI, M. E. B.; DA SILVA, G. F. (2022). Identificação de Clusters Gênicos Biossintéticos Relacionados a Produção de Antibióticos em *Pool* Bacteriano Isolado de Sedimentos de Rios Amazônicos. In: I Simpósio de Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas: Estratégias Biotecnológicas para o desenvolvimento sustentável da Amazônia. p. 8-8. ISBN: 978-65-5839-057-2.

SOUZA, W. (2007). **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas.** Sociedade Brasileira de Microscopia.

STEYAERT, R. L. (1949). Contribution a l'etude monographique de Pestalotia de Not. et Monochaetia Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). **Bulletin Du Jardin Botanique de l'État a Bruxelles**. v. 19(3), 285. DOI:10.2307/3666710.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.** London: Academic Press; 1990: 71–133.

SUN, C.; YANG, Z.; ZHANG, C.; LIU, Z.; HE, J.; LIU, Q.; ZHANG, T.; JU, J.; MA, J. (2019). Genome Mining of *Streptomyces atratus* SCSIO ZH16: Discovery of Atratumycin and Identification of Its Biosynthetic Gene Cluster. **Org. Lett.** v. 21:1453–1457. DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00208.

SUN, C.; ZHANG, C.; QIN, X.; WEI, X.; LIU, Q.; LI, Q.; JU, J. (2018). Genome mining of *Streptomyces olivaceus* SCSIO T05: Discovery of olimycins A and B and assignment of absolute configurations. **Tetrahedron**. v. 74:199–203. DOI: 10.1016/j.tet.2017.11.069.

TAKANO, H.; OBITSU, S.; BEPPU, T.; UEDA, K. (2005). Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. **J Bacteriol**. v. 187(5):1825-32. DOI: 10.1128/JB.187.5.1825-1832.2005.

TAPPEL, A. L . (1960). Inhibition of electron transport by antimycin A, alkyl hydroxy naphthoquinones and metal coordination compounds. **Biochem Pharmacol**. v. 3, p. 289–296. DOI: 10.1016/0006-2952(60)90094-0.

TERRA, L.; RATCLIFFE, N.; CASTRO, C. H.; VICENTE, C. P. A.; DYSON, P. (2021). **Biotechnological Potential of *Streptomyces* Siderophores as New Antibiotics**. In: Current Medicinal Chemistry. Ed. Bentham Science Publishers. v. 28, n. 7, pp. 1407-1421. DOI: 10.2174/0929867327666200510235512.

TIETZ, J. I.; SCHWALEN, C. J.; PATEL, P. S.; MAXSON. T.; BLAIR, P. M.; TAI, H. C.; ZAKAI, U. I.; MITCHELL, DA. A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. Nat Chem Biol. 2017 May;13(5):470-478. DOI: 10.1038/nchembio.2319.

TIKU, A.R. (2020). Antimicrobial Compounds (Phytoanticipins and Phytoalexins) and Their Role in Plant Defense. In: Mérillon, JM., Ramawat, K. (eds) Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. **Springer, Cham**. DOI: 10.1007/978-3-319-96397-6_63.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**. v. 5 (3):240-5. DOI: 10.1016/s1369-5274(02)00324-7. PMID: 12057676.

TUDI, M.; DANIEL RUAN, H.; WANG, L.; LYU, J.; SADLER, R.; CONNELL, D.; CHU, C.; PHUNG, D.T. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 18, 1112. DOI: 10.3390/ijerph18031112.

UMESHA, S.; SINGH, P.K.; SINGH, R. P. (2018). **Chapter 6 - Microbial Biotechnology and Sustainable Agriculture.** In: Biotechnology for Sustainable Agriculture: Emerging Approaches and Strategies. p. 185-205. DOI:10.1016/B978-0-12-812160-3.00006-4.

UNNO, K.; KAWEEWAN, I.; NAKAGAWA, H.; KODANI, S. (2020). Heterologous expression of a cryptic gene cluster from *Grimontia marina* affords a novel tricyclic peptide grimoviridin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 104(12):5293-5302. DOI: 10.1007/s00253-020-10605-z.

VAL, A. L.; FIGLIUOLO, R.; FELDBERG, E. (1991). **Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas**. vol. 1. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/12987>. Acesso em: 01 de dezembro de 2022.

VAL, P.; DE MELO, G.; FLANTUA, S. G. A.; QUESADA, C. A.; FAN, Y.; ALBERT, J. S.; GUAYASAMIN, J. M.; HOORN, C. (2021). **Chapter 1 - Geology And Geodiversity Of The Amazon:** three billion years of history. In: Amazon Assessment: Science Panel for the Amazon. DOI: 10.55161/POFE6241.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. (2018). The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Chemical Science**s. n. 90 (1 Suppl 1). DOI: 10.1590/0001-3765201820170653.

VAN-DER-MEIJ, A.; WORSLEY, S. F.; HUTCHINGS, M. I.; VAN-WEZEL, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS Microbiol Rev**. v 41(3):392-416. DOI: 10.1093/femsre/fux005. PMID: 28521336.

WAKSMAN, S. A.; HENRICI, A. T. (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. **Journal Bacteriology.** v. 46 (4):337-41. DOI: 10.1128/jb.46.4.337-341.1943.

WANG, C.; WANG, X.; PEI, G.; XIA, Z.; PENG, B.; SUN, L.; WANG, J.; GAO, D.; CHEN, S.; LIU, D.; DAI, W.; JIANG, P.; FANG, Y.; LIANG, C.; WU, N.; BAI, E. (2020). Stabilization of microbial residues in soil organic matter after two years of decomposition. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 141-107687. DOI: 10.1016/j.soilbio.2019.107687.

WANG, X. J.; ZHANG, B.; YAN, Y. J.; NA, J.; ZHANG, J.; LIU, C. X.; XIANG, W. S. (2013). Characterization and analysis of an industrial strain of *Streptomyces* bingchenggensis by genome sequencing and gene microarra. **Genome**. v. 56. p. 677-689 DOI: 10.1139/gen-2013-0098.

WEBER, T.; BLIN, K.; DUDDELA, S.; KRUG, D.; KIM, H. U.; BRUCCOLERI, R.; MEDEMA, M. H. (2015). antiSMASH 3.0 - a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research.** v. 43(W1), p. 237-243. DOI: 10.1093/nar/gkv437.

WEI, Y.; ZHAO, Y.; ZHOU, D.; QI, D.; LI, K.; TANG, W.; CHEN, Y.; JING, T.; ZANG, X.; XIE, J.; WANG, W. (2020). A Newly Isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 With a Broad-Spectrum Antifungal Activity Improves the Banana Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. **Front. Microbiol***.* 11:1712. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01712.

WENHAO, L.; LIJIAN, D.; JUAN, L.; HUIMIN, W.; YANG, L.; SHUANGLING, T.; XIAOJUN, Y.; YUTONG, S.; WENHAN, L.; HOU-WEN, L.; SHAN H. (2022). Novel Antimycin Analogues with Agricultural Antifungal Activities from the Sponge-

Associated Actinomycete *Streptomyces* sp. NBU3104. **J. of Agricultural and Food Chemistry**. v. 70 (27), p. 8309-8316. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c02626.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M.; SNEATH, P. H.; SACKIN M. J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**. v. 129 (6). p. 1743-813. DOI: 10.1099/00221287-129-6-1743.

WOOD, T. M.; MARTIN, N. I. (2019). The calcium-dependent lipopeptide antibiotics: structure, mechanism, & medicinal chemistry. **Medchemcomm**. v. 21;10(5):634-646. DOI: 10.1039/c9md00126c.

WRIGHT, L. F.; HOPWOOD, D. A. (1976). Identification of the Antibiotic Determined by the SCP1 Plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Journal of General Microbiolog.** v 95(1), p. 96–106. DOI: 10.1099/00221287-95-1-96.

XIE, F.; PATHOM-AREE, W. (2021). Actinobacteria From Desert: Diversity and Biotechnological Applications. **Front Microbiol**. v. 9;12:765531. DOI: 10.3389/fmicb.2021.765531.

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; KUMAR, M.; SUGITHA, T. C. K.; SINGH, B.; SAXENA, A.; DHALIWAL, H. (2018). **Chapter 2 - Actinobacteria from Rhizosphere:** molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering - Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications. DOI: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00002-3.

YAN, Y.; LIU, Q.; STEVEN e JACOBSEN; TANG, Y. (2018). The impact and prospect of natural product discovery in agriculture. **Science & Society**. v. 19. issue 11-1. 19:e46824. DOI: 10.15252/embr.201846824.

YANG, H., ZHU, D., KAI, L. WANG. L.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; CHEN, X. (2023). Engineering *Streptomyces albulus* to enhance ε-poly-L-lysine production by introducing a polyphosphate kinase-mediated ATP regeneration system. **Microb Cell Fact.** v. 22, 51. DOI: 10.1186/s12934-023-02057-7.

YANG, Y.; ZHANG, S.; LI, K. (2019). Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* stain AUH-1 against phytopathogenic fungi. **World J. of Microbiology and Biotech.** v. 35(9). DOI:10.1007/s11274-019-2720-z.

YOON, S. H.; HÁ, S. M.; LIM, J.; KWON, S.; CHUN, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 110(10):1281-1286. DOI: 10.1007/s10482-017-0844-4.

YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. (2003). ε-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 62, p. 21–26. DOI: 10.1007/s00253-003-1312-9.

ZABURANNYI, N.; RABYK, M.; OSTASH, B.; Fedorenko, V.; Luzhetskyy, A. (2014). Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome. **BMC Genomics**. v. 15, 97. DOI: 10.1186/1471-2164-15-97.

ZHANG, G.; ZHANG, W.; SAHA, S.; ZHANG, C. (2016). Recent Advances in Discovery, Biosynthesis and Genome Mining of Medicinally Relevant Polycyclic Tetramate Macrolactams. **Curr Top Med Chem**. v. 16(15):1727-39. DOI:

10.2174/1568026616666151012112818.

ZHAO, Y.; LI, G.; CHEN, Y.; LU, Y. (2020). Challenges and Advances in Genome Editing Technologies in *Streptomyces*. **Biomolecules**. v. 10 (5), 734. DOI: 10.3390/biom10050734.

ZHOU, D.; JING, T.; CHEN, Y.; YUN, T.; QI, D.; ZANG, X.; ZHANG, M.; WEI, Y.; LI, K.; ZHAO, Y.; WANG, W.; XIE, J. (2022). Biocontrol potential of a newly isolated *Streptomyces* sp. HSL-9B from mangrove forest on postharvest anthracnose of mango fruit caused by Colletotrichum gloeosporioides. **Food Control**. v. 135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.108836.

ZIEMERT, N.; ALANJARY, M.; WEBER, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – a review. **Natural Product Reports**. V. 33(8), p. 988–1005. DOI: 10.1039/c6np00025h.

**APÊNDICE A - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO MPUR-28.3**

| Region | Biosynthetic Class | Genome region (nucleotide) | | Most similar known cluster | Similarity | MIBiG ID |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Start | Stop | | | |
| Region 1.1 | PKS-like,amglyccycl,butyrolactone | 20,932 | 67,978 | 7-deoxypactamycin | 13% | BGC0000119 |
| Region 1.2 | lanthipeptide-class-i | 76,584 | 101,924 | ND | ND | ND |
| Region 4.1 | T1PKS,NRPS-like,NRPS,lanthipeptide-class-ii,lanthipeptide-class-iii | 195 | 84,874 | antimycin | 100% | BGC0000958 |
| Region 5.1 | NRPS,NRPS-like | 37,373 | 83,859 | enduracidin | 12% | BGC0000341 |
| Region 14.1 | T1PKS | 1 | 54,774 | sanglifehrin A | 11% | BGC0001042 |
| Region 18.1 | NRPS,LAP | 1 | 43,981 | surugamide A/surugamide D | 61% | BGC0001792 |
| Region 26.1 | NRPS | 1 | 43,684 | mannopeptimycin | 22% | BGC0000388 |
| Region 52.1 | terpene | 10,850 | 31,036 | geosmin | 100% | BGC0001181 |
| Region 60.1 | T1PKS,NRPS | 1 | 29,143 | SGR PTMs / SGR PTM Compound b / SGR PTM Compound c / SGR PTM Compound d | 100% | BGC0001043 |
| Region 64.1 | RiPP-like | 1 | 6,365 | streptamidine | 50% | BGC0002115 |
| Region 82.1 | T3PKS | 1 | 24,968 | naringenin | 100% | BGC0001310 |
| Region 85.1 | NRPS | 1 | 24,166 | mannopeptimycin | 7% | BGC0000388 |
| Region 86.1 | terpene | 1 | 23,742 | hopene | 69% | BGC0000663 |
| Region 88.1 | T1PKS | 1 | 23,954 | candicidin | 23% | BGC0000034 |
| Region 97.1 | NI-siderophore | 1 | 8,015 | ND | ND | ND |
| Region 117.1 | T2PKS | 1 | 20,238 | fredericamycin A | 57% | BGC0000224 |
| Region 121.1 | NRPS | 1 | 20,034 | scabichelin | 30% | BGC0000423 |
| Region 125.1 | terpene | 4,551 | 19,435 | vazabitide A | 13% | BGC0001818 |
| Region 127.1 | terpene | 4,277 | 19,275 | albaflavenone | 100% | BGC0000660 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Region 128.1 | NRPS | 1 | 19,202 | ND | ND | ND |
| Region 135.1 | RiPP-like | 403 | 11,206 | ND | ND | ND |
| Region 171.1 | NRPS | 1 | 14,137 | ulleungmycin | 5% | BGC0001814 |
| Region 177.1 | NI-siderophore | 1 | 7,707 | desferrioxamin B | 100% | BGC0000941 |
| Region 196.1 | NRPS-like | 1 | 12,374 | ND | ND | ND |
| Region 211.1 | T1PKS | 1 | 11,212 | oligomycin | 38% | BGC0000117 |
| Region 216.1 | NRPS | 1 | 10,562 | ND | ND | ND |
| Region 246.1 | ectoine | 1,291 | 9,167 | ectoine | 100% | BGC0000853 |
| Region 257.1 | RiPP-like | 2,234 | 8,502 | ND | ND | ND |
| Region 285.1 | lanthipeptide-class-iii | 1 | 7,155 | AmfS | 40% | BGC0000496 |
| Region 288.1 | NRPS | 1 | 7,084 | ND | ND | ND |
| Region 336.1 | NRPS | 1 | 5,594 | ND | ND | ND |
| Region 342.1 | T1PKS | 1 | 5,412 | ND | ND | ND |
| Region 353.1 | LAP,RRE-containing | 1 | 5,163 | ND | ND | ND |
| Region 368.1 | NRPS-like | 1 | 4,613 | ND | ND | ND |
| Region 392.1 | NRPS-like | 1 | 4,101 | rotihibin A | 28% | BGC0002367 |
| Region 405.1 | RiPP-like | 1 | 3,697 | ND | ND | ND |
| Region 504.1 | NRPS | 1 | 1,712 | ND | ND | ND |
| Region 519.1 | NRPS-like | 1 | 1,535 | ND | ND | ND |
| Region 541.1 | terpene | 1 | 1,308 | carotenoid | 18% | BGC0000633 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: ND - não determinado. O (*) representa um BGC híbrido.

**APÊNDICE B - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO MPUR-31.3**

| Region | Biosynthetic Class | Genome region (nucleotide) | | Most similar known cluster | Similarity | MIBiG ID |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Start | Stop | | | |
| Region 1.1 | NRPS,ladderane,NRPS-like | 1 | 50,140 | colibrimycin | 42% | BGC0002100 |
| Region 5.1 | butyrolactone | 6,840 | 17,580 | | ND | ND |
| Region 14.1 | NRPS | 5,428 | 29,831 | CDA1b/CDA2a/CDA2b/CDA3a/CDA3b/CDA4a/CDA4b | 15% | BGC0000315 |
| Region 22.1 | NRPS,phosphonate | 1 | 23,085 | dehydrofosmidomycin | 15% | BGC0002036 |
| Region 25.1 | LAP | 1 | 24,995 | | ND | ND |
| Region 28.1 | NI-siderophore | 7,582 | 21,083 | peucechelin | 10% | BGC0002466 |
| Region 35.1 | NAPAA,NRPS | 1 | 21,216 | stenothricin | 13% | BGC0000431 |
| Region 41.1 | RiPP-like | 2,902 | 13,261 | griselimycin | 7% | BGC0001414 |
| Region 46.1 | NI-siderophore | 8,981 | 19,154 | desferrioxamin B/desferrioxamine E | 66% | BGC0000940 |
| Region 47.1 | NRPS | 1 | 19,057 | coelibactin | 18% | BGC0000324 |
| Region 72.1 | terpene | 1 | 14,844 | hopene | 61% | BGC0000663 |
| Region 80.1 | RiPP-like | 2,321 | 12,536 | informatipeptin | 28% | BGC0000518 |
| Region 83.1 | NRP-metallophore,NRPS | 1 | 13,811 | thiazostatin/watasemycin A/watasemycin B/2-hydroxyphenylthiazoline | 20% | BGC0001801 |
| Region 84.1 | NRPS | 1 | 13,787 | enantiopyochelin/isopyochelin griselimycin | 11% | BGC0001414 |
| Region 109.1 | T3PKS | 1 | 12,145 | | ND | ND |
| Region 118.1 | lassopeptide | 1 | 11,855 | ikarugamycin | 8% | BGC0001435 |
| Region 126.1 | NRPS | 1 | 11,576 | glycinocin A | 9% | BGC0000379 |
| Region 136.1 | T2PKS | 1 | 11,236 | spore pigment | 58% | BGC0000271 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Region 145.1 | NRPS-like | 1 | 10,868 | guadinomine/guadinomine B/guadinomic acid | 19% | BGC0000998 |
| Region 151.1 | NRPS-like | 1 | 10,649 | diisonitrile antibiotic SF2768 | 22% | BGC0001574 |
| Region 155.1 | ladderane | 1 | 10,525 | metatricycloene | 6% | BGC0001369 |
| Region 168.1 | NRPS-like,betalactone | 1 | 10,036 | ε-Poly-L-lysine | 100% | BGC0002174 |
| Region 172.1 | terpene | 1 | 9,906 | albaflavenone | 100% | BGC0000660 |
| Region 181.1 | butyrolactone | 2,155 | 9,655 | gaburedin A/gaburedin B/gaburedin C/gaburedin D/gaburedin E/gaburedin F | 20% | BGC0002578 |
| Region 212.1 | NRPS | 1 | 8,819 | surugamide A/surugamide D | 23% | BGC0001792 |
| Region 217.1 | NRPS | 1 | 8,723 | | ND | ND |
| Region 222.1 | NI-siderophore | 671 | 8,632 | | ND | ND |
| Region 234.1 | ectoine | 332 | 8,269 | ectoine | 100% | BGC0002052 |
| Region 245.1 | butyrolactone | 1 | 7,115 | | ND | ND |
| Region 258.1 | NRPS-like | 1 | 7,863 | | ND | ND |
| Region 319.1 | butyrolactone | 1 | 6,968 | | ND | ND |
| Region 370.1 | T1PKS | 1 | 6,335 | 1-heptadecene | 100% | BGC0001164 |
| Region 371.1 | terpene | 1 | 6,326 | | ND | ND |
| Region 374.1 | NRPS | 1 | 6,297 | diisonitrile antibiotic SF2768 | 38% | BGC0001574 |
| Region 387.1 | terpene | 1 | 6,150 | geosmin | 100% | BGC0001181 |
| Region 497.1 | NRPS | 1 | 5,000 | atratumycin | 7% | BGC0001975 |
| Region 498.1 | NRPS | 1 | 4,995 | | ND | ND |
| Region 523.1 | melanin | 1 | 4,823 | melanin | 42% | BGC0000908 |
| Region 539.1 | NRPS | 1 | 4,677 | | ND | ND |
| Region 585.1 | ladderane | 1 | 4,208 | triacsin C | 15% | BGC0001983 |
| Region 589.1 | T1PKS | 1 | 4,176 | | ND | ND |
| Region 591.1 | T1PKS | 1 | 4,160 | primycin | 10% | BGC0001447 |
| Region 595.1 | NRPS | 1 | 4,119 | | ND | ND |
| Region 613.1 | NRPS-like | 1 | 4,030 | | ND | ND |
| Region 615.1 | RRE-containing | 1 | 4,015 | | ND | ND |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Region 744.1 | NRPS | 1 | 3,220 | ND | ND |
| Region 751.1 | NRPS | 1 | 3,172 | ND | ND |
| Region 765.1 | RiPP-like | 1 | 3,070 | ND | ND |
| Region 809.1 | RiPP-like | 1 | 2,868 | ND | ND |
| Region 820.1 | NRPS-like | 1 | 2,795 | ND | ND |
| Region 872.1 | NRPS | 1 | 2,538 | ND | ND |
| Region 936.1 | NRPS | 1 | 2,300 | ND | ND |
| Region 970.1 | NRPS-like | 1 | 2,167 | ND | ND |
| Region 971.1 | NI-siderophore | 1 | 2,157 | ND | ND |
| Region 972.1 | NRPS-like | 1 | 2,155 | ND | ND |

Fonte: O autor (2023).
Nota: ND - não determinado. O (*) representa um BGC híbrido.

**APÊNDICE C - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO MPUR-51.7**

| Region | Biosynthetic Class | Genome region (nucleotide) | | Most similar known cluster | Similarity | MIBiG ID |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Start | Stop | | | |
| Region 1.1 | NRPS,LAP | 1 | 80,297 | surugamide A / surugamide D | 61% | BGC0001792 |
| Region 5.1 | NRPS | 1 | 23,758 | scabichelin | 30% | BGC0000423 |
| Region 10.1 | NRPS | 1,071 | 39,259 | cyclofaulknamycin | 75% | BGC0002358 |
| Region 14.1 | terpene | 7,589 | 28,959 | vazabitide A | 13% | BGC0001818 |
| Region 18.1 | terpene | 1 | 15,061 | albaflavenone | 100% | BGC0000660 |
| Region 19.1 | T1PKS | 1 | 34,074 | ECO-0501 | 14% | BGC0002098 |
| Region 21.1 | NRPS | 1 | 29,240 | diisonitrile antibiotic SF2768 | 66% | BGC0001574 |
| Region 25.1 | NRPS,T1PKS | 1 | 31,966 | antimycin | 100% | BGC0000958 |
| Region 34.1 | T1PKS | 1 | 29,422 | niphimycins C-E | 22% | BGC0001700 |
| Region 37.1 | lassopeptide | 10,901 | 29,088 | cosmomycin C | 5% | BGC0001558 |
| Region 46.1 | terpene | 1 | 20,286 | geosmin | 100% | BGC0001181 |
| Region 49.1 | NRPS,T1PKS | 1 | 25,482 | SGR PTMs / SGR PTM Compound b / SGR PTM Compound c / SGR PTM Compound d | 100% | BGC0001043 |
| Region 57.1 | NRPS-like,T1PKS | 1 | 24,119 | candicidin | 71% | BGC0000034 |
| Region 60.1 | NI-siderophore | 12,673 | 23,897 | desferrioxamin B | 80% | BGC0000941 |
| Region 66.1 | NRPS-like | 1 | 23,042 | valinomycin / montanastatin | 8% | BGC0001846 |
| Region 67.1 | NRPS | 1 | 22,866 | dudomycin A | 13% | BGC0002359 |
| Region 72.1 | T3PKS | 1 | 22,334 | naringenin | 100% | BGC0001310 |
| Region 73.1 | NRPS-like | 1 | 22,297 | minimycin | 80% | BGC0002295 |
| Region 89.1 | T2PKS | 1 | 19,530 | fredericamycin A | 60% | BGC0000224 |
| Region 119.1 | T1PKS | 1 | 15,848 | J1-001-2 | 34% | BGC0002559 |
| Region 128.1 | T1PKS | 1 | 15,331 | ND | ND | ND |
| Region 137.1 | NRPS | 1 | 14,630 | ND | ND | ND |
| Region 152.1 | lanthipeptide-class-ii,NRPS,T1PKS | 1 | 13,530 | ND | ND | ND |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Region 153.1 | NI-siderophore | 5,556 | 13,530 | ND | ND | ND |
| Region 187.1 | terpene | 1 | 11,750 | hopene | 30% | BGC0000663 |
| Region 218.1 | T1PKS | 1 | 10,355 | ND | ND | ND |
| Region 226.1 | NI-siderophore | 3,119 | 10,046 | ND | ND | ND |
| Region 227.1 | NRPS-like | 1 | 10,014 | rotihibin A | 28% | BGC0002367 |
| Region 280.1 | NRPS | 1 | 8,140 | surugamide A / surugamide D | 38% | BGC0001792 |
| Region 324.1 | terpene | 1 | 6,918 | ND | ND | ND |
| Region 340.1 | ectoine | 1 | 6,520 | ectoine | 100% | BGC0000853 |
| Region 363.1 | lanthipeptide-class-iii | 1 | 6,112 | gobichelin A / gobichelin B | 11% | BGC0000366 |
| Region 392.1 | RiPP-like | 1 | 5,516 | ND | ND | ND |
| Region 415.1 | T1PKS | 1 | 5,092 | ND | ND | ND |
| Region 428.1 | NRPS-like | 1 | 4,900 | ND | ND | ND |
| Region 429.1 | NRPS | 1 | 4,871 | ND | ND | ND |
| Region 458.1 | T1PKS | 1 | 4,400 | ND | ND | ND |
| Region 551.1 | NRPS | 1 | 3,114 | ND | ND | ND |
| Region 558.1 | NRPS | 1 | 3,075 | ND | ND | ND |
| Region 572.1 | LAP | 1 | 2,892 | ND | ND | ND |
| Region 602.1 | RiPP-like | 1 | 2,591 | ND | ND | ND |
| Region 663.1 | RiPP-like | 1 | 2,110 | ND | ND | ND |
| Region 674.1 | terpene | 1 | 2,004 | ND | ND | ND |
| Region 706.1 | RRE-containing | 1 | 1,784 | ND | ND | ND |
| Region 708.1 | RiPP-like | 1 | 1,773 | streptamidine | 16% | BGC0002115 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: ND - não determinado. O (*) representa um BGC híbrido.

**APÊNDICE D - *BIOSYNTHETIC GENE CLUSTERS* (BGCS) PREDITOS NO GENOMA COMPLETO DO ISOLADO SOL-159**

| Region | Biosynthetic Class | Genome region (nucleotide) | | Most similar known cluster | Similarity | MIBiG ID |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Start | Stop | | | |
| Region 1.1 | phosphonate,RRE-containing,NRPS,T1PKS,ectoine | 224,587 | 309,868 | showdomycin | 23% | BGC0001778 |
| Region 1.2 | melanin | 440,943 | 446,289 | melanin | 28% | BGC0000908 |
| Region 3.1 | thiopeptide | 7,529 | 43,985 | radamycin / globimycin | 88% | BGC0001753 |
| Region 3.2 | NRPS | 211,458 | 258,816 | auroramycin | 20% | BGC0001522 |
| Region 5.1 | terpene | 151 | 14,388 | hopene | 53% | BGC0000663 |
| Region 5.2 | terpene,RiPP-like | 45,333 | 68,849 | ebelactone | 5% | BGC0001580 |
| Region 5.3 | NI-siderophore | 97,757 | 112,578 | peucechelin | 30% | BGC0002466 |
| Region 5.4 | NRPS-like | 129,255 | 171,852 | vazabitide A | 15% | BGC0001818 |
| Region 6.1 | lassopeptide | 144,065 | 166,680 | citrulassin D | 100% | BGC0001550 |
| Region 10.1 | terpene | 81,210 | 102,277 | A-47934 | 5% | BGC0000290 |
| Region 11.1 | lanthipeptide-class-i | 58,690 | 84,012 | pyrrolomycin A / pyrrolomycin B / pyrrolomycin C / pyrrolomycin D | 5% | BGC0000130 |
| Region 12.1 | NI-siderophore | 83,095 | 94,924 | desferrioxamin B | 100% | BGC0000941 |
| Region 25.1 | indole | 43,038 | 66,316 | rebeccamycin | 25% | BGC0000821 |
| Region 26.1 | T2PKS,RiPP-like | 50,014 | 92,707 | xantholipin | 32% | BGC0000279 |
| Region 29.1 | RiPP-like | 72,345 | 84,678 | ND | ND | ND |
| Region 38.1 | melanin | 60,580 | 71,008 | istamycin | 8% | BGC0000700 |
| Region 45.1 | T1PKS,betalactone | 26,528 | 69,095 | A-201A | 6% | BGC0000873 |
| Region 48.1 | T3PKS,terpene | 1 | 44,487 | flaviolin | 75% | BGC0000902 |
| Region 49.1 | CDPS | 1 | 17,072 | malacidin A / malacidin B | 5% | BGC0001448 |
| Region 54.1 | ectoine | 49,397 | 58,429 | ectoine | 100% | BGC0000853 |
| Region 71.1 | NI-siderophore | 14,802 | 29,354 | synechobactin C9 / synechobactin C11 / synechobactin 13 / synechobactin 14 / synechobactin | 9% | BGC0002470 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 16 / synechobactin A / synechobactin B / synechobactin C | | |
| Region 72.1 | NRPS | 1 | 38,348 | malonomycin | 38% | BGC0001942 |
| Region 74.1 | terpene | 25,133 | 37,105 | hopene | 15% | BGC0000663 |
| Region 95.1 | T3PKS | 1 | 19,866 | flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene | 66% | BGC0002127 |

Fonte: O autor (2023).
Nota: ND - não determinado. O (*) representa um BGC híbrido.