



**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO
TRÓPICO ÚMIDO – PPG/ATU**

**MINERAÇÃO GÊNICA E PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS DO
METABOLISMO SECUNDÁRIO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
SEDIMENTOS DOS RIOS MADEIRA E SOLIMÕES.**

GERODES VASCONCELOS DA COSTA

**MANAUS/AMAZONAS
Janeiro, 2024**

GERODES VASCONCELOS DA COSTA

**MINERAÇÃO GÊNICA E PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS DO
METABOLISMO SECUNDÁRIO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
SEDIMENTOS DOS RIOS MADEIRA E SOLIMÕES.**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva
Coorientador (a): Dr^a. Claudia Afras de Queiroz
Coorientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

MANAUS/AMAZONAS
Janeiro, 2024



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO MESTRADO

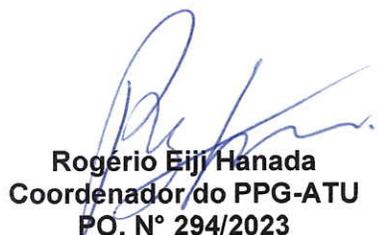
Ata da Defesa Pública de **GERODES VASCONCELOS DA COSTA**, ocorrido no dia 24 de janeiro de 2024, via Google Meet.

Aos vinte e quatro dias de janeiro de 2024, às 14h (horário de Manaus/AM), realizou-se a Defesa Pública de Dissertação de **GERODES VASCONCELOS DA COSTA**, aluno do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Agricultura no Trópico Úmido, intitulada “Mineração gênica e prospecção de compostos do metabolismo secundário de bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões”, sob a orientação do Dr. Gilvan Ferreira da Silva (Embrapa), em conformidade com o Art. 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI/INPA) e Art. 60 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, como parte das atividades para conclusão e obtenção do título de **Mestre em Agricultura no Trópico Úmido**. A **Banca Examinadora** foi constituída pelos seguintes membros: Larissa Kirsch Barbosa (UEA), Adriana Dantas Gonzaga (Ufam) e Marisa Vieira de Queiroz (UFV) e tendo como suplente o seguinte membro: AnaFrancisca Tibúrcia Amorim Ferreira (Ufam). A Presidente da Banca Examinadora deu início à Seção e informou os procedimentos do exame. O aluno fez uma exposição do seu estudo e ao término foi arguido oralmente pelos membros da Comissão. Após as arguições os membros da banca se reuniram para avaliação e chegaram ao seguinte parecer:

Nome	Parecer	Assinaturas
Larissa Kirsch Barbosa	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou () Reprovou	Documento assinado digitalmente gov.br LARISSA KIRSCH BARBOSA Data: 25/01/2024 12:12:48-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Adriana Dantas Gonzaga	(x) Aprovou () Reprovou	gov.br ADRIANA DANTAS GONZAGA DE FREITAS Data: 25/01/2024 10:24:48-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Marisa Vieira de Queiroz	(x) Aprovou () Reprovou	Documento assinado digitalmente gov.br MARISA VIEIRA DE QUEIROZ Data: 24/01/2024 19:08:07-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Menção:	() “Com Distinção” <input checked="" type="checkbox"/> “Com Distinção e Louvor”	

Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata que, após lida e aprovada, foi assinada pela Coordenação:


Gilvan Ferreira da Silva
Orientador


Rogério Eiji Hanada
Coordenador do PPG-ATU
PO. N° 294/2023

Folha de Aprovação

Banca Julgadora, abaixo assinada, **aprova** a Dissertação de Mestrado:

Título: Mineração gênica e prospecção de compostos do metabolismo secundário de bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões

Autor: Gerodes Vasconcelos da Costa

Banca Julgadora:

Documento assinado digitalmente
 **LARISSA KIRSCH BARBOSA**
Data: 25/01/2024 12:12:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Larissa Kirsch Barbosa (UEA)
(Membro titular)

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANA DANTAS GONZAGA DE FREITAS**
Data: 25/01/2024 10:04:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Adriana Dantas Gonzaga (Ufam)
(Membro titular)

Documento assinado digitalmente
 **MARISA VIEIRA DE QUEIROZ**
Data: 24/01/2024 19:01:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Marisa Vieira de Queiroz (UFV)
(Membro titular)

Manaus (AM), 24 de janeiro de 2024.

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

C837m Costa, Gerodes

Mineração gênica e prospecção de compostos do metabolismo secundário de bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões. / Gerodes Vasconcelos da Costa; orientador Gilvan Ferreira da Silva; coorientadores Claudia Afras de Queiroz, Hector Henrique Ferreira Koolen. - Manaus: [s.l.], 2024.

6,00 MB

103p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agricultura em Trópico Úmido) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2024.

1. Mineração do genoma. 2. Metabólitos secundários. 3. Bactérias. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Queiroz, Claudia Afras de. III. Koolen, Hector Henrique Ferreira. IV. Título

CDD 572.86 811 3

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha família. Primeiramente a minha mãe Rosenilda Marques de Vasconcelos, por todo auxílio, incentivo e apoio que tem dado durante minha vida pessoal e acadêmica. Segundo o meu pai Gerimar de Assis Costa, um homem que admiro muito e que sou grande fã. E também a meus irmãos pelo apoio e incentivo para que concluísse essa importante etapa da minha vida.

Agradecimentos

À minha família por todo o suporte, principalmente a minha mãe Rosenilda pelo incentivo que tem dado e todo apoio e ensinamento. A meu pai Gerimar por todos os ensinamentos.

Aos meus irmãos Maria Rosely, Gezebel, Maribel e Rugeri por todo apoio e companhia.

Ao meu orientador Dr. Gilvan Ferreira da Silva, por ter me recebido e me orientado, e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desse período, obrigado pela paciência e compreensão e por ser um exemplo de professor e pesquisador.

À minha co-orientadora Dr^a. Claudia Afras de Queiroz, pela grande amizade, dedicação e por todo ensinamento que tem compartilhado durante essa etapa importante da minha vida, obrigada pela paciência e compreensão em tantos momentos em que eu estava perdido e você me aconselhou.

Agradeço também ao meu co-orientador Hector Henrique Ferreira Koolen, pelo ensino, formação e suporte, e é um grande professor que me acolheu no seu grupo.

Quero agradecer ao meu amigo Thiago Fernandes, uma pessoa que tem me ensinado bastante sobre mineração genômica e tem sido um amigo paciente e compreensível.

Agradeço a minha grande amiga Carolina de Amorim por sempre me ajudar.

Agradeço ao Valdir Mendes, um grande amigo que sempre tem me apoiado.

Ao Laboratório de biologia molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, pela estrutura necessária para que os objetivos desta dissertação fossem realizados.

Os técnicos do Laboratório de biologia molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, Jeferson e Irani por serem tão atenciosos, e todos os meus colegas do grupo de pesquisa.

Agradeço ao grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas da Universidade do Estado do Amazonas, em especial aos meus amigos Weider, Débora Raposo por todo auxílio.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela oportunidade de realizar a pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido

Aos professores do curso de Pós-Graduação pela dedicação e pelos valiosos ensinamentos.

A todos meus amigos que me acompanharam e participaram do meu crescimento pessoal e profissional e a todos aqueles que me apoiaram nesta jornada acadêmica.

Às agências de fomento à pesquisa que financiaram o trabalho: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, (POSGRAD – Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu) e ao CNPQ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Programa de Apoio à Pós-graduação da Amazônia Legal - PDPG-AMAZONIA-LEGAL, número do processo: 88887.602108/2021-00) pela bolsa de estudo concedida.

A todos, Muito Obrigado!

Epígrafe

Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.

Carl Sagan

Resumo

A Amazônia, com sua vasta bacia hidrográfica e diversidade de ecossistemas, abriga uma grande variedade de espécies bacterianas, incluindo *Bacillus* e *Streptomyces*, conhecidas por seu potencial na produção de moléculas de interesse biotecnológico. Com os avanços das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e a mineração genômica, a identificação de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) envolvidos na biossíntese de novos metabólitos se tornou uma abordagem essencial na descoberta de compostos bioativos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar linhagens bacterianas isoladas dos rios Madeira e Solimões, investigando sua capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos, promover o crescimento vegetal e produzir enzimas e metabólitos secundários de interesse. O estudo, realizado envolveu a análise de seis linhagens bacterianas (MAD34, MAD51, MAD1003, MAD142, SOL105 e SOL146), das quais quatro tiveram seus genomas sequenciados. Os genomas apresentaram tamanhos variando de 4.664.203 pb a 6.244.542 pb, com conteúdo G+C entre 66,6% e 72,0% e regiões codificadoras (CDS) entre 4.304 e 8.066. Análises comparativas revelaram a presença de três novas espécies: MAD51, MAD1003 e SOL105, com valores de dDDH abaixo do ponto de corte de 70% (46,4% a 54,9%), também corroborado com valores de ANI e AAI menor que o ponto de corte para novas espécies. A análise de pangenoma indicou a presença de genes únicos relacionados à biossíntese de antibióticos como fenazina, ligação de íons metálicos, processo biossintético da piridoxina, ligação de ATP e processos virais. Ensaio funcionais demonstraram o potencial das linhagens para a produção de enzimas extracelulares, sideróforos, solubilização de fosfato e produção de ácido indolacético (AIA), com destaque para as linhagens MAD142 (67,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e SOL146 (70,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Nos testes de antagonismo, a linhagem MAD34 apresentou os melhores resultados, com índices de inibição variando de 54,70% a 90,47% contra diferentes fitopatógenos. As linhagens *Bacillus* sp. MAD142 e *Streptomyces* sp. MAD51 também se destacaram, com taxas de inibição acima de 70% e 50%, respectivamente, sendo os menores índices observados para *Stenotrophomonas* SOL105. A mineração genômica revelou a presença de BGCs com vias já caracterizadas para a biossíntese de diversos metabólitos, como policetídeos (tetracenomicina C, pigmento de esporo e flaviolina), sideróforos e peptídeos não ribossomais (NRPs). A linhagem MAD34 apresentou um total de 17 BGCs, sendo seis com similaridade menor que 50%. Já a linhagem MAD51 exibiu 39 clusters, com 10 BGCs apresentando similaridade acima de 80%. A MAD1003 apresentou 24 clusters, sendo nove com similaridade acima de 80%. Por fim, a SOL105 apresentou a menor quantidade de BGCs, com um total de quatro clusters e similaridade de 57%. Esses resultados reforçam a importância da bioprospecção em ecossistemas amazônicos para a identificação de novos recursos genéticos com foco no desenvolvimento de soluções sustentáveis para a agricultura.

Palavras-Chave: Antagonismo, Mineração genômica, clusters de genes biossintéticos (BGCs), Biocontrole.

Abstract

The Amazon, with its vast river basin and diversity of ecosystems, is home to a wide variety of bacterial species, including *Bacillus* and *Streptomyces*, known for their potential in the production of molecules of biotechnological interest. With advances in next-generation sequencing (NGS) technologies and genome mining, the identification of biosynthetic gene clusters (BGCs) involved in the biosynthesis of new metabolites has become an essential approach in the discovery of bioactive compounds. In this context, the present work aimed to evaluate bacterial strains isolated from the Madeira and Solimões rivers, investigating their ability to inhibit the growth of phytopathogens, promote plant growth and produce enzymes and secondary metabolites of interest. The study involved the analysis of six bacterial strains (MAD34, MAD51, MAD1003, MAD142, SOL105 and SOL146), four of which had their genomes sequenced. The genomes had sizes ranging from 4,664,203 bp to 6,244,542 bp, with G+C content between 66.6% and 72.0% and coding regions (CDS) between 4,304 and 8,066. Comparative analyzes revealed the presence of three new species: MAD51, MAD1003 and SOL105, with dDDH values below the cutoff point of 70% (46.4% to 54.9%), also corroborated with ANI and AAI values lower than the cutoff point for new species. A pangenome analysis indicated the presence of unique genes related to the biosynthesis of antibiotics such as phenazine, metal ion binding, pyridoxine biosynthetic process, ATP binding and viral processes. Functional assays demonstrated the potential of the strains for the production of extracellular enzymes, siderophores, phosphate solubilization and production of indoleacetic acid (IAA), with emphasis on strains MAD142 (67.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and SOL146 (70.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In antagonism tests, the MAD34 strain presented the best results, with inhibition rates ranging from 54.70% to 90.47% against different phytopathogens. The *Bacillus* sp. MAD142 and *Streptomyces* sp. MAD51 also stood out, with protection rates above 70% and 50%, respectively, being the lowest rates collected for *Stenotrophomonas* SOL105. Genomic mining revealed the presence of BGCs with already described pathways for the biosynthesis of several metabolites, such as polyketides (tetracenomycin C, spore pigment and flaviolin), siderophores and non-ribosomal peptides (NRPs). The MAD34 lineage presented a total of 17 BGCs, six of which had similarity less than 50%. The MAD51 lineage exhibited 39 clusters, with 10 BGCs showing similarity above 80%. MAD1003 presented 24 clusters, nine of which had similarity above 80%. Finally, SOL105 presented a smaller number of BGCs, with a total of four clusters and a similarity of 57%. These results reinforce the importance of bioprospecting in Amazonian ecosystems for identifying new genetic resources with a focus on developing sustainable solutions for agriculture.

Keywords: Antagonism, Genomic mining, biosynthetic gene clusters (BGCs), Biocontrol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 O GÊNERO <i>Bacillus</i>	18
2.2 GÊNERO <i>Streptomyces</i>	21
2.3 POTENCIAL DE BACTÉRIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 GERAL.....	24
3.2 ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	25
4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA MICROBIANA	26
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA, SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA.....	26
4.4 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÔMICA E ANÁLISE PANGENÔMICA.....	27
4.5 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS.....	28
4.5.1 Produção de enzimas.....	28
4.5.1.1 Revelação da atividade enzimática.....	29
4.5.3 Identificação de genes relacionados a promoção de crescimento vegetal (vias de biossíntese para auxinas (AIA), giberelina e citocinina)	30
4.5.2 Produção de sideróforo e solubilização de fosfato.....	30
4.5.4 Produção de ácido indolacético (AIA)	30
4.6 AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA FITOPATÓGENOS.....	31
4.9 MINERAÇÃO GENÔMICA E PROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	33
5.2 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÔMICA DOS ISOLADOS	34
5.2.1 Sequenciamento, anotação do genoma.....	34
5.2.2 Identificação taxonômica baseada em valores de GGDC e dDDH	38
5.2.3 Identificação baseada em valores de ANI e AAI	43
5.2.4 Análise de Pangenoma	46
5.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE AGRÍCOLA E INDUSTRIAL.....	48
5.4 CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS RELACIONADAS À PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL	51
5.4.1 Produção de sideróforo e Solubilização de fosfato	51
5.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)	53
5.6 POTENCIAL ANTAGONISTA NO CONTROLE <i>in vitro</i> CONTRA FITOPATÓGENOS	54
5.7 MINERAÇÃO GENÔMICA E PROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	57
6 CONCLUSÕES	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
Suplemento	90

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Lista das bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões, utilizadas neste trabalho 25
- Tabela 2.** Composição dos meios de cultura utilizados para atividade enzimática 29
- Tabela 3.** Lista de fitopatógenos utilizados para avaliar a atividade antagonista dos isolados SOL105, SOL146, MAD34 e MAD142, MAD51, MAD1003..... 32
- Tabela 4.** Características gerais da anotação de quatro linhagens analisadas, comparadas com com strains de referência pesquisadas no Taxonomy Database do NCBI..... 34
- Tabela 5.** Valores de hibridização digital DNA-DNA (dDDH) e conteúdo G+C das linhagens Isoladas dos Rios Madeira e Rio Solimões. Todos os valores foram calculados utilizando a ferramenta TYGS e estimados usando o Genome to Genome Distance Calculator - GGDC..... 39
- Tabela 6.** Valores das médias da identidade nucleotídica (ANI, ANIb e ANIm) e identidade média de aminoácidos (AAI). Os valores de AAI foram calculados no servidor Kosta Lab utilizando a ferramenta *AAI Average Amino acid Identity* (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>) utilizando os parâmetros padrão 43
- Tabela 7.** Resultados da presença de atividades enzimáticas das 6 bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões..... 49
- Tabela 8.** Resultados de solubilização de fosfato de bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões 52
- Tabela 9.** Concentração de ácido indolacético (AIA) produzidas pelas linhagens de bactérias isoladas dos rios Solimões e rio Madeira, a tabela mostra a absorvância e a concentração de AIA produzida por cada isolado..... 54

Lista de Figura

- Figura 1.** Principais classes de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*..... 19
- Figura 2.** (A) Visão geral dos diferentes mecanismos benéficos que microrganismos fornecem às plantas. (B) Representa as diferentes propriedades bioativas produzidas por *Bacillus* sp. como: Antagonismo, atividade enzimática, produção de sideróforo, atividade antimicrobiana. Fonte: SAXENA *et al.*, 2019 20
- Figura 3.** Ativação dos isolados dos rios Madeira e Solimões. A) MAD142, B) SOL105, C) SOL146 e D) MAD34 cultivada em meio LB (*Luria Bertani*), As linhagens E MAD51 e F) MAD1003 cultivadas em meio ISP2 (*International Streptomyces Project 2*) 25
- Figura 4.** Aspectos macromorfológicos da colônia e microscopia eletrônica de Varredura (MEV) dos isolados cultivados em meio LB a 28 °C por três dias. As linhagens de *Bacillus* sp. são mostradas em A (MAD142) e D (SOL146). *Pseudomonas* sp. MAD34 em B, e *Stenotrophomonas* SOL105 em C. SOL indica isolados do Rio Solimões e MAD isolados do Rio Madeira. A barra em cada figura representa a escala de 1µm 33
- Figura 5.** Morfologia das linhagens de *Streptomyces* sp. MAD51 e MAD1003. Linhagem MAD51 cultivada em meio ISP2 (A) e em meio ISP4 (B). Linhagem MAD1003 cultivada em meio ISP2 (C) e em meio ISP4 (D). Todas as linhagens foram cultivadas a 28 °C por 10 dias. À direita, aspectos morfológicos de cada linhagem obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A barra de cada figura representa a escala de 1µm. 34
- Figura 6.** Visão do gráfico circular do genoma da linhagem MAD34. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita)..... 35
- Figura 7.** Visão circular do genoma da linhagem MAD51 (esquerda) e as regiões anotadas. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita) 36
- Figura 8.** Visão circular do genoma da linhagem MAD1003 (esquerda) e as regiões anotadas. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita) 37

- Figura 9.** Visão circular do genoma da linhagem SOL105 (esquerda) e as regiões anotadas. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita) 38
- Figura 10.** Árvore filogenética construída pelo TYGS baseada no rascunho do genoma completo do isolado MAD34 e as linhagens tipo de *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071. 40
- Figura 11.** Árvore filogenética baseada em sequências genômicas das isolado MAD51 e as strains tipo mais próximo relacionadas no banco de dados TYGS ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/)), mostrando a relação entre o isolado MAD51 e com *Streptomyces costaricanus*. 41
- Figura 12.** Árvore filogenética baseada em sequências genômicas das isolado MAD1003 e as strains tipo mais próximo relacionadas no banco de dados TYGS (<https:// tygs.dsmz.de/>), mostrando a relação entre o isolado MAD51 e com *Streptomyces bauhinae* Bv016T como espécie tipo relacionadas..... 41
- Figura 13.** Árvore filogenética baseada em sequências genômicas das isolado SOL105 e as strains tipo mais próximo relacionadas no banco de dados TYGS (<https:// tygs.dsmz.de/>), mostrando a relação entre o isolado SOL105 com *Stenotrophomonas pavanii* DSM25135 e *Stenotrophomonas sepiila* SM16975^T. 42
- Figura 14.** Heatmap dos valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) por ortologia (OrthoANI) entre o isolado MAD34 e as linhagens das espécies a quatro espécies de *Pseudomonas*, tendo como espécie tipo mais relacionadas *Pseudomonas aeruginosa*. 44
- Figura 15.** Heatmap dos valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) por ortologia (OrthoANI). Valores de ANI do isolado MAD51 comparados com duas linhagens de *Streptomyces*, tendo espécies *Streptomyces murinus* como espécie tipo mais relacionadas (A). Valores de ANI do isolado MAD1003 alinhadas a duas linhagens de *Streptomyces*, tendo espécies de *Streptomyces bauhinae* como espécie tipo mais relacionadas (B). 45
- Figura 16.** Heatmap dos valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) do isolado SOL105 baseada nos resultados de TYG com espécies intimamente próximas. 46
- Figura 17.** Atividade proteolítica de bactérias, presente em dois meios diferentes. Na fileira superior, os isolados foram testados em ágar leite. A fileira inferior mostra atividade proteolítica em meio ágar gelatina. A presença do halo ao redor da colônia mostra atividade positiva 50

- Figura 18.** Produção de sideróforo em meio CAS por bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões. A presença de halo amarelo mostra a capacidade de produzir sideróforo. 51
- Figura 19.** Solubilização de fosfato de de bactérias isoladas. dos rios Madeira e Solimões em placas contendo quatro meios diferentes: ágar fosfato AlPO_4 , ágar fosfato de FePO_4 , Meio Pikovskaya (PVK) e meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth*). 53
- Figura 20.** Atividade antagonista de 6 isolados de bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões, contra 13 fitopatógenos, onde a primeira coluna à esquerda indica o controle, utilizando placas com apenas o fitopatógenos, e as colunas da direita mostra o co-cultivo das linhagens pela técnica de cultura dupla..... 56
- Figura 21.** Representação das BGCs das quatro linhagens estudadas, mostrando que as classes mais abundantes são as categorias: *Others*, T2PKS, RiPP-like e Terpeno..... 58
- Figura 22.** Número e classe de clusters de genes biossintéticos (BGC) relacionados a biossíntese de metabólitos secundários identificados na linhagem *Pseudomonas aeruginosa* MAD34 58
- Figura 23.** Alinhamento de sintonia do BGC 1.1 da linhagem MAD34 com os BGCs da linhagem tipo *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 e o BGC já caracterizado do MIBiG (BGC 0000287), mostrando os genes semelhantes para a biossíntese de L-2-amino-4-metoxi-trans-3-butenóico..... 59
- Figura 24.** Alinhamento do BGC da região 2.3 da linhagem de *P. aeruginosa* MAD34 com o BGC da linhagem tipo *P.aeruginosa* DSM 50071 e o BGC de azetidomonamida A e azetidomonamida B caracterizado e depositado no MIBiG com o código de entrada BGC0002037 60
- Figura 25.** Análise de sintonia da linhagem de *P. aeruginosa* MAD34 na região 3.1, comparado com o BGC da linhagem tipo *P. aeruginosa* DSM 50071 e o cluster da molécula metalóforo chamado pseudopalina (BGC0002489) depositado no MIBiG. Os espaços escuros mostram genes semelhantes presentes nos clusters 61
- Figura 26.** Sintonia do BGC 11.1 da linhagem MAD34, alinhado com o BGC de *P. aeruginosa* DSM 50071 e o BGC do metabólito secundário cianeto de hidrogênio depositado com entrada no MIBiG com código (BGC0002345). Os espaços escuros mostram genes semelhantes presentes nos clusters..... 62
- Figura 27.** Gráfico dos clusters de genes biossintéticos (BGC) com os metabólitos secundários preditos na linhagem *Streptomyces* sp. MAD51... 63
- Figura 28.** Alinhamento de sintonia do cluster da Linhagem de *Streptomyces* sp MAD51 onde A) mostra a região do BGC 1.1 da linhagem de *Streptomyces* sp MAD51 alinhado com o BGC depositado no banco de dados MIBiG (BGC0000848). B) mostra a análise de sintonia dos terpenos (geosmina -

BGC0001181) identificados nas regiões 14.1 **C)** a Sintenia do clusters (hopene - BGC0000663) do BGC 21.1. Os espaços escuros mostram genes semelhantes..... 64

Figura 29. Análise de sintenia dos cluster dos policetídeos presente na linhagem *Streptomyces* sp MAD51. A) Mostra o alinhamento da região do BGC 2.1 com o BGC depositado no banco de dados MIBiG para biossíntese de pigmento de esporo (BGC0000271). B) Sintenia do cluster da região 6.1 para biossíntese de policetídeos T2PKS com o BGC da via de biossíntese do antibiótico tetracenomicina C com entrada MIBiG BGC0000275 **C)** A Sintenia do clusters da T3PKS flaviolina (BGC0002127) com o BGC da região 35.1. Os espaços escuros mostram genes semelhantes 65

Figura 30. Análise de sintenia dos cluster da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003. A) Mostra a região 44.1 do BGC da via de biossíntese para molécula de sideróforo alinhada com o BGC depositado no banco de dados MIBiG para a biossíntese da molécula de desferroxamine B/desferroxamina E (BGC0000940). B) Análise de sintenia de ectoína (entrada MIBiG BGC0000853) identificados nas regiões 53.1 **C)** Sintenia do clusters para melanina do BGC 119.1 compara com os dados do BGC do MIBiG - (BGC0002127). Os espaços escuros mostram genes semelhantes..... 66

Figura 31. Gráfico com os clusters de genes biossintéticos (BGC) preditos na linhagem *Streptomyces* sp MAD1003 67

Figura 32. Sintenia dos genes pertencentes ao BGCs caracterizados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003 A) Região 1.1 com o BGC escabichelina (BGC0000423). B) ectoína (entrada MIBiG BGC0000853) identificados nas regiões 27.1 C) Sintenia do clusters região 74.1 desferrioxamina B/E (BGC0000940)..... 68

Figura 33. Sintenia dos genes pertencentes dos BGCs das classes dos terpenos caracterizados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003. A) hopene - BGC0000663 (região 17.1 92% de similaridade) B) albaflavenona - BGC0000660 região 24.1 100% de similaridade C) e geosmina - BGC0001181 região 50.1 com 100% de similaridade..... 69

Figura 34. Sintenia dos genes pertencentes dos BGCs das classes dos policetídeos T2PKS e T3PKS caracterizados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003. A) flaviolina (Número de acesso MIBiG:BGC0002127) B) alquilresorcinol (BGC0000282); C) e pigmento de esporos (BGC0000271). 70

Figura 35. Gráfico dos BGCs preditos na linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105, mostrando o total das classes de moléculas preditos com base em genoma. 71

Figura 36. Sintenia do Cluster gênico biossintético para produção de ácidos carboxílicos APE Vf, as cores representam os genes presentes no genoma da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105 na parte superiores, com o BGC depositado no MIBiG..... 71

Figura 37. Sintenia do Cluster gênico biossintético para produção do siderofo 2,3-dihidroxi benzoilserina, as cores representam os genes presentes no genoma da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105 na parte superior, com o BGC depositado no MIBiG. Os espaços escuros mostram genes semelhantes 72

Lista de Abreviações e Siglas

- AAI:** Identidade média de aminoácidos
- ANib:** Valores médios de identidade nucleotídica BLAST
- ANIm:** Valores médios de identidade nucleotídica MUMmer
- ANI:** Valores médios de identidade nucleotídica
- BGCs:** Clusters gênicos biossintéticos
- BV-BRC:** Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center
- CLPs:** Lipopeptídeos cíclicos não ribossômicos
- CMABio:** Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos
- dDDH:** hibridização DNA-DNA digital
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- GGDCs:** Genome-to-Genome Distance Calculator
- LB:** Luria Bertani
- LPSN:** Lista de nomes procarióticos com posição na nomenclatura
- ISP2:** International *Streptomyces* Project 2
- PVK:** Pikovskaya
- MIC:** Concentração inibitória mínima
- NBRIP:** National Botanical Research Institute's phosphate growth
- NRPs:** Peptídeos não ribossômicos
- PKs:** Policetídeos
- PIC:** Percentagem de inibição do crescimento micelial
- MIBiG:** Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster
- RiPPs:** Peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-tradução
- RNA:** Ácido ribonucleico
- RAST:** Rapid Annotation using Subsystem Technology
- TYGS:** Type Strain Genome Server
- UEA:** Universidade do Estado do Amazonas.

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia possui a maior bacia hidrográfica do mundo, sendo um dos maiores reservatórios de biodiversidades do planeta, e distribuída em diferentes ecossistemas que abriga muitas espécies de microrganismos, que são os principais responsáveis pela produção de diversas moléculas, que podem ser úteis para a descoberta de novos produtos naturais com potencial para diversas aplicações na medicina ou na agricultura (Pereira *et al.*, 2017).

Bactérias e fungos desempenham importantes papéis na natureza, podendo interagir com diferentes organismos vivos por meio de sinalização de defesa, competição e autopreservação e a decomposição de matéria orgânica. Esses microrganismos têm sido alvos de diversos estudos, devido a suas capacidades de produzir diversas moléculas valiosas (Scherlach; Hertweck, 2020; Kenshole *et al.*, 2021; Schorn *et al.*, 2021).

Entre os microrganismos produtores de diversos metabólitos secundários bioativos, destacam-se as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, que estão presentes em inúmeros habitats e são conhecidas pela capacidade de produzir um grande número de moléculas que inclui policetídeos (PKs), peptídeos não ribossomais (NRPs), terpenos e RiPPs (Andrić *et al.*, 2020; Boruta, 2021; Narayanan; Glick, 2022).

A informação para biossíntese de metabólitos secundários está contida, em sua maioria, na forma de genes espacialmente próximos no genoma, os quais codificam enzimas que participam das etapas biossintéticas da formação da estrutura principal do metabólito (genes *core*), enzimas de modificação posterior (enzimas de decoração) e podem também codificar transportadores e fatores de transcrição (Abdel-aziz *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2020; Shuikan *et al.*, 2020). Esse conjunto de genes são comumente chamados de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) e o seu estudo tem revolucionado a área de produtos naturais, permitindo a produção em larga escala, a descoberta de novos compostos, o design guiado de estruturas orgânicas complexas, bem como outras tecnologias geradas a partir do conhecimento das vias de biossíntese (Bachmann *et al.*, 2014; Bauman *et al.*, 2021).

Por vários anos, novos metabólitos produzidos por microrganismos eram descobertos por estratégias convencionais. No entanto, com o advento do

sequenciamento de nova geração e o contínuo estudo de BGCs, ficou cada vez mais evidente que o potencial genético de um microrganismo para produção de metabólitos secundários é muito maior do que o potencial encontrado nos extratos obtidos a partir de fermentações (Scherlach; Hertweck, 2021). Esse fato reforça que os dados genômicos são um fator chave para o desenvolvimento de abordagens que possibilitam a descoberta guiada de novas entidades químicas (Xia *et al.*, 2022).

Nesse contexto, as estratégias de mineração do genoma, incluindo predição por bioinformática, tornaram-se uma abordagem essencial, podendo revelar clusters de genes biossintéticos (BGCs) de interesse biotecnológico e auxiliar na identificação de novas moléculas com propriedades bioativas (Tyc *et al.*, 2017; Albarano *et al.*, 2020).

A mineração genômica de bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões, com base no genoma completo pode indicar a presença de clusters para produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, citotóxicas e antiviral contra vários agentes causais. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho indicaram com base em testes de cultura pareada a inibição do crescimento de diversos fitopatógenos.

Esse arsenal metabólico com diferentes estruturas confere a esses organismos um repertório de atividades biológicas, com destaque para a produção de antimicrobianos (Fira *et al.*, 2018; Andrić *et al.*, 2020; Boruta, 2021). Além disso, os microrganismos podem ser usados como agentes de biocontrole, promotores de crescimento vegetal, probióticos, podendo ser uma estratégia alternativa no manejo de doenças em plantas e reduzindo o uso de produtos químicos diminuindo o grande impacto que esses produtos causam no meio ambiente (Dunlap, 2019; Su *et al.*, 2020; Ngalimat *et al.*, 2021).

Desta forma o presente estudo nos traz um indicativo do leque de aplicações que esses microrganismos podem possuir, por produzirem moléculas que merecem ser exploradas, onde a identificação dessas moléculas são alternativas favoráveis para a aplicação na agricultura e farmacologia, podendo contribuir com o desenvolvimento de novos bioprodutos e ajudar a revelar a importância da microbiota amazônica no cenário da bioeconomia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O GÊNERO *Bacillus*

O gênero *Bacillus* pertence à família Bacillaceae no filo *Firmicutes*, descrito pela primeira vez em 1872 por Cohn. Espécies desse gênero habitam diferentes habitats que incluem solos, lagos, sedimentos marinhos, fontes termais, areias do deserto, tecidos de plantas e animais (Liu *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2023). São bactérias Gram-positivas, formadoras de endósporos, com baixo teor de conteúdo G+C no DNA, possuem forma de bastonete, são aeróbicas ou facultativamente anaeróbias com 627 espécies (Son *et al.*, 2019). Espécies importantes incluem: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, impactando vários setores da biotecnologia com agricultura e medicina (Gupta *et al.*, 2020; Mo *et al.*, 2020).

Este grupo de microrganismo exibe uma diversidade taxonômica e metabólica, tendo 5 a 8% do genoma total dedicado a biossíntese de metabólitos secundários, com um amplo repertório de compostos antagonistas (Fira *et al.*, 2018; Dimkić *et al.*, 2022). Os compostos produzidos por *Bacillus* podem ser classificados em antibióticos, peptídeos não ribossômicos (NRPs), lipopeptídeos cíclicos, lipopeptídeos lineares, policetídeos (PKs), dihidroisocoumarinas e macrolídeos (Figura 1) (Mondol *et al.*, 2013; Horak *et al.*, 2019; Kaspar *et al.*, 2019).

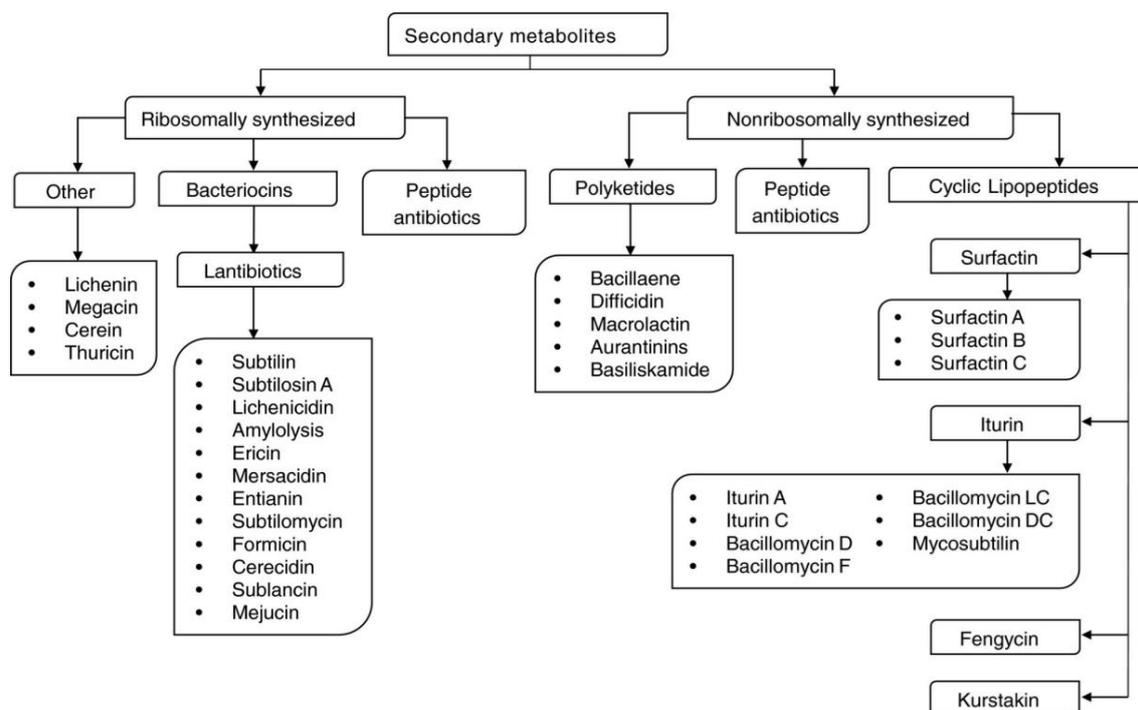


Figura 1: Principais classes de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*. Fonte: Horak *et al.*, (2019)

Dentre os lipopeptídeos cíclicos, os lipopeptídeos fengicina e surfactina são de grande interesse na agricultura pois são responsáveis pela indução de resistência sistêmica em plantas atuando na indução de genes da via das lipoxigenases (Ongena *et al.*, 2007). Além disso, esses produtos naturais dispõem de atividade antifúngica contra diversos fitopatógenos de interesse econômico como espécies de *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Ralstonia* (Kim *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Assim como fengicina e surfactina os macrolídeos produzidos por algumas espécies de *Bacillus* como as bacillomicinas e macrolactinas também são excelentes antifúngicos que estão relacionados ao biocontrole (Yuan *et al.*, 2012).

Peptídeos lineares de *Bacillus* como as gageostatinas possuem atividade antifúngica reportada para *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* com concentração inibitória mínima (MIC) variando de 4–32 µg/mL e antibiótica contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar *Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa* com MIC variando de 8–64 µg/mL. Além disso, esses peptídeos também possuem atividade citotóxica (Tareq *et al.*, 2014).

Em *Bacillus pumilus* as dihidroisocoumarinas da série A1-77 são antibióticos potentes contra *Helicobacter pylori* e possuem efeitos gastroprotetores e anti úlcera (Saddiqa *et al.*, 2017). Já as bacilosarcinas são dihidroisocoumarinas que possuem atividade herbicida e podem ser usadas no controle de ervas daninhas (Azumi *et al.*, 2008).

Várias espécies do gênero *Bacillus* como *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. azotofixans*, *B. macerans*, *B. velezensis* são relatadas como bactérias com grande potencial na agricultura, pois promovem o crescimento vegetal, fornecendo um grande número relevante de metabólitos que podem ser utilizados como biocontrole na agricultura. Além disso, essas espécies também podem secretar fitohormônios, aumentar o transporte de nutrientes, fixar nitrogênio e solubilizar fósforo, como demonstrado na (Figura 2) (Saxena *et al.*, 2019; Poveda *et al.*, 2021).

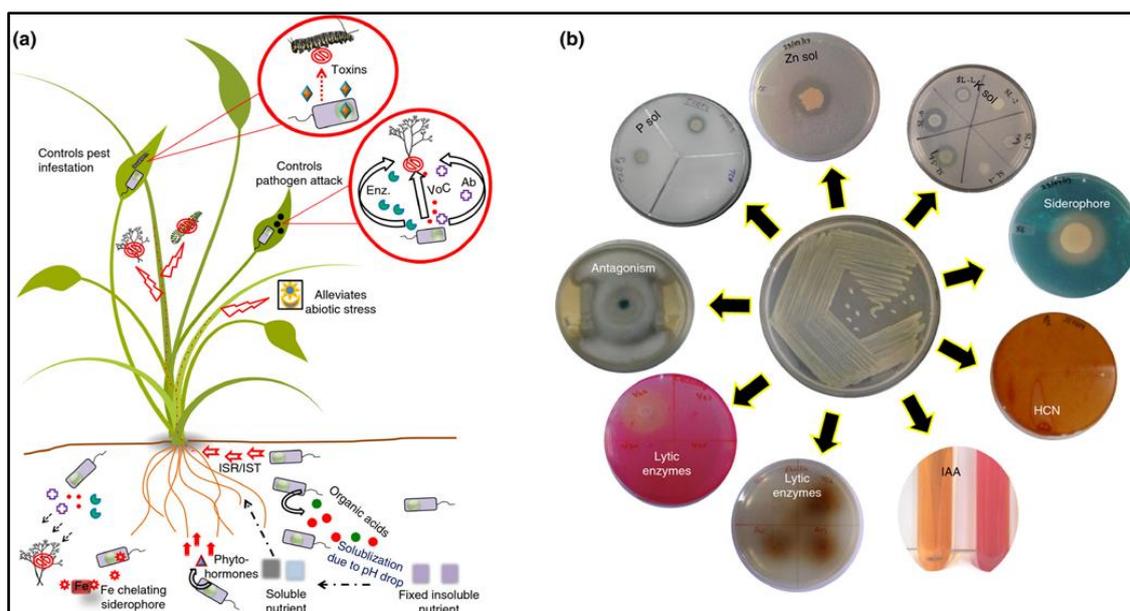


Figura 2: (A) Visão geral dos diferentes mecanismos benéficos que microrganismos fornecem às plantas. (B) Representa as diferentes propriedades bioativas produzidas por *Bacillus* sp. como: Antagonismo, atividade enzimática, produção de sideróforo, atividade antimicrobiana. Fonte: Saxena *et al.*, 2019.

O gênero *Bacillus* também é produtor de várias enzimas de interesse industrial, como quitinases, glucanases, lipases e proteases, utilizadas nas indústrias de alimentos, rações, detergentes, têxteis, couro, papel e farmacêutica (Berini *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2020).

2.2 GÊNERO *Streptomyces*

As bactérias do gênero *Streptomyces* pertencem ao filo das actinobactérias, sendo um dos principais produtores de bioativos com aplicações médicas, industriais e agrícolas (Ghanem *et al.*, 2022; Alam *et al.*, 2022). As actinobactérias constituem um dos 30 principais filios classificados no domínio Bacteria, com 374 gêneros registrados, tendo as *Streptomyces* como maior gênero deste filo, podendo ser encontradas em diferentes ambientes terrestres e marinhos com a maior diversidade registrada nesses habitats (Donald *et al.*, 2022).

As *Streptomyces* são bactérias Gram-positivas com um conteúdo genômico com alto teor de C+G de 69-78%, sendo descrita pela primeira vez por Waksman e Henrici (1943) por produzirem uma grande variedade de antibióticos. Possuem características fisiológicas que se assemelham às de diversas espécies de fungos, que produzem hifas filiformes que penetram nas superfícies em busca de nutrientes, em condições ambientais diferentes, onde os recursos são limitados, são capazes de produzir hifas aéreas que se dividem em esporos que podem resistir a condições desfavoráveis e são facilmente transportados para novos ambientes ou fontes de nutrientes (Quinn *et al.*, 2020; Donald *et al.*, 2022).

Dentre as diversas espécies de *Streptomyces*, destacam-se as espécies de *S. clavuligerus*, *S. venezuelae*, *S. aureofaciens*, *S. kanamyceticus*, *S. spectabilis*, *S. canelaensis* e *S. lavendulae*, sendo grande produtores de antibióticos, antifúngicos, inseticidas e enzimas, sendo responsável pela produção de diversas substâncias bioativas como alguns antibióticos populares, como por exemplo: cefamicina, cloranfenicol, tetraciclina, canamicina, espectinomina, monensina e mitomicina C, assim como compostos voláteis, sideróforos e agentes parasitários como a ivermectina, e vários outras moléculas com atividade antifúngicas (Salwan; Sharma, 2020; Boruta *et al.*, 2021; Alam *et al.* 2022).

Devido à extensa produção de metabólitos secundários, *Streptomyces* têm atraído muita atenção para o biocontrole, apesar de muitos terem sido isolados com sucesso, a comercialização ainda é limitada, isso se dá devido sua eficácia e estabilidade em campo, bem como condições estritas de

armazenamento e a falta de consistência quando os inoculantes microbianos são aplicados em condições ambientais, fatores de custo biológicos, ecológicos, toxicológicos e regulatórios também influenciam na eficácia e a comercialização dos produtos de controle biológico devido à complexidade de encontrar uma formulação e o momento apropriados para a aplicação (Colombo *et al.* 2019; Feng *et al.*, 2022). Desse modo, se torna necessário a identificação da espécie e do habitat natural para fornecer mais escolhas potenciais de agentes de controle biológico (Worsley *et al.*, 2020; Le *et al.*, 2022).

2.3 POTENCIAL DE BACTÉRIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

Doenças causadas por microrganismos, particularmente aquelas causadas por fungos fitopatogênicos, são responsáveis por cerca de 70-80% das doenças de plantas, além dos fungos, alguns vírus, bactérias, e nematóides, em conjunto, podem causar perdas estimadas em 40 bilhões de dólares em todo o mundo. Estima-se que 20 a 40% das perdas agrícolas são por doenças causadas por fitopatógenos (Rahman *et al.*, 2018; Bolívar-Anillo *et al.*, 2019).

A utilização de microrganismos com atividades antagonistas e seus metabólitos é uma alternativa natural atraente, já que métodos convencionais de controle de fungos fitopatogênicos como o uso de fungicidas sintéticos podem ocasionar resistência em microrganismos e danos à saúde humana, animal e ambiental. Esses produtos, podem levar a resíduos tóxicos em produtos tratados, e devido à sua lenta biodegradação podem poluir o meio ambiente (Kong *et al.*, 2020).

O uso de microrganismos antagonistas no controle biológico em plantas, é uma abordagem muito comum é uma alternativa ambientalmente correta, e uma importante estratégia para o desenvolvimento integrado de práticas sustentáveis no manejo agrícola, tendo como finalidade melhorar o aproveitamento de nutrientes, reduzir doenças e pragas, diminuir o uso de produtos químicos e aumentar a produtividade (Yang *et al.*, 2019; Miljaković *et al.*, 2020).

Biopesticidas derivados de bactérias, fungos, entre outros, representam 5% do mercado de proteção de cultivos agrícolas, sendo que as bactérias representam 90% de todos esses agentes de biocontrole (Le *et al.*, 2022). Espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, estão entre os agentes de

biocontrole mais estudados, representando um valioso recurso no controle biológico devido à capacidade para produzir vários metabólitos secundários com notável atividade biológica. A inibição do crescimento de patógenos por bactérias envolve mecanismos como competição por nutrientes e espaços, produção de antibióticos como lipopeptídeos cíclicos não ribossômicos (CLPs) e policetídeos (PKs), enzimas hidrolíticas, sideróforos e/ou indução de resistência sistêmica, podendo atuar como biofertilizantes ou bioestimuladores (Xu *et al.*, 2015; Miljaković *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar as linhagens de bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões quanto à capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos, promover o crescimento vegetal e produzir enzimas e metabólitos secundários de interesse biotecnológico.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Realizar a caracterização morfológica e filogenômica de bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões;
2. Identificar genes únicos e ortólogos presentes nas bactérias;
3. Avaliar características funcionais das bactérias isoladas, relacionadas à produção de enzimas, sideróforos, solubilização de fosfato e genes relacionados a promoção de crescimento vegetal (vias de biossíntese para auxinas (AIA), giberelina e citocinina);
4. Avaliar o potencial antagonista no controle *in vitro* das bactérias isoladas contra fitopatógenos;
5. Realizar a mineração genômica de bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões visando a identificação e caracterização de clusters gênicos biossintéticos relacionados ao metabolismo secundário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na rodovia AM 010, km 29, estrada Manaus-Itacoatiara-Amazonas e estão identificadas sob os códigos: SOL105, SOL146, MAD34, MAD51, MAD1003 e MAD142 e preservados em glicerol 20% e armazenadas a -80 °C (Tabela 1, Figura 3).

Tabela 1: Lista das bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões, utilizadas neste trabalho.

Nº	Código da Coleção	Origem	Local
01	SOL105	Sedimentos	Rio Solimões
02	SOL146	Sedimentos	Rio Solimões
03	MAD34	Sedimentos	Rio Madeira
04	MAD142	Sedimentos	Rio madeira
05	MAD51	Sedimentos	Rio Madeira
06	MAD1003	Sedimentos	Rio madeira

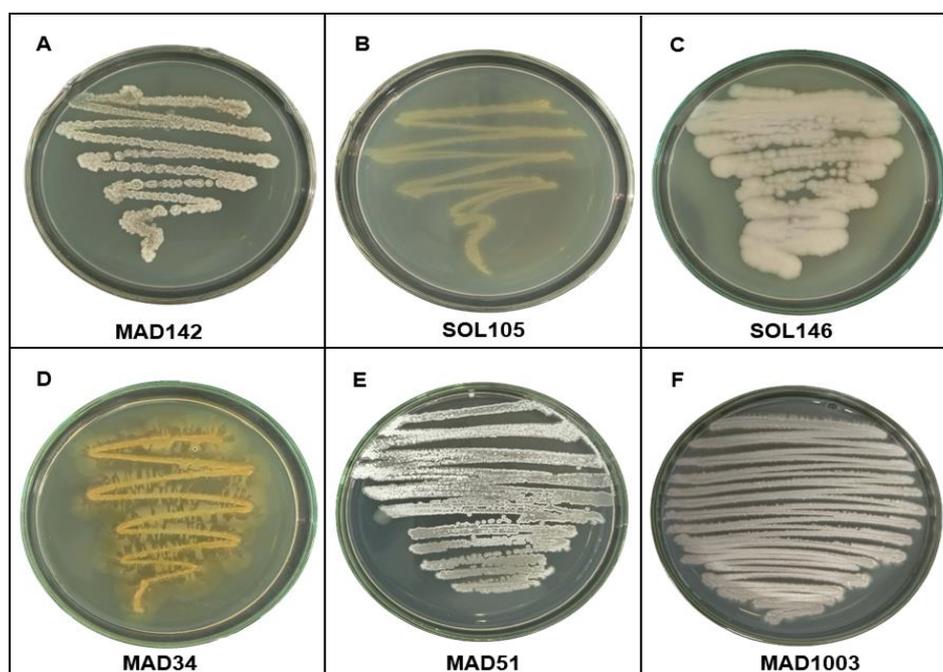


Figura 3: Ativação dos isolados dos rios Madeira e Solimões. A) MAD142, B) SOL105, C) SOL146 e D) MAD34 cultivada em meio LB (*Luria Bertani*), As linhagens E MAD51 e F) MAD1003 cultivadas em meio ISP2 (*International Streptomyces Project 2*).

4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA BACTERIANA

O cultivo das bactérias foi realizado na Embrapa Amazônia Ocidental, e a visualização e captura das amostras foram realizadas no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas.

O procedimento foi realizado de acordo com Souza *et al.* (2007) com algumas adaptações. Os cultivos dos isolados, foram em meio LB (*Luria Bertani*) e meio ISP2 e ISP (*International Streptomyces Project*). As placas foram incubadas a 28°C, durante 4 a 7 dias. Em seguida, pequenos fragmentos com cerca de 1 cm foram retirados do cultivo e transferidos para uma placa de 24 poços onde foram tratados com solução de fixação Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5%, em tampão Cacodilato de Sódio 0,2M pH 7.2), onde permaneceram submersos na solução, e em repouso por 24h em temperatura ambiente. Em seguida a solução fixadora foi descartada, e as amostras dos isolados foram lavadas 5 vezes com solução tampão Cacodilato de Sódio 0,2M pH 7.2. Após os processos de lavagem, foi realizado os processos de pós-fixação em solução de Tetróxido de Ósmio 2% e Ferrocianeto de Potássio 16% na proporção 1:1 e lavadas 4 vezes com água destilada.

Posteriormente as células foram desidratadas de forma gradual com álcool 50%, 70%, 90%, 95% e 100%, respectivamente, deixando-as descansar por 10 minutos de uma solução para outra. A última lavagem com álcool 100%, repetiu-se por 2x. O processo de secagem foi realizado em aparelho de Ponto Crítico automático Leica EM CPD300, onde os blocos foram posicionados nos stubs (porta-amostras), sobre uma fita dupla face de carbono.

Após todo esse processo, as amostras foram metalizadas com ouro durante 5 minutos utilizando o metalizador JEOL Smart Coater (camada de ouro de cerca de 20 nm) e posteriormente foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT500HR).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA, SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA

As linhagens (MAD34, MAD142, SOL146 e SOL105) foram cultivadas em meio LB (*Luria Bertani*) enquanto as linhagens (MAD51 e MAD1003) em ISP2

(*International Streptomyces Project 2*) sólido, todas foram cultivadas em 5 mL de meio LB ou ISP2 e mantidas overnight sob agitação a 27°C e 150 rpm. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação e o DNA genômico foi extraído utilizando o kit DNeasy® *blood and tissue* (Qiagen, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida analisado em gel de agarose (1%) e quantificado no NanoDrop™ (ThermoFisher Nanodrop spectrophotometer) e Qubit® 2.0 *fluorometer* (Life Technologies).

O genoma completo foi sequenciado usando a plataforma Illumina com *read length*: 2 x 150 bp (Paired End) e montado “*de novo*” com o montador SPAdes (PRJIBELSKI *et al.*, 2020). A qualidade do genoma foi analisada utilizando o servidor BV-BRC (*Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*), combinando os dados e ferramentas dos recursos do software PATRIC (<https://www.patricbrc.org>) através de uma análise abrangente do genoma (acessado em 10 de junho de 2022). As sequências do genoma das espécies tipos foram baixadas do banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>, acessado em 10 de junho de 2022).

Os genomas dos isolados foram preditos e anotados automaticamente seguindo o *pipeline* do servidor RAST (<https://rast.nmpdr.org/> acessado em 10 de junho de 2022), usando a base de dados SEED Viewer version 2.0. (Aziz *et al.*, 2008). Na etapa 2, para a identificação do genoma no taxonomy-ID (NCBI), cada linhagem analisada neste trabalho, inicialmente foi identificada com base no banco de dados TYGS ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/), acessa do em 11 de maio de 2022) e para anotação foi obtido o ID da linhagem mais relacionada. Na etapa 3 a correção automática de erro foi desabilitada.

4.4 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÔMICA E ANÁLISE PANGENÔMICA

A delimitação de espécies foi realizada com base na análise comparativa dos genomas, usando vários índices de medida como: identidade média de nucleotídeos (ANI), identidade média de aminoácidos (AAI) e o valor de hibridização DNA-DNA digital (dDDH) (Sandoval-Powers *et al.*, 2021).

O cálculo do valor de identidade média de nucleotídeos (ANI) foi determinado levando em consideração as espécies mais relacionadas utilizando três diferentes algoritmos como: OrthoANI (Lee *et al.*, 2016), ANI calculator que

utiliza o algoritmo OrthoANIu, uma iteração aprimorada do algoritmo OrthoANI original, que usa USEARCH em vez de BLAST (Yoon *et al.*, 2017). Ambos disponibilizados no banco de dados EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>, acessado em 15 de março de 2023). Além desses dois algoritmos também foi utilizada a ferramenta online JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws>) acessado em 15 de março de 2023 para cálculo dos valores baseados em BLAST (ANIb) e MUMmer (ANI_m) (Richter *et al.*, 2015).

A identidade média de aminoácidos (AAI) foi obtido pela calculadora AAI (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>, acessado em 10 de junho de 2022) (Rodriguez-r; Konstantinidis, 2014). Os valores de hibridização DNA-DNA digital (dDDH) com base na fórmula d2 foram estimados usando o Genome to Genome Distance Calculator - GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) usando os parâmetros padrão (Meier-Kolthoff *et al.*, 2021). Já os valores de dDDH na fórmula d4 e a árvore filogenômica foi obtida por meio da plataforma Type Strain Genome Server (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>, acessado em 15 de maio de 2023).

A análise pangenômica dos isolados dos rios Madeira e Solimões foi realizada visando a identificação de genes únicos e agrupamentos de genes ortólogos. No caso de espécies já descritas a comparação foi realizada entre a espécie tipo e as mais relacionadas e já no caso de novas espécies, foram comparadas com espécies filogeneticamente próximas usando software OrthoVenn2 <https://orthovenn2.bioinfo toolkits.net/home> (Xu *et al.*, 2019).

4.5 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS

4.5.1 Produção de enzimas

As atividades enzimáticas dos isolados para a produção de lipase, amilase, celulase, quitinase, protease, e pectinase foi determinada por teste qualitativo observando a formação de halos em meio sólido conforme recomendado por Teixeira *et al.*, (2011). Os meios específicos para cada enzima testada estão listados na tabela abaixo.

Tabela 2: Composição dos meios de cultura utilizados para atividade enzimática.

Meios de cultura	Composição
Celulase	2 g de NaNO ₃ ; 1 g de KH ₂ PO ₄ ; 0,5 g de MgSO ₄ ; 0,5 g de KCl; 10 g de Carboximetilcelulose; 0,2 g de peptona, 17 g de ágar, 1 L de água destilada.
Amilase	5 g de peptona, 5 g NaCl, 5 g extrato de carne, 10 g dextrose, 2 g de amido, 20 g de ágar, 1 L de água destilada.
Pectinase	1,0 g de NH ₄ H ₂ PO ₄ , 0,1 g de MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,5g de KCl, 5,0 g de Pectina cítrica, 12 g de ágar, 1 L de água destilada.
Protease ágar leite	5,0 g de leite desnatado, 15 g de ágar, 1 L de água destilada.
Protease ágar gelatina	5 g de Peptona, 3 g de Extrato de Carne, 5 g de NaCl, 15 g de ágar, 1 L de água destilada, suplementado com 1% de gelatina.
Lipase	2,0 g de ágar, 0,01 g de CaCl ₂ .2H ₂ O, 1,0 mL de tween 80, 1 L de água destilada.
Quitinase	10 g de Quitina coloidal, 0,2 g de KCl, 0,2 g de MgSO ₄ .7H ₂ O, 1 g de NH ₄ H ₂ PO ₄ , 20 g de ágar, 1 L de água destilada.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e avaliados durante 5 dias. Todas as placas foram incubadas a 28 °C, para em seguida serem reveladas.

4.5.1.1 Revelação da atividade enzimática

A detecção de atividade de celulasas foi realizada usando 10 mL solução aquosa de vermelho congo 0,1% (p/v) seguido de adição de 10 mL de solução de NaCl 1M, por 15 minutos cada solução.

Já a revelação de amilase foi realizada usando 10 mL de solução de Lugol 0,3% (v/v) durante 5 minutos. A presença de halo translúcido após a reação com as soluções indica atividade positiva.

A análise da atividade lipolítica foi considerada positiva a partir da observação de pequenos cristais quando a placa foi mantida a 4°C por 24 horas.

A presença de protease em ágar leite e quitinase foi confirmada pela formação de um halo translúcido ao redor de cada amostra.

A produção de protease em ágar gelatina foi visualizada após a inundação da placa em 20 mL de solução aquosa saturada de cloreto de

mercúrio (15 g HgCl₂ dissolvido completamente em 20 mL de HCl 7M então aumentado para 100 mL com água destilada estéril).

A revelação da atividade enzimática para pectinase foi realizada com substância de HCl 5N, a presença de halos translúcidos ao redor das bactérias indica a presença da produção da enzima.

4.5.2 Produção de sideróforo e solubilização de fosfato

A análise qualitativa das atividades para produção de sideróforos, seguiu a metodologia descrita por Ghazy *et al.* (2020), onde respectivamente os bioensaios foram realizados em triplicata utilizando meio ágar CAS (60,5 mg de Chrome Azurol, 10 mL de FeCl₃.6H₂O a 1 mM diluído em 10 mL de HCl 10 mM, 40 mL de HDTMA, 50 mL de água destilada) incubado a 28°C por 5 a 7 dias. As colônias que apresentarem halo claro laranja são consideradas positivas para produção de sideróforos.

O ensaio para solubilização de fosfato seguiu a metodologia descrita por Nautiyal (1999) e Kenasa *et al.* (2020), onde os isolados foram testados em meio com diferentes fosfatos inorgânico de AlPO₄ e FePO₄, e meio sólido Pikovskaya (PVK) e NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth*), a atividade positiva foi determinada pela presença de halo em volta das colônias.

4.5.3 Identificação de genes relacionados a promoção de crescimento vegetal (vias de biossíntese para auxinas (AIA), giberelina e citocinina)

A identificação dos genes relacionados biossíntese para auxinas (AIA), giberelina e citocinina, foi realizada por meio do servidor RAST (Aziz *et al.*, 2008) (<https://rast.nmpdr.org> acessado em 10 de junho de 2022), para tanto foi analisada o subsistema metabolismo secundário, subcategoria hormônios vegetais.

4.5.4 Produção de ácido indolacético (AIA)

A produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico, baseado no reagente de Salkowsky seguindo a metodologia descrita por Sarmiento-López *et al.* (2022) e Gordon (1951). A análise foi realizada em triplicata na presença do precursor L-triptofano. Os isolados MAD34, MAD142, SOL105 e SOL146

foram cultivados em meio de cultura LB (*Luria Bertani*), onde os isolados MAD51 e MAD1003 em ISP2 (*International Streptomyces Project 2*), todos suplementando com $150 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de triptofano, sob agitação de 150 rpm no período de 5 dias na ausência de luz.

Após esse período as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 2 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL contendo 1 mL de solução SalKowski (1,2 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 42,1 mL de H_2SO_4 e 57,89 mL de água). Todas as amostras foram incubadas por 1 hora no escuro, e as leituras realizadas em espectrofotômetro no comprimento de 595 nm. Para curva padrão foram utilizadas concentrações de AIA na solução padrão: mg/mL com diluições de (0; 0,0039; 0,0078; 0,016; 0,031; 0,06, 0,13; 0,25; 0,50 e 1,0 mg/mL). Para o controle foi utilizado apenas o meio de cultura.

4.6 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTAGONISTA CONTRA FITOPATÓGENOS.

A atividade antagônica de todos os isolados foi testada em triplicata em meio BDA (*Batata Dextrose Ágar*) contra 13 diferentes fitopatógenos (Tabela 3). Os testes foram realizados em placas de Petri de tamanho uniforme (90x15 mm), onde um disco de micélio de 0,8 cm de cada fitopatógeno foi colocado no centro da placa, a bactéria foi inoculada nas laterais em estrias simples com distanciamento de 3,5 cm das bordas. Em seguida, as placas foram incubadas a 28 °C e avaliados no período de 5, 10 e 15 dias.

Avaliação *in vitro* do potencial de inibição foram registradas medindo o crescimento radial do patógeno, tendo como controle negativo o crescimento do fitopatógeno sem a presença da bactéria, onde a porcentagem de inibição (PIC) foi calculada usando a fórmula abaixo.

$$I = \frac{\text{diâmetro médio do controle} - \text{diâmetro médio do tratamento}}{\text{diâmetro médio do controle}} \times 100$$

Tabela 3: Lista de fitopatógenos utilizados para avaliar a atividade antagonista dos isolados SOL105, SOL146, MAD34 e MAD142, MAD51, MAD1003.

Nº	Fitopatógeno	Código	Origem
01	<i>Fusarium decemcellulare</i>	Fdc 307	Guaranazeiro (superbrotamento)
02	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Mp01	Vassoureiro (Embrapa)
03	<i>Colletotrichum siamense</i>	Coll 2N	<i>Synedrella nodiflora</i>
04	<i>Colletotrichum spaethianum</i>	2908	Cebolinha
05	<i>Rhizoctonia</i> sp.	2943	Alface
06	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	2939	Guaranazeiro (folha)
07	<i>Corynespora cassiicola</i>	2671	Tomate (folha)
08	<i>Rhizoctonia</i> sp.	2942	Feijão
09	<i>Fusarium</i> sp.	MCT10621	Tomate (Fruto)
10	<i>Colletotrichum</i> sp.	2973	Mamão (Fruto)
11	<i>Sclerotium rolfsii</i>	2941	Tomate
12	<i>Colletotrichum scovillei</i>	2910	Pimenta de cheiro (fruto)
13	<i>Neopestalotiopsis formicidarum</i>	2917	Guaranazeiro (folha)

4.9 MINERAÇÃO GENÔMICA E PROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

A identificação de clusters gênicos biossintéticos (BGCs) das linhagens bacterianas foram realizados com auxílio da plataforma AntiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) versão 6.0 (Blin *et al.*, 2021).

Os genes dos BGCs preditos que apresentaram similaridade parcial com vias de biossíntese depositadas no banco de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*) versão 2.0 (<https://mibig.secondarymetabolites.org/>), foram avaliados quanto a sintonia com o auxílio do programa clinker, uma ferramenta baseada em Python e clustermap.js (Gilchrist; Chooi, 2021).

O banco de dados InterPro (<http://https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) foi utilizado para identificar os domínios de funcionalidade ligados à biossíntese de metabólitos secundários e inferência das possíveis funções (Mistry *et al.*, 2020; Paysan-Lafosse *et al.*, 2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A análise da forma e arranjo celular obtidas por MEV, mostram que a linhagem *Bacillus* sp. MAD142 apresenta arranjo com células individualizadas (*single bacillus*), enquanto o isolado SOL146 mostrou aspecto alongado e curvado com alguns arranjos podendo ser observado alguns arranjos duplos. Conforme esperado a linhagem de *Stenotrophomonas* SOL105 e *Pseudomonas* sp. MAD34 mostram morfologia de bastonete típicas de cada gênero (Figura 4).

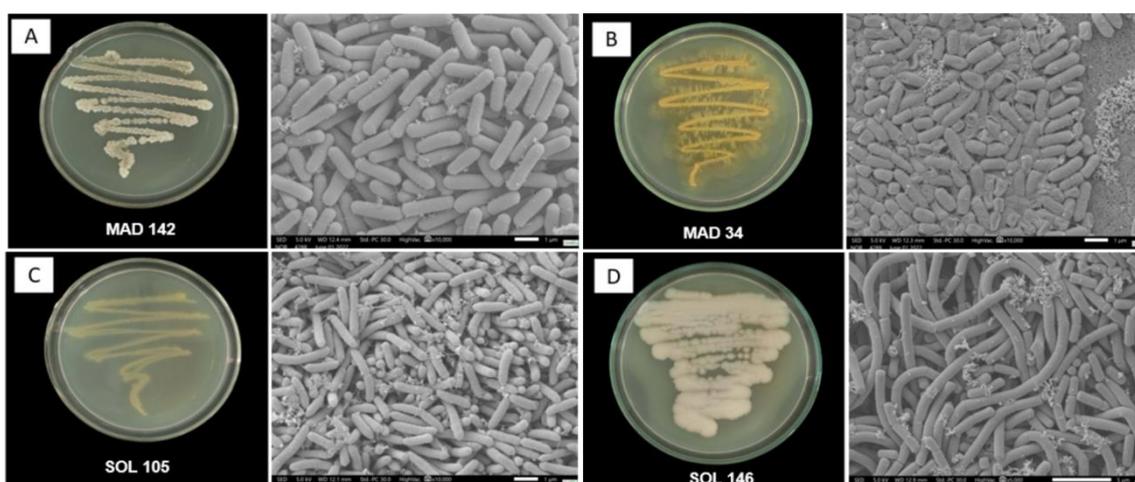


Figura 4: Aspectos macromorfológicos da colônia e microscopia eletrônica de Varredura (MEV) dos isolados cultivados em meio LB a 28 °C por três dias. As linhagens de *Bacillus* sp. são mostradas em **A** (MAD142) e **D** (SOL146). *Pseudomonas* sp. MAD34 em **B**, e *Stenotrophomonas* SOL105 em **C**. SOL indica isolados do Rio Solimões e MAD isolados do Rio Madeira. A barra em cada figura representa a escala de 1μm.

Conforme o esperado, os arranjos e aspecto filamentoso típicos de *Streptomyces*, foram observados nos isolados MAD51 e MAD1003, sendo características morfológicas já descritas, que se assemelha a fungos, apresentando hifas ramificadas que formam micélios aéreos, sendo características únicas presente em bactérias (Flärdh; Buttner, 2009).

O isolado MAD51, apresentou cadeias de esporos em meio ISP4 (Figura 5, B), e o isolado MAD1003 ocorreu formação de cadeia de esporo no meio ISP2 como mostrado na (Figura 5, C).

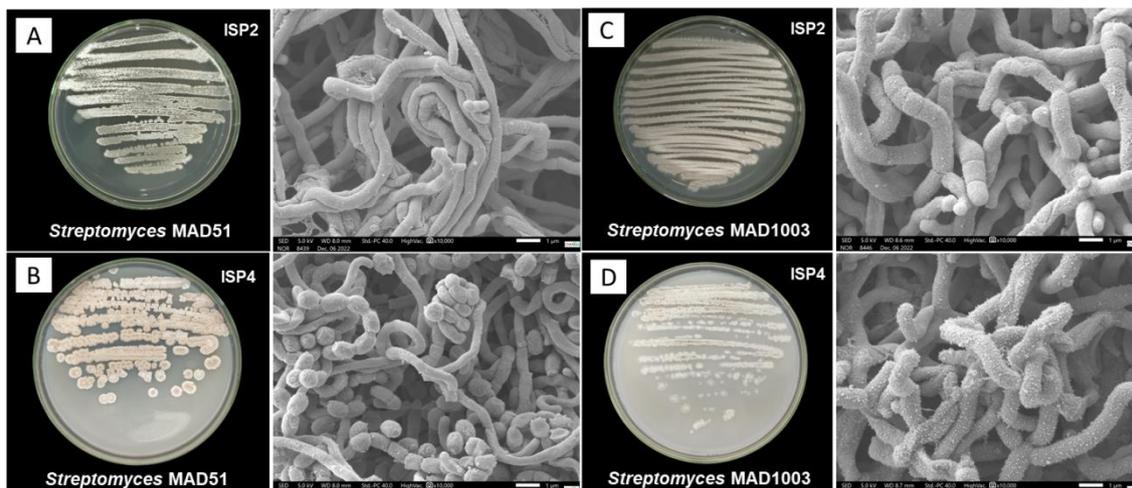


Figura 5: Morfologia das linhagens de *Streptomyces* sp. MAD51 e MAD1003. Linhagem MAD51 cultivada em meio ISP2 (A) e em meio ISP4 (B). Linhagem MAD1003 cultivada em meio ISP2 (C) e em meio ISP4 (D). Todas as linhagens foram cultivadas a 28 °C por 10 dias. À direita, aspectos morfológicos de cada linhagem obtidos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A barra de cada figura representa a escala de 1µm.

5.2 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÔMICA DOS ISOLADOS

5.2.1 Sequenciamento, anotação do genoma

Os genomas dos isolados MAD34, MAD51, MAD1003 e SOL105 foram sequenciados e o tamanho do genoma, conteúdo G+C, regiões codificadoras (CDS) e características gerais da montagem, os genomas obtidos apresentaram fragmentação variando de 56 contigs para SOL 105 e 482 contings na linhagem MAD51 (Tabela 4).

Tabela 4: Características gerais da anotação de quatro linhagens analisadas, comparadas com com strains de referência pesquisadas no Taxonomy Database do NCBI.

Características	MAD34	MAD51	MAD1003	SOL105
Tamanho do genoma (pb)	6.244.542	8.457.554	6.642.326	4.664.203
Conteúdo G + C (%)	66.6	72.0	71.5	66.6
CDS (total)	5841	8066	6297	4304
N50	398344	46074	113694	6297
Número de subsistemas	392	327	312	304
rRNAs	6	13	8	4
tRANs	58	67	66	67
Número de Contigs	62	482	237	56

A linhagem MAD34 apresentou genoma de tamanho de 6.244.542 (pb), com 66.6% de conteúdo G+C e com 5841 possíveis regiões codificadoras (CDS), incluindo 6 genes de RNA ribossômico (rRNA) e 58 genes de RNA de transferência (tRNA). A (Figura 6) mostra o mapa circular do genoma da linhagem MAD34 representando a montagem completa do genoma, onde os anéis externos de azul representa a posição e a ordem dos contigs montados no cromossomo, os anéis internos inclui as CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes de RNA, Genes não codificantes, conteúdos G+C e genes transportadores.

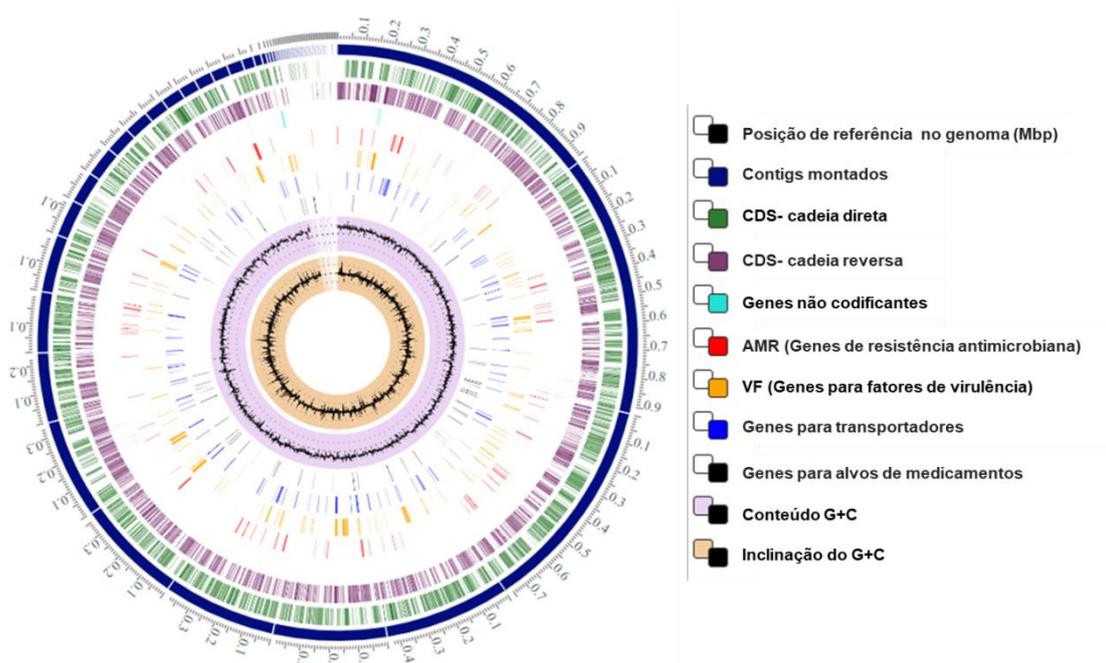


Figura 6: Visão do gráfico circular do genoma da linhagem MAD34. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita).

A anotação de genes realizada no RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) mostrou a ocorrência de 392 subsistemas presentes no genoma e o número de genes por categoria e mostrado no suplemento (Figura S1). A linhagem MAD34 apresenta na categoria metabolismos secundário (subcategoria fitormônios), p4 genes envolvidos na via de biossíntese da auxina e na categoria aquisição de ferro e metabolismo, possui 39 relacionados à biossíntese de sideróforo. Produção de fitormônios e sideróforos por microrganismos, normalmente está

relacionados à promoção de crescimento (Souza *et al.*, 2015). Também foram identificados 45 genes relacionados à resistência a antibióticos.

O genoma da linhagem MAD51 apresentou um tamanho 8.457.554 (pb), com conteúdo G+C de 72.0%, com um total de 8066 regiões codificadoras (CDS) anotados, com 67 genes de RNA de transferência (tRNA) e 13 genes de RNA ribossômico (rRNA), e um total de 327 subsistemas, com 25 genes envolvido na biossíntese de sideróforo, e 15 envolvidos na aquisição de ferro no metabolismo, na categoria dos subsistemas, não foram encontrados genes envolvidos na produção de fitormônio (Figura S2). O gráfico circular da distribuição das anotações do genoma da linhagem MAD51 está representado na Figura 7, onde mostra o anel externos com regiões dos contigs montados na cor azul, as regiões de CDS - cadeia direta e cadeia reversa na cor (verde e roxo), genes AMR (resistência antimicrobiana) em vermelho, genes para fatores de virulência (amarelo), genes transportadores (azul), e conteúdo de G+C na cor preta, respectivamente.

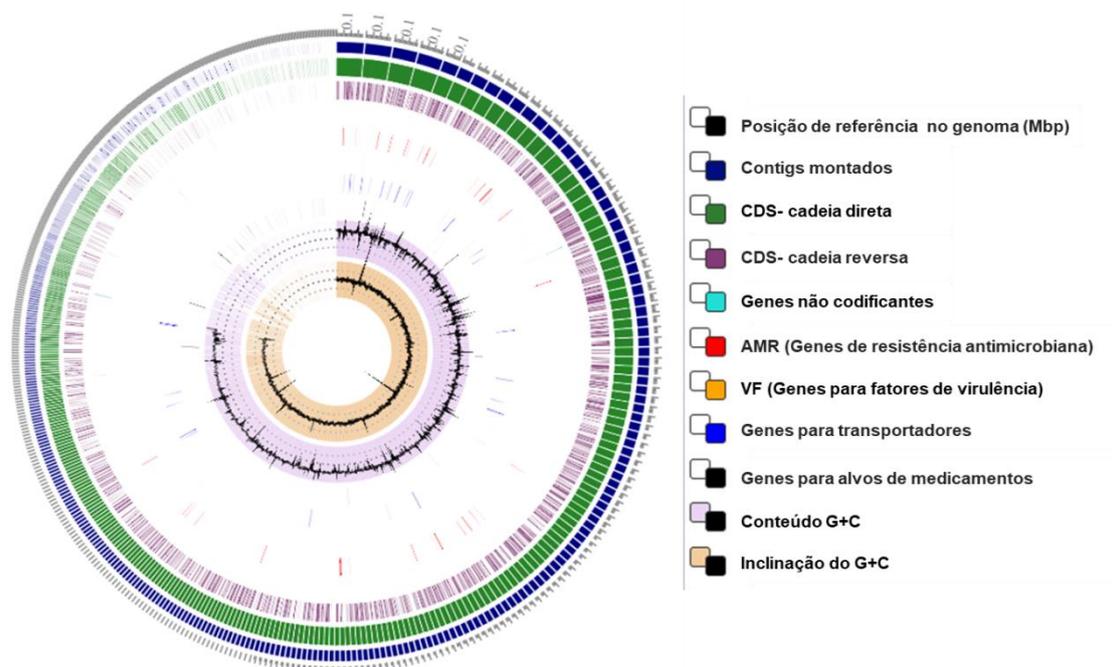


Figura 7: Visão circular do genoma da linhagem MAD51 (esquerda) e as regiões anotadas. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita).

A linhagem MAD1003 apresentou genoma de 6.642.326 (pb), conteúdo GC de 71.5%. Foram identificados 6297 CDSs, 8 rRNAs e 66 tRNAs. O genoma completo está representado na (Figura 8) onde mostra a posição dos contigs, CDS cadeia direta e cadeia reversa, genes de resistência antimicrobiana, genes para fatores de virulência, genes transportadores, e conteúdo de G+C.

A anotação no RAST revelou um total de 312 subsistemas, foram identificados 42 genes nas categorias aquisição e metabolismo do ferro, 32 genes relacionados para produção de sideróforo (Figura S3).

As linhagens MAD51 e MAD1003 possuem genomas com conteúdo G+C acima de 70%, característica comum em bactérias do gênero *Streptomyces* (Wright; Bibb, *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2012).

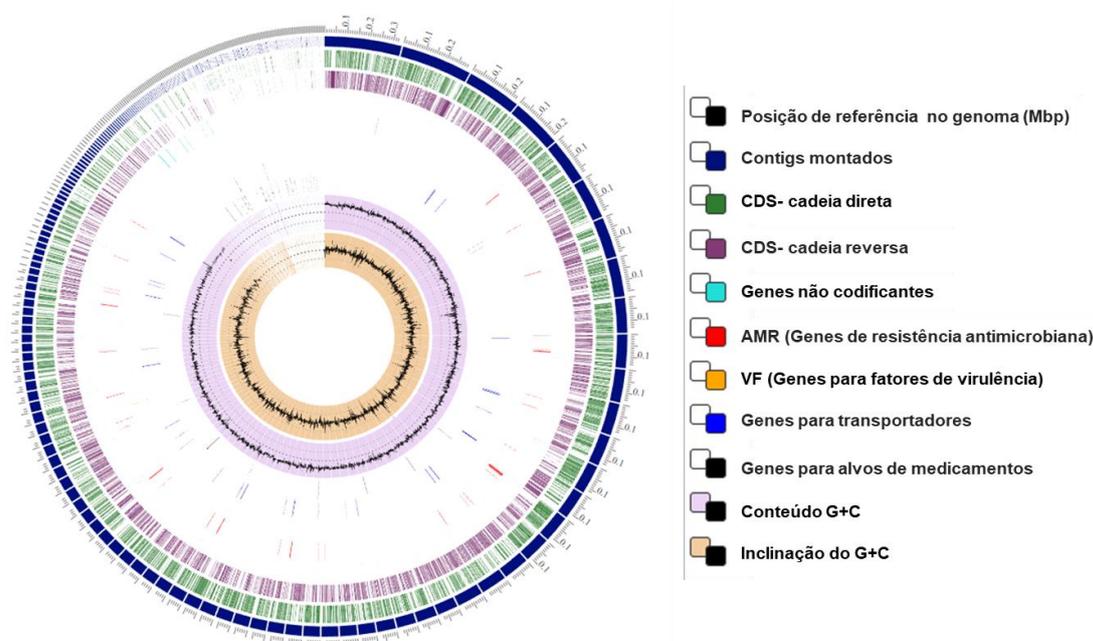


Figura 8: Visão circular do genoma da linhagem MAD1003 (esquerda) e as regiões anotadas. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita).

A linhagem SOL105 apresentou genoma com tamanho de 4.664.203 (pb), conteúdo G+C de 66.6% com o total de 4304 regiões codificadoras (CDS), 4 genes para RNA ribossômico (rRNA), 67 genes de RNA transportador (tRNAs) e 56 contigs. A (Figura 9) mostra o mapa circular do genoma completo da linhagem SOL105, representados com códigos de cores, mostrando a posição dos contigs, CDS cadeia direta e cadeia reversa, genes de resistência

antimicrobiana, genes para fatores de virulência, genes transportadores, e conteúdo de G+C.

A anotação identificou o total de 304 subsistemas, e na categoria de metabolismo secundário foram identificados 4 genes envolvidos na biossíntese do fitormônio auxina e 8 genes para produção de sideróforos. Foi possível notar a presença de 36 genes relacionados a fatores de virulências, com 24 envolvidos na resistência a antibióticos (Figura S4).

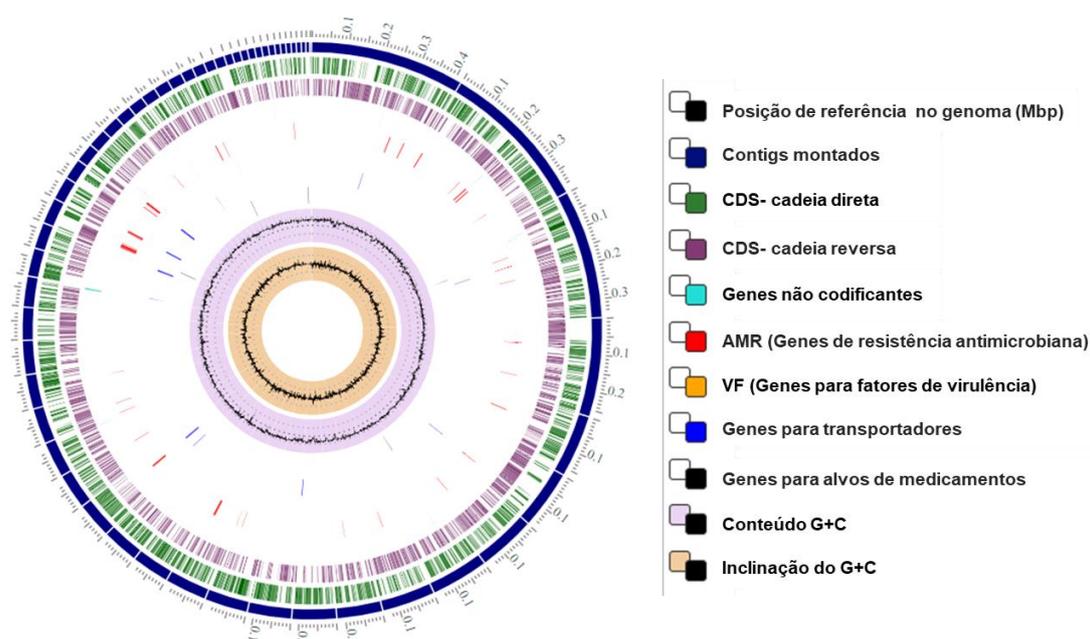


Figura 9: Visão circular do genoma da linhagem SOL105 (esquerda) e as regiões anotadas. Os anéis na figura são exibidos da parte externos para os internos representando as posições dos contigs, CDS na fita direta, CDS na fita reversa, genes não codificantes, genes AMR (resistência antimicrobiana), genes para fatores de virulência e conteúdo de G+C. As cores de cada anéis representados estão presentes na legenda a (direita).

5.2.2 Identificação taxonômica baseada em valores de GGDC e dDDH

O sequenciamento do genoma completo foi obtido para quatro das seis linhagens, sendo que o isolados MAD142 e SOL146 o sequenciamento está em andamento. A identificação das linhagens por meio de abordagem filogenômica baseado em dDDH, ANI e AAI das quatro bactérias suportam a ocorrência de três espécies novas.

Os valores de dDDH (*digital DNA–DNA hybridization*) na fórmula d2 calculados com base no algoritmo GGDCs (*Genome-to-Genome Distance Calculator*) e na fórmula d0, d4 e d6 obtidos via TYGS revelam que apenas a

linhagem MAD34 apresentou ponto de corte correspondente com espécies já descrita na literatura (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de hibridização digital DNA-DNA (dDDH) e conteúdo G+C das linhagens Isoladas dos Rios Madeira e Rio Solimões. Todos os valores foram calculados utilizando a ferramenta TYGS e estimados usando o Genome to Genome Distance Calculator - GGDC.

Isolados	TYGS Type (Strain) Genome Server	dDDH (d0, in %)	*dDDH (d2, in %)	**dDDH (d4, in %)	dDDH (d6, in %)	G+C content difference (%)
MAD34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	97.2	95.1	95.6	98.2	0.04
MAD51	<i>Streptomyces costaricanus</i> DSM 41827	66.3	54.9	55.0	65.7	0.31
MAD1003	<i>Streptomyces bahiniae</i> Bv016T	79.9	68.1	68.1	80.5	0.22
SOL105	<i>Stenotrophomonas africana</i> LMG 22072	72.5	46.4	47.6	68.6	0,25

Valores de dDDH nas fórmulas d2 e d4 menores que 70% são indicativos de novas espécies.

*Fórmula d2 calculados no servidor Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0

**Fórmula d4 estimadas no TYGS (Type (Strain) Genome Server).

A linhagem MAD34 apresenta valor de dDDH na fórmula d2 de 95.1%, e dDDH na fórmula d4 de 95.6% em relação a espécie tipo de *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071, confirmando que o isolado MAD34 pertence a essa espécie, visto que a delimitação de espécies baseada na fórmula d2 e d4 dDDH, estabelece que pode ser considerada a mesma espécie, quando os valores forem iguais ou superiores a 70%, enquanto valores abaixo deste ponto de corte é indicativo de nova espécie (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013). A árvore filogenética construída com base no genoma completo do isolado MAD34, conforme o esperado, agrupou com a espécie tipo *P. aeruginosa* DSM 50071 conforme descrita pelo banco de dados LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (Figura 10).

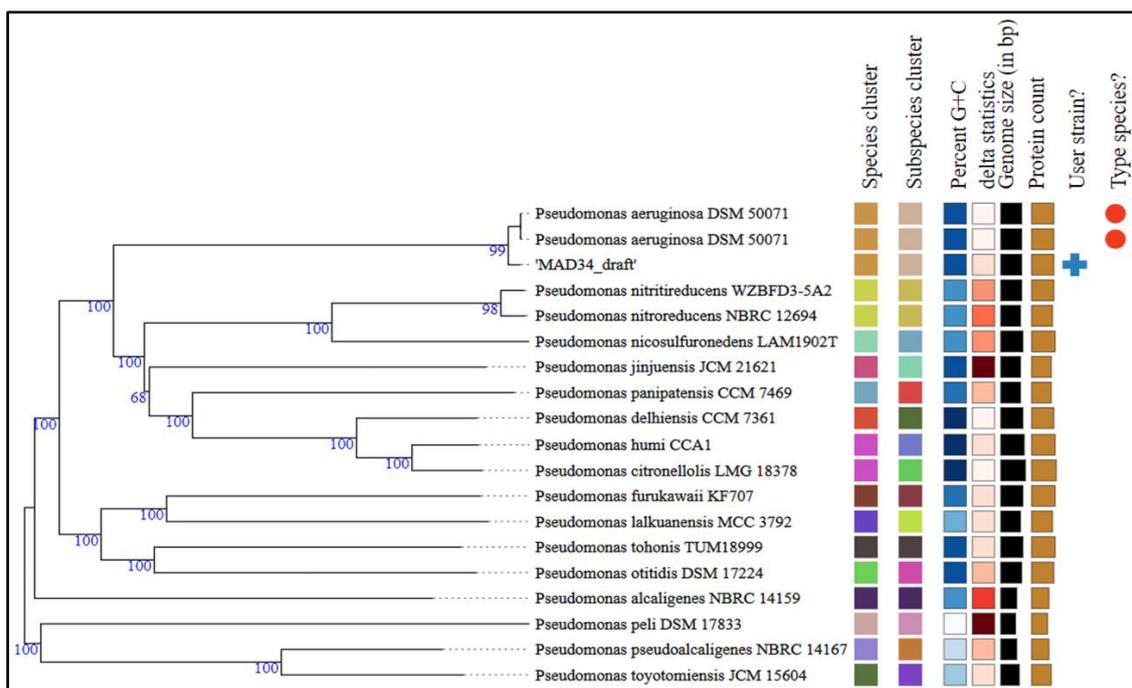


Figura 10: Árvore filogenética construída pelo TYGS baseada no rascunho do genoma completo do isolado MAD34 e as linhagens tipo de *Pseudomonas aeruginosa* DSM50071.

A linhagem MAD51 apresentou valores de dDDH (d2) de 54.9% e dDDH (d4) de 55.0%, enquanto MAD1003 68.1% para as fórmulas (d2 e d4). Considerando o ponto de corte, os valores apresentados são indicativos que estas linhagens representam duas novas espécies de *Streptomyces*.

A linhagem MAD51 formou um clado juntamente com *Streptomyces costaricanus*, *S. pheogriseichromatogenes* e *S. griseofuscus* (Figura 11). Estudos recentes reclassificaram a *S. costaricanus* como um heterotípico de *S. murinus* com valores de dDDH de 70.9-74.6% e identidade média de nucleotídeos 96.5-97.0%, sendo *S. murinus* nome válido (Komaki, 2021).

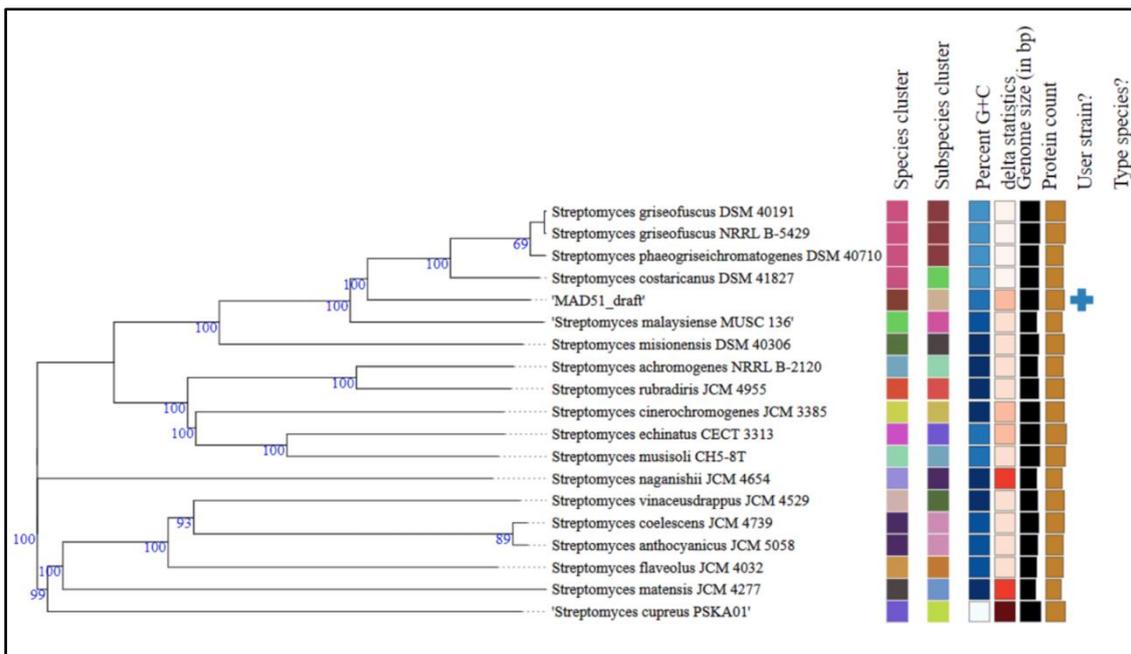


Figura 11: Árvore filogenética baseada em sequências genômicas das isolado MAD51 e as strains tipo mais próximo relacionadas no banco de dados TYGS ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/)), mostrando a relação entre o isolado MAD51 e com *Streptomyces costaricanus*.

Análise filogenética do isolado MAD1003 baseada no genoma completo formou um clado com de *S. bauhinae*, *S. griseoluteus*, *S. seoulensis*), sendo *S. bauhinae* Bv016T a espécie tipo filogeneticamente mais relacionada (Figura 12).

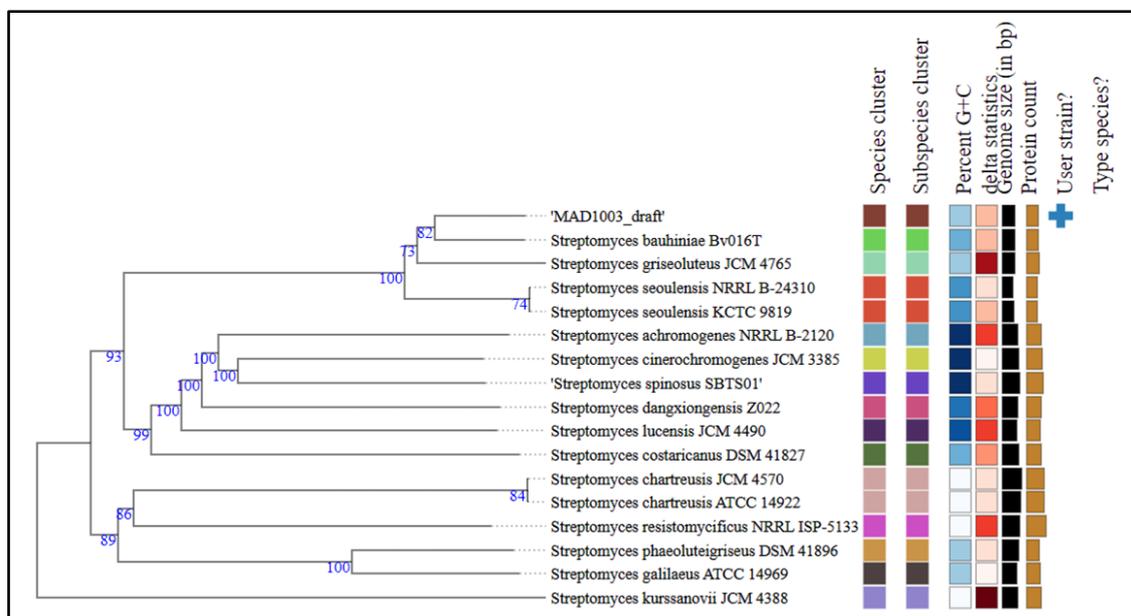


Figura 12: Árvore filogenética baseada em sequências genômicas das isolado MAD1003 e as strains tipo mais próximo relacionadas no banco de dados TYGS ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/)), mostrando a relação entre o isolado MAD51 e com *Streptomyces bauhinae* Bv016T como espécie tipo relacionadas.

A linhagem SOL105, também apresentou dDDH abaixo de 70%, com valores de 46.4% na fórmula de dDDH (d2) e 47.6% de dDDH (d4), indicando que SOL105 representa uma nova espécie de *Stenotrophomonas*, proximamente relacionada com *S. africana* LMG22072.

A árvore filogenética baseada no TYGS mostrou que o isolado SOL105 não formou clado nem mesmo com a espécie tipo *Stenotrophomonas africana* a qual apresentou maior valor de dDDH (Figura 13).

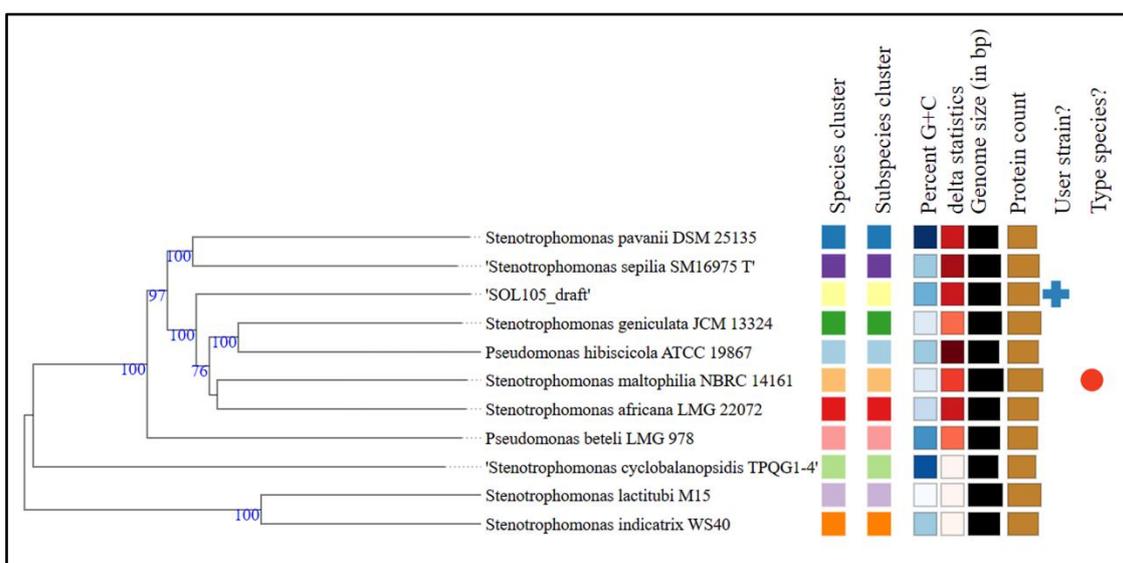


Figura 13: Árvore filogenética baseada em sequências genômicas das isolado SOL105 e as strains tipo mais próximo relacionadas no banco de dados TYGS ([https:// tygs.dsmz.de/](https://tygs.dsmz.de/)), mostrando a relação entre o isolado SOL105 com *Stenotrophomonas pavanii* DSM25135 e *Stenotrophomonas sepiilia* SM16975^T.

O conteúdo G+C de todos os isolados, apresentaram valores abaixo de 1%, o que reforça a confiabilidade das identificações realizadas pelo TYGS, visto que a diferença de conteúdo G+C de > 1% indica um resultado de identificação potencialmente não confiável porque dentro da espécie, o conteúdo G+C não varia mais que 1%, quando calculado a partir de dados de sequências genômicas (Meier-Kolthoff; Klenk; Göker, 2014). Além disso, trabalhos recentes têm indicado que o conteúdo de G+C é um importante marcador taxonômico de afiliações a espécies distintas se a diferença entre duas sequências genômicas exceder 1% (Meier-Kolthoff; Göker, 2019).

5.2.3 Identificação baseada em valores de ANI e AAI

A identidade média de nucleotídeos (ANI) e identidades médias de aminoácidos (AAI) além do dDDH e GGDC, são métodos utilizados para delimitação de espécies bacterianas quando se tem disponível o genoma completo ou rascunho de genoma. Em conjunto esses parâmetros são considerados o novo padrão ouro, usado como critério para identificar novas espécies (Lalucat *et al.*, 2020).

Com base nas análises realizadas, para identificação das espécies de bactérias utilizadas neste trabalho, foram definidas como nova espécie aquelas que apresentam ponto de corte menor que 70% para dDDH, 95% para ANI, 90% para AAI quando comparadas com a espécie tipo que fazem parte da *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) disponível em <https://lpsn.dsmz.de>, (Meier-Kolthoff *et al.*, 2021).

Os valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) e identidades médias de aminoácidos (AAI), corroboram com os resultados obtidos com base no dDDH, indicando que apenas a linhagem MAD34 apresenta valores acima do ponto de corte, para linhagem descrita (Tabela 6).

Tabela 6: Valores das médias da identidade nucleotídica (ANI, ANIb e ANIm) e identidade média de aminoácidos (AAI). Os valores de AAI foram calculados no servidor Kosta Lab utilizando a ferramenta *AAI Average Amino acid Identity* (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>) utilizando os parâmetros padrão.

Isolados	ANI (%)	OrthoANI (%)	AAI (%)	ANIb (%)	ANIm (%)
MAD34	99.39	99.34	99,35	99.17	99.45
MAD51	93.98	94.35	93.47	93.59	94.36
MAD1003	96.21	96.24	96.30	95.65	96.36
SOL105	91.99	92.10	94.35	91.50	92.41

AAI - identidade média de aminoácidos > 90%

ANIm - MUMmer

ANIb - Blast+

ANI- identidade média de aminoácidos (95~96%)

MAD34 apresentou resultados de identidade média de nucleotídeos (ANI) obtidos pelo software ANI calculator de 99.39%. E a análise comparativa com o algoritmo OrthoANI, entre MAD34 e quatro espécies de *Pseudomonas* filogeneticamente mais relacionadas mostraram valores que variaram de 99.34% com *P. aeruginosa* a 82.0% com *P. humi* (Figura. 14). Já os valores de (ANI_b) do isolado MAD34 foi 99.17%, o de ANI baseado em MUMmer (ANI_m) ficou em 99.45%, enquanto os valores de identidades médias de aminoácidos (AAI) comparada com *Pseudomonas aeruginosa* apresentou valor de 99.35%.

Valores para delimitação de espécie usando identidade média de aminoácidos AAI (>90%) e ANI_m é de 95~96%, valores abaixo desse limite é um indicativo de nova espécie e valores acima indicam a mesma espécie (Rodriguez-R *et al.*, 2014; Richter; Rosselló-Móra, 2009; Yoon *et al.*, 2017). Esse resultado corrobora com os dados de dDDH e confirma que MAD34 pertence a espécie *P. aeruginosa*.

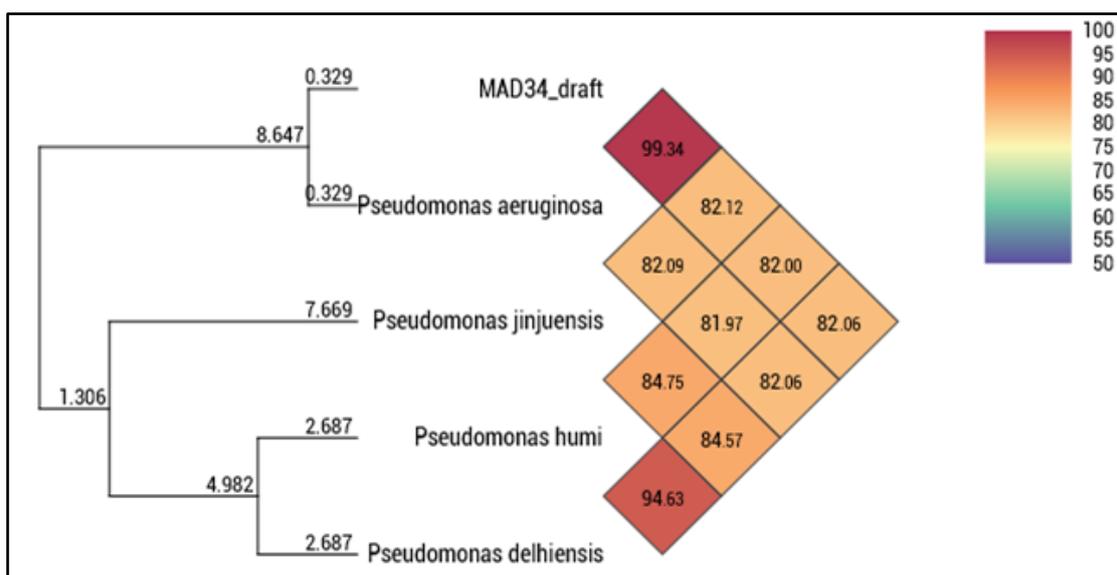


Figura 14: Heatmap dos valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) por ortologia (OrthoANI) entre o isolado MAD34 e as linhagens das espécies a quatro espécies de *Pseudomonas*, tendo como espécie tipo mais relacionadas *Pseudomonas aeruginosa*.

As linhagens de *Streptomyces* MAD51 e MAD1003 obtiveram respectivamente valores de ANI de 93.98 e 96.21%, OrthoANI de 94.35% com *S. murinus* e 96.24% com *S. bauhiniae* (Figura. 15 **A** e **B**) e AAI de 93.47% com *S. murinus* e 96.30% com *S. bauhiniae*. Os valores de ANI_m foram 94.36% (MAD51) e 96.36% para MAD1003 (Tabela 6).

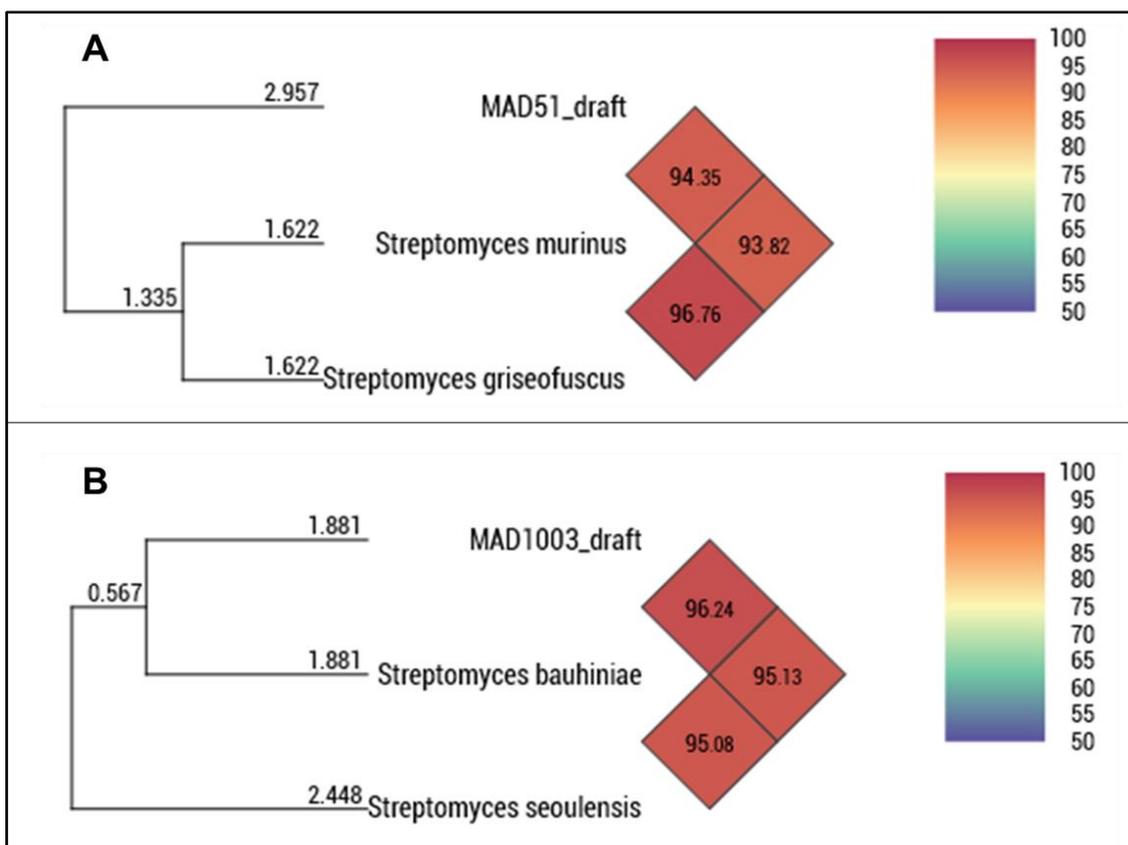


Figura 15: Heatmap dos valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) por ortologia (OrthoANI). Valores de ANI do isolado MAD51 comparados com duas linhagens de *Streptomyces*, tendo espécies *Streptomyces murinus* como espécie tipo mais relacionadas (A). Valores de ANI do isolado MAD1003 alinhadas a duas linhagens de *Streptomyces*, tendo espécies de *Streptomyces bauhiniae* como espécie tipo mais relacionadas (B).

De acordo com os parâmetros utilizados para delimitação de espécies, a linhagem MAD51 apresentou os valores de ANI independente do algoritmo utilizado, abaixo do ponto de corte podendo ser considerada uma nova espécie. Enquanto MAD1003 apresenta valores ANIm acima do limite do ponto corte (95~96) estabelecido por Richter e Rosselló-Móra (2009). Entretanto no caso de *Streptomyces* estudos recentemente têm estabelecido novo limite com valor de 96.7% para delimitação de espécies do gênero. No entanto, se o valor dDDH ou ANIm for menor, mas ainda próximo ao ponto de corte de 70 ou 96.7%, o status taxonômico de uma nova linhagem só pode ser determinada por uma combinação de características fenotípicas, quimiotaxonômicos e análise filogenômica (Hu *et al.*, 2022).

A linhagem SOL105 obteve valor de ANI de 91.99% e o OrthoANI, entre SOL105 e as cinco espécies de *Stenotrophomonas* filogeneticamente mais relacionadas apresentaram valores que variaram de 92,10% com *Stenotrophomonas maltophilia* a 91,18% com *Stenotrophomonas pavanii* (Figura. 16), a identidade média de aminoácidos (AAI) foi de 94.35%. Os valores de ANIb foi de 92.50%, e de (ANI_m) 92.41%. Todos os valores estão abaixo do ponto de corte, confirmando que SOL105 representa uma nova espécie do gênero *Stenotrophomonas* que atualmente apresenta 30 taxos, com 19 espécies válidas incluindo sinônimos ([https://lpsn.dsmz.de/genus/ Stenotrophomonas](https://lpsn.dsmz.de/genus/Stenotrophomonas)).

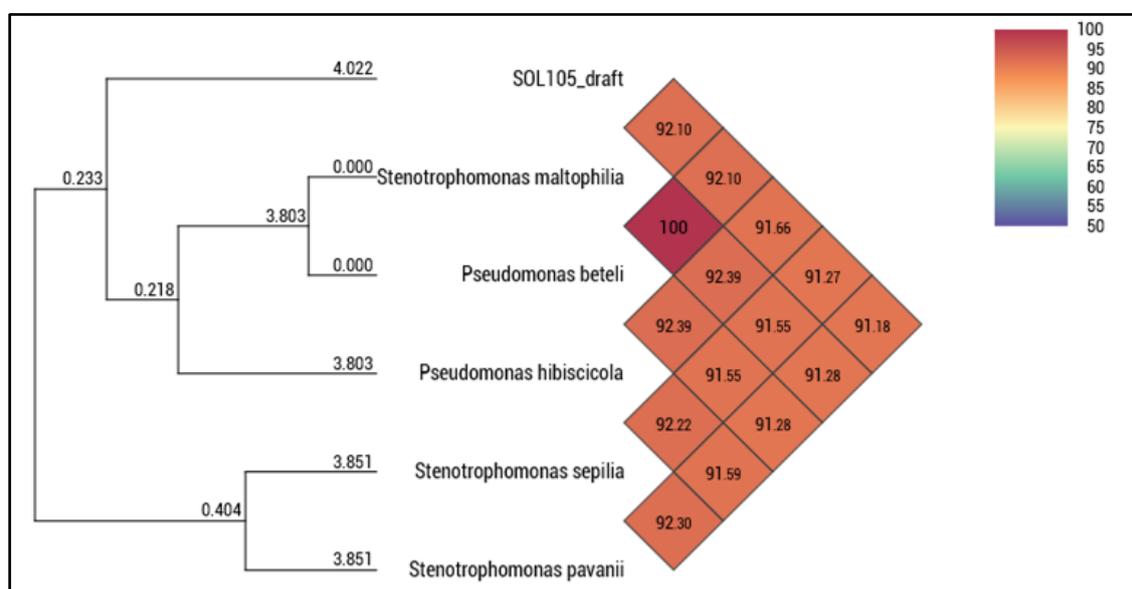


Figura 16: Heatmap dos valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) do isolado SOL105 baseada nos resultados de TYG com espécies intimamente próximas.

5.2.4 Análise de Pangenoma

O termo pan-genoma foi cunhado pela primeira vez há quase duas décadas por Tettelin e colaboradores (2005) para descrever a união de sequência (geralmente genes ou quadros de leitura aberta, ORFs) compartilhadas por genomas de interesse. Na literatura científica, o termo frequentemente usado para descrever abordagem relacionadas à união, interseção e qualquer combinação de subconjuntos dessa coleção de sequências é bastante variável, podem ser usados os termos: pangenoma, genes centrais, genes dispensáveis e genes específicos de linhagem, supragenoma, genes distribuídos e genes únicos, conjunto de genes acessórios e de caráter e regiões flexíveis, são termos que podem ser encontrados na

literatura para se referir a algum tipo de análise pangenômica (Vernikos *et al.*, 2015).

Atualmente o termo pangenoma é usado para englobar todo o repertório de genes acessíveis ao clado estudado; o genoma central que contém genes compartilhados por todas as linhagens dentro do clado que tipicamente inclui genes responsáveis pelos aspectos básicos da biologia do clado e suas principais características fenotípicas; o genoma dispensável feito de genes compartilhados por um subconjunto das linhagens que contribui para a diversidade das espécies, pode codificar vias bioquímicas complementares e funções que não são essenciais para o crescimento, mas que conferem vantagens seletivas, como adaptação a diferentes nichos, resistência a antibióticos, ou colonização de um novo hospedeiro; bem como os genes específicos de estirpe (Medini *et al.*, 2005).

Visando identificar sequências únicas em cada uma das linhagens amazônicas com genoma completo obtidos, as linhagens MAD34, MAD51, MAD1003 e SOL105 foram submetidas a análise de pangenoma.

Análise de pangenoma do isolado de *Pseudomonas aeruginosa* MAD34 com as espécies tipo *Pseudomonas aeruginosa*, *P. jinjuensis*, *P. humi* e *P. delhiensis* revelou 5887 proteínas, 5473 clusters ortólogos com 382 genes codificadores de proteínas únicas (singletons). Quando comparados genes em cluster, 10 clusters estão presentes apenas em MAD34 (Figura S5) relacionados à biossíntese do antibiótico fenazina (GO0002047), ligação de íons metálicos (GO0046872) e processo biossintético da piridoxina (GO0008615).

A linhagem MAD51, representa uma nova espécie amazônica do gênero *Streptomyces*, quando comparada com as espécies tipo *Streptomyces murinus* DSM41827 e *Streptomyces griseofuscus* NRRLB-5429, onde apresentou 8066 proteínas, 6293 clusters e 1677 genes codificadores de proteínas únicas (singletons).

Foram identificados 49 cluster exclusivos da linhagem MAD51 (Figura S6), com vários genes não identificados e alguns relacionados ao processo biossintético de toxina (GO0009403), resposta a antibiótico (0046677) e processo biossintético da valina (GO0009099).

A possível espécie nova de *Streptomyces* MAD1003 quando comparada com as espécies tipos mais relacionados *Streptomyces bauhiniae* Bv016T e *Streptomyces seoulensis* NRRL B-24310 (Figura S7), revelou a presença de 6297 proteínas, com 5339 clusters e um total de 919 genes codificadores de proteínas únicas (singletons). As proteínas destes clusters estão relacionadas à ligação de íon metálico (GO0046872), ligação de ATP (GO0005524) e processo viral (GO0016032).

A análise de pangenoma da nova espécie de *Stenotrophomonas* SOL105, em comparação com com as espécies tipo *Stenotrophomonas maltophilia* NBRC 14161, *Pseudomonas hibiscicola* ATCC 19867 (*Stenotrophomonas maltophilia* group) e *Stenotrophomonas seipilia* SM16975 T apresentou um total de 4304 proteínas, com 3696 clusters e 556 genes codificadores de proteínas únicas (singletons) e 30 clusters com genes únicos que são específicos na linhagem SOL105 (Figura S8). Embora a maioria dos genes desses cluster exclusivos não estejam anotados, foram identificadas duas proteínas relacionadas à atividade de toxina (GO: 0050827), que interage seletivamente com uma ou mais moléculas biológicas do organismo alvo, iniciando a patogênese (levando a um estado anormal, geralmente prejudicial) no organismo-alvo.

5.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE AGRÍCOLA E INDUSTRIAL

A avaliação qualitativa para protease, lipase, pectinase, celulase, amilase e quitinase extracelulares foi verificada no período de 5 dias após o inóculo, o tempo de incubação foi estabelecida conforme a adaptação de cada linhagem, as linhagens *Streptomyces* sp. MAD51, *Streptomyces* sp. MAD1003, *Bacillus* sp. SOL146 e *Stenotrophomonas* sp. SOL105 apresentaram atividade positivas para três das seis enzimas testadas (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados da presença de atividades enzimáticas das 6 bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões

Isolados	Lipase	Amilase	Celulase	Protease	Quitinase	Pectinase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MAD34	-	-	-	+	+	-
<i>Streptomyces</i> sp. MAD51	+	+	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. MAD1003	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. MAD142	-	+	-	+	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SOL146	+	-	-	+	+	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SOL105	+	-	-	+	+	-

Nos ensaios para a produção de lipase, dos seis (6) isolados testados apenas a MAD34 e MAD142 não apresentaram atividade. A evidência da atividade enzimática se dá pela formação de um halo cristalino ao redor da colônia, observado nas linhagens MAD51, MAD1003, SOL105 e SOL146 (Figura S9).

A lipase é uma enzima com grandes aplicações na indústria, possuindo um valor estimado em US\$ 425,0 milhões em 2018 com estimativa de atingir US\$ 590,2 milhões em 2023, isso se dar, devido seu uso industriais com a fabricação de moléculas alteradas e na indústria de detergentes podendo reduzir a poluição industrial (Chandra *et al.*, 2020). Os dados obtidos mostram que os isolados SOL105 e SOL146 são candidatos para produção de lipase.

Dos isolados testados, três apresentaram resultados positivos para produção de amilase: *Bacillus* sp. SOL146 e os dois isolados de *Streptomyces* MAD1003, MAD51 (Figura S10). As amilases são enzimas responsáveis pela degradação de amido, um carboidrato muito utilizado por microrganismos procaríotos e eucariotos. Nas plantas, esta enzima hidrolisa o amido em açúcares metabolizáveis, fornecendo energia para o crescimento de raízes e novos brotos (Kaneko *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Gopinath *et al.*, 2017).

A produção de celulase, foi verificada somente nos isolados *Streptomyces* MAD51 e MAD1003 (Figura S11). Entre os microrganismos

produtores de diferentes enzimas, as actinobactérias são vistas como uma fonte promissora (González *et al.*, 2020; Ruginescu *et al.*, 2022).

A presença de protease foi verificada em dois meios diferentes, ágar leite e ágar gelatina (Figura 17). Dos seis isolados, a atividade enzimática foi detectada em quatro deles: *Pseudomonas aeruginosa* MAD34, *Stenotrophomonas* sp. SOL105, e nos *Bacillus* spp. MAD142 e SOL146. As *Streptomyces* MAD51, e MAD1003 apresentam baixa atividade em ágar leite, não sendo claro a presença de halos ao redor da colônia em ágar gelatina.

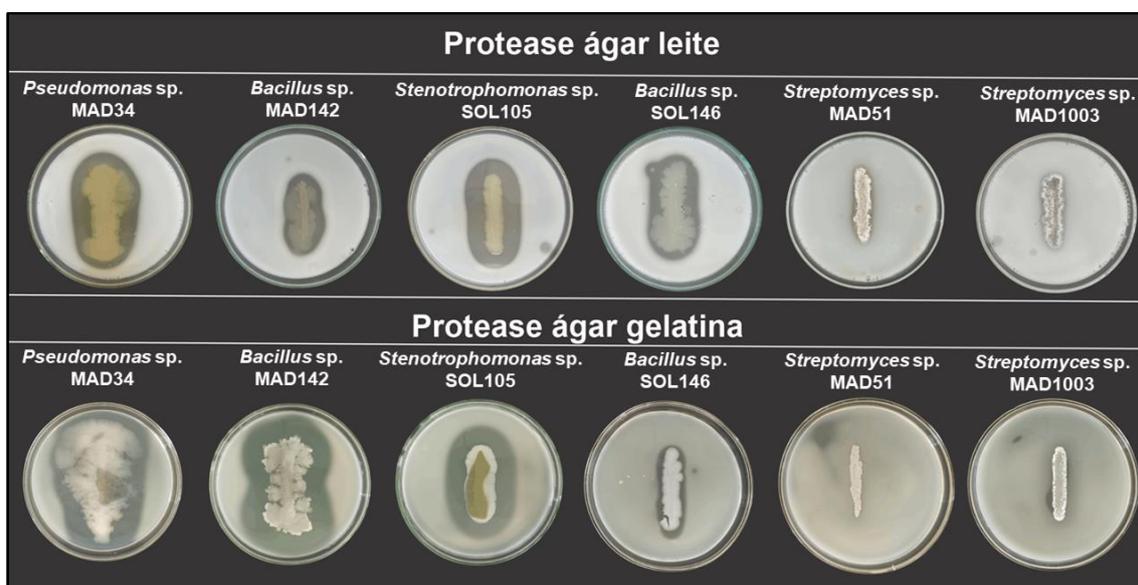


Figura 17: Atividade proteolítica de bactérias, presente em dois meios diferentes. Na fileira superior, os isolados foram testados em ágar leite. A fileira inferior mostra atividade proteolítica em meio ágar gelatina. A presença do halo ao redor da colônia mostra atividade positiva.

A atividade quitinolítica realizada pela técnica de (*cup-plate*) foi detectada em 3 (três) isolados bacterianos *Pseudomonas aeruginosa* MAD34, *Stenotrophomonas* sp. SOL105, e *Bacillus* sp SOL146 (Figura S12). Os Isolados (MAD51, MAD1003 e MAD142) não apresentaram resultados atividade quitinolítica. A quitinase desempenha um papel importante para muitos organismos, fungos e bactérias produtores de quitinase tem potencial para o desenvolvimento de biopesticidas e no controle de fungos fitopatogênicos (Korany *et al.*, 2019).

Nenhuma atividade para a produção de pectinase foi identificada para os seis isolados avaliados.

5.4 CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS RELACIONADAS À PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

5.4.1 Produção de sideróforo e Solubilização de fosfato

A capacidade de produzir sideróforos foi observada em 5 (cinco) isolados: *Pseudomonas aeruginosa* MAD34, *Stenotrophomonas* sp. SOL105, *Bacillus* sp. MAD142, *Streptomyces* MAD51 e MAD1003.

As linhagens *Pseudomonas aeruginosa* MAD34, *Streptomyces* MAD1003 e *Stenotrophomonas* sp. SOL105 mostraram a presença de halos muito maiores que as linhagens *Bacillus* sp. MAD142, *Streptomyces* MAD51. A linhagem de *Bacillus* sp. SOL146 não apresentou capacidade de produzir sideróforos (Figura 18).

A produção de sideróforo por bactérias é fundamental para captura de ferro, além de ser uma importante característica antagônica encontrada em muitos agentes de biocontrole, pois torna o ferro indisponível para outros microrganismos, assim, limitando o crescimento de muitos patógenos de plantas (Yu *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2019; Rehan *et al.*, 2022).

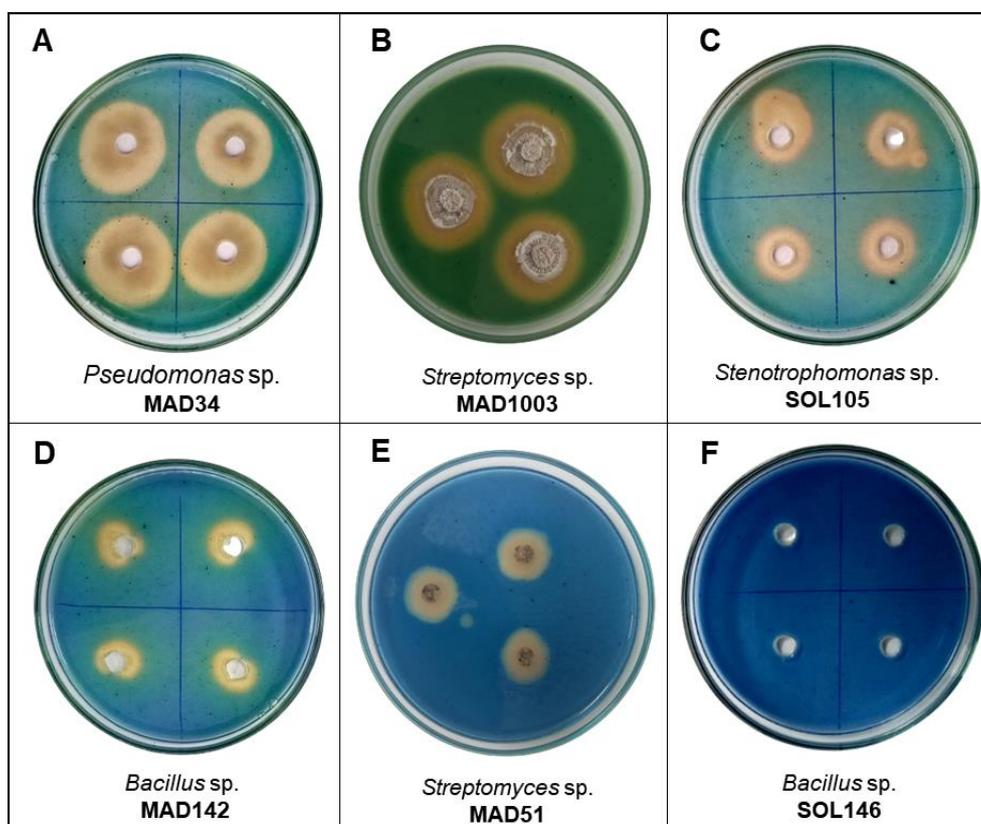


Figura 18: Produção de sideróforo em meio CAS por bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões. A presença de halo amarelo mostra a capacidade de produzir sideróforo.

A habilidade de solubilizar fosfato foi observada para a maioria das linhagens, contudo *Stenotrophomonas* SOL105 não solubilizou AlPO_4 e embora tenha sido observado um crescimento lento das linhagens em fosfato de ferro (FePO_4), nenhum dos isolados foi capaz de solubilizá-lo (Figura 19).

A capacidade de solubilizar fosfato de alumínio (AlPO_4) e ferro FePO_4 é considerada incomum, mesmo entre as bactérias do nódulo de feijão-caupi, esse fato pode ser associado com a sensibilidade dos isolados à toxicidade dos metais que aumentam junto com a solubilização (Rogers *et al.*, 2001). O crescimento lento ou a ausência de crescimento em meio com fosfato de ferro de isolados bacterianos de nódulo de feijão-caupi também foi relacionado à incapacidade de solubilizar FePO_4 (Kenasa *et al.*, 2020).

Tabela 8: Resultados de solubilização de fosfato de bactérias isoladas de sedimentos dos rios Madeira e Solimões.

Isolados	AlPO_4	FePO_4	PVK	NBRIP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MAD34	+	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. MAD142	+	-	-	+
<i>Bacillus</i> sp. SOL146	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. MAD51	+	-	+	-
<i>Streptomyces</i> sp. MAD1003	+	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SOL105	-	-	-	-

Os resultados nos meios sólidos de Pikovskaya (PVK) mostra que as linhagens MAD51 é capaz de solubilizar fosfato inorgânico, indicando a formação de halos ao redor da colônia. Os dados de solubilização de fosfato insolúvel em meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth*) mostra que apenas duas linhagens MAD34 e MAD142 apresentaram a formação de halo (Figura 19).

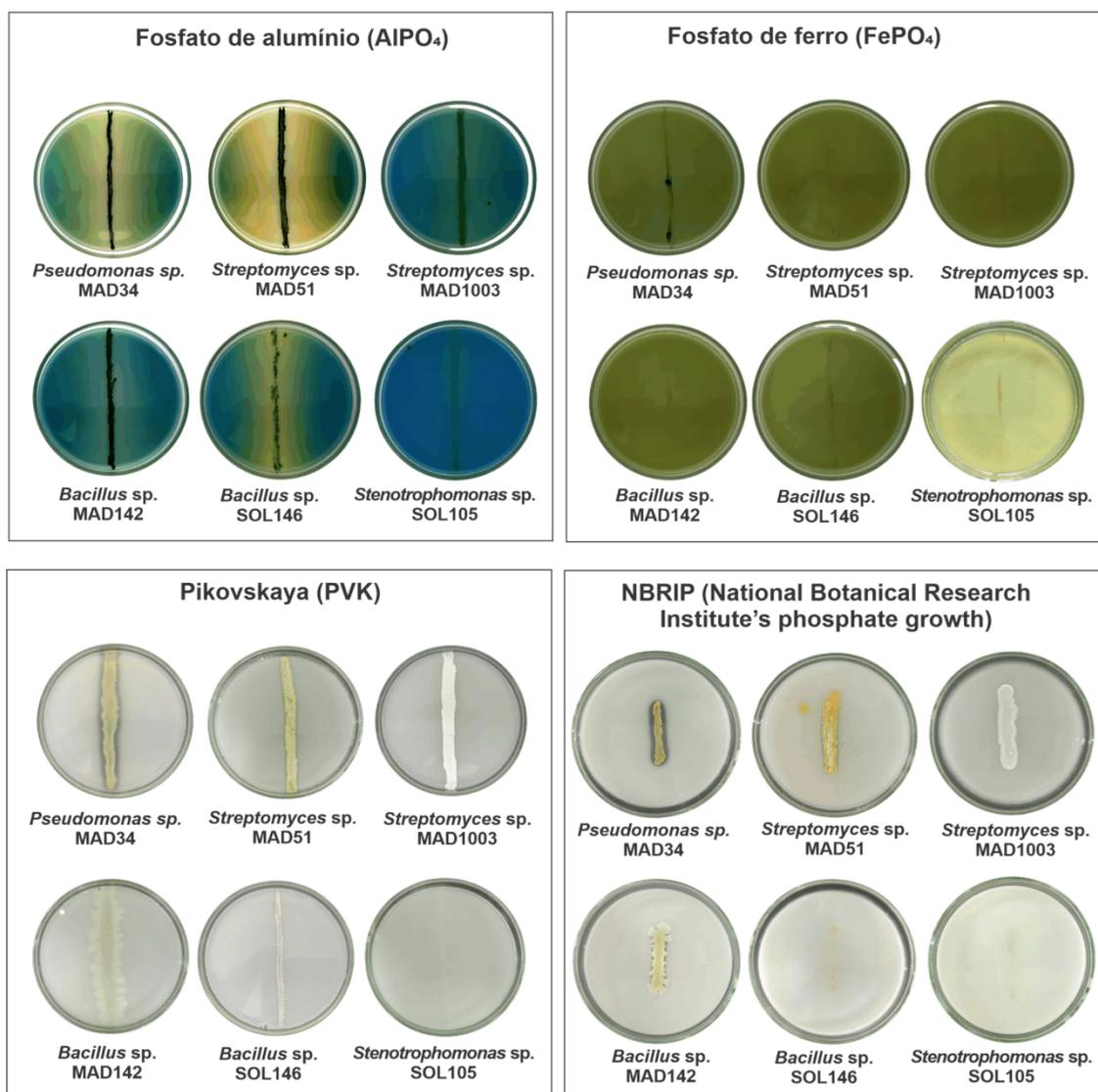


Figura 19: Solubilização de fosfato de de bactérias isoladas, dos rios Madeira e Solimões em placas contendo quatro meios diferentes: ágar fosfato AlPO_4 , ágar fosfato de FePO_4 , Meio Pikovskaya (PVK) e meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth*).

5.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)

Os resultados mostraram que as linhagens analisadas são capazes de produzir ácido indolacético (AIA) *in vitro*. As concentrações de auxinas (AIA) produzidas pelos isolados variaram de 36,3 a 70,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura S13, Tabela 9), tendo melhores resultados para as linhagens MAD34, MAD142 e SOL146.

A linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* MAD34 obteve um rendimento máximo de IAA de 54,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na presença de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de triptofano, após 72 h de incubação. A linhagem de *Bacillus* sp. MAD142 obteve uma concentração de 67,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e *Bacillus* sp. SOL146 com 70,8 67,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

obtendo as concentrações mais elevadas, sendo bactérias com capacidade de produzirem AIA com estudos que provam sua eficiência como promotoras do crescimento de plantas (Batista *et al.*, 2018).

Tabela 9: Concentração de ácido indolacético (AIA) produzidas pelas linhagens de bactérias isoladas dos rios Solimões e rio Madeira, a tabela mostra a absorbância e a concentração de AIA produzida por cada isolado.

Isolados	Absorbância	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Streptomyces</i> sp. MAD51	0.088	42.2
<i>Streptomyces</i> sp. MAD1003	0.068	36.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MAD34	0.129	54.3
<i>Bacillus</i> sp. MAD142	0.172	67.0
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SOL105	0.113	49.6
<i>Bacillus</i> sp. SOL146	0.185	70.8

5.6 POTENCIAL ANTAGONISTA NO CONTROLE *in vitro* CONTRA FITOPATÓGENOS

Os seis (6) isolados foram testados contra treze (13) fungos fitopatogênicos e avaliados no período de 15 dias (Figuras 20).

Os resultados da inibição *in vitro* obtidos, revelaram que *Pseudomonas aeruginosa* MAD34 apresentou melhor resultado nos testes de antagonismo, com um índice de inibição com variação de 54.70% a 90.47%. Os maiores valores foram observados contra: *Moniliophthora perniciosa* (MP01) 86.41%, *Colletotrichum scovillei* (2910) 87.77%, *Neopestalotiopsis formicidarum* (INPA 2917) 90.46%. O mecanismo antagonista observado apresenta características de competição, com contato direto entre a bactéria e fitopatógenos e crescimento sobre o mesmo, ocasionando a morte do fitopatógeno, sem aparente antibiose.

O isolado *Bacillus* sp. MAD142 apresentou taxa de inibição do crescimento micelial acima de 70% para 9 (nove) fitopatógenos, sendo os maiores índices contra *C. scovillei* 91.48% e *C. guaranicola* 85.41%. Sendo o segundo mais eficiente em termos percentuais de inibição do conjunto de patógenos testados, perdendo apenas para o isolado MAD34. Já o *Bacillus* SOL146 embora tenha apresentado índice de inibição do crescimento superior

a 70% apenas para um fitopatógeno, sendo numericamente o mais eficiente contra *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942) com 83.73% de inibição (Figura 20).

Controle	<i>Pseudomonas</i> sp. MAD34	<i>Streptomyces</i> sp. MAD51	<i>Streptomyces</i> sp. MAD1003	<i>Bacillus</i> sp. MAD142	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SOL105	<i>Bacillus</i> sp. SOL146
<i>Fusarium decemcellulare</i> Fdc 307	76,19%	62,96%	50,37%	63,15%	46,51%	42,85%
<i>Colletotrichum spaethianum</i> 2908	71,05%	68,57%	40,83%	70,0%	36,19%	35,18%
<i>Colletotrichum guaranicola</i> 2939	83,33%	65,33%	55,55%	85,41%	47,61%	56,79%
<i>Corynespora cassiicola</i> 2671	81,06%	80,62%	54,26%	60,91%	25,33%	40,86%
<i>Rhizoctonia</i> sp. 2942	83,33%	52,71%	85,10%	73,33%	48,64%	83,73%
<i>Rhizoctonia</i> sp. 2943	58,53%	54,28%	34,14%	40,74%	42,55%	45,61%
<i>Colletotrichum scovillei</i> 2910	87,77%	78,09%	40,95%	91,48%	37,77%	52,03%

Continuação Figura 20.

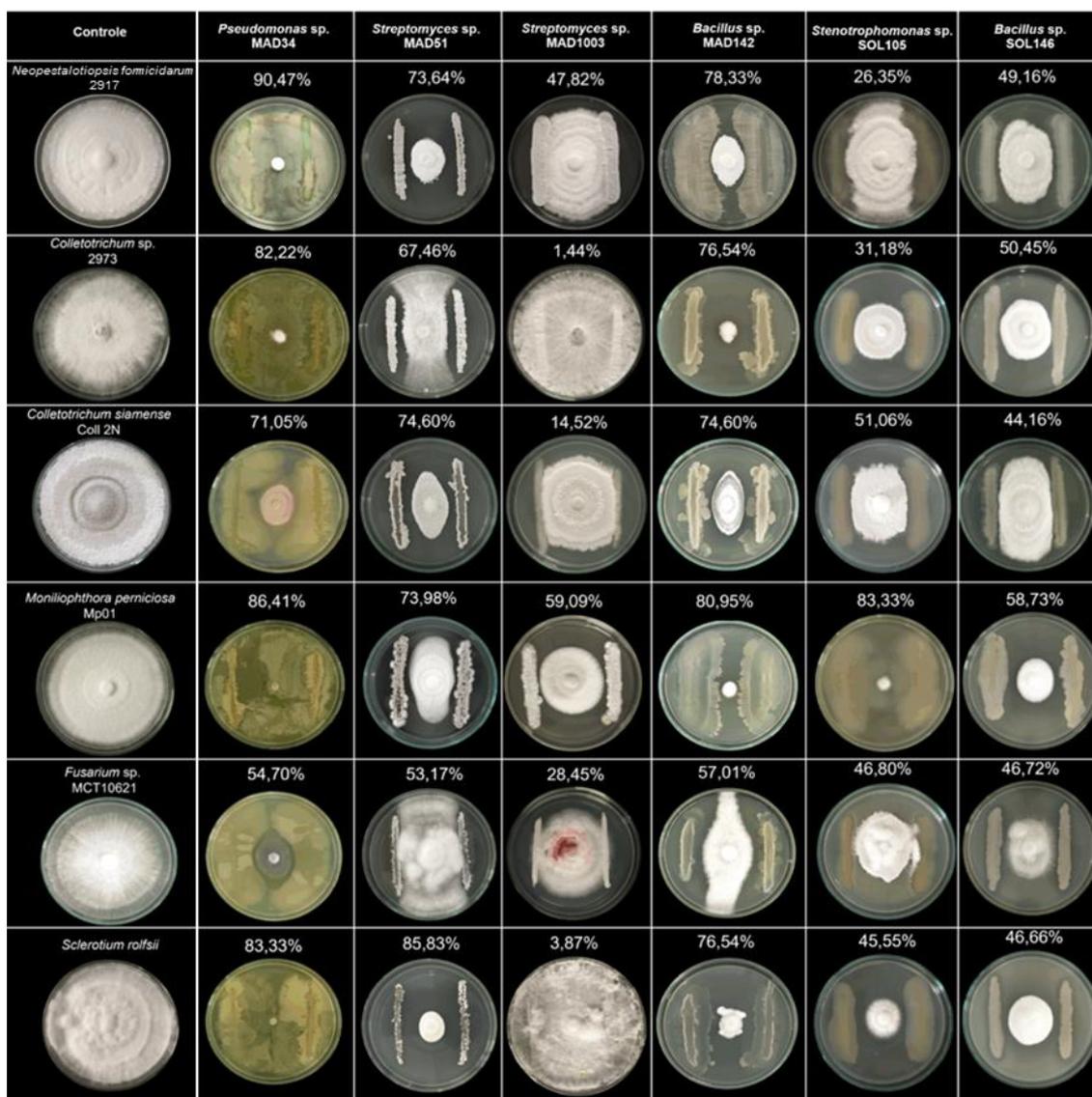


Figura 20: Atividade antagonista de 6 isolados de bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões, contra 13 fitopatógenos, onde a primeira coluna à esquerda indica o controle, utilizando placas com apenas o fitopatógenos, e as colunas da direita mostra o co-cultivo das linhagens pela técnica de cultura dupla.

O isolado *Streptomyces* sp. MAD51 quando avaliado quanto à inibição do crescimento (PIC) superior a 70%, foi o terceiro mais eficiente apresentando valores superiores a 70% para 6 fitopatógenos, sendo capaz de reduzir o crescimento em 80,62% de *Corynespora cassicola* (INPA 2671), 81,30% de *Moniliophthora perniciosa* (MP01) e 85,83% *Sclerotium rolfsii* (2941) (Figura 20). Já *Streptomyces* sp. MAD1003 apresentou índice de inibição do crescimento micelial acima de 50% contra quatro patógeno, tendo melhor resultado para *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942) em 68,14%.

O isolado de *Stenotrophomonas* SOL105 apresentou uma performance na inibição *in vitro* baixa, sendo o melhor resultado diante do agente causal da vassoura-de-bruxa *Moniliophthora perniciosa* (MP01) com porcentagem de 83,33%.

Vale ressaltar que embora para alguns fitopatógenos as linhagens de bactérias avaliadas tenham apresentado índice de inibição *in vitro* tanto elevado, quanto baixo, deve ser levado em consideração, as condições de cultivo testadas são favoráveis aos fitopatógenos, isto indica que a atividade antagonista pode ser potencializada otimizando as condições que favoreçam as bactérias. A atividade antagonista bacteriana nas zonas de inibição é uma atividade que depende principalmente da produção de diversos metabólitos secundários que são produzidos por essas bactérias, afetando o crescimento do patógeno (Anith *et al.*, 2021).

Neste contexto, ensaio de cultura dupla é uma etapa fundamental para a seleção de agentes de biocontrole (BCA), e a seleção desses antagonistas quanto à atividade inibitória contra fitopatógenos é o método direto mais utilizado, pois é fácil de executar, e envolve diferentes mecanismo, como a produção de enzimas e metabólitos secundários que podem interferir no crescimento do patógeno (Raymaekers *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar linhagens promissoras para o desenvolvimento de biocontrole e selecionar aquelas que não apresentam virulência e com maior potencial inibitório para os testes *in vivo*.

5.7 MINERAÇÃO GENÔMICA E PROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

A análise *in silico* do genoma das linhagens *Streptomyces* sp. MAD51, *Streptomyces* sp. MAD1003, *Pseudomonas* sp. MAD34 e *Stenotrophomonas* sp. SOL105 resultou na anotação de diferentes clusters genes biossintéticos (BGCs), que são responsáveis pela biossíntese de diversos metabólitos secundários.

Os dados obtidos no software antiSMASH identificou a presença de diversas classes de metabólitos secundários, conforme apresentado na (Figura 21), em todas as linhagens o maior número de BCGs identificados pertencem à categoria *Others* “outros”. Por outro lado, certos metabólitos como é o caso dos

policetídeo da classe T1, T2 e T3, bem como terpenos estão presentes apenas nas linhagens *Streptomyces* sp. MAD51, *Streptomyces* sp. MAD1003, os peptídeos não ribossômicos (NRPS) e RiPP estão presentes em três das quatro linhagens estudadas (MAD51, MAD1003, MAD34).

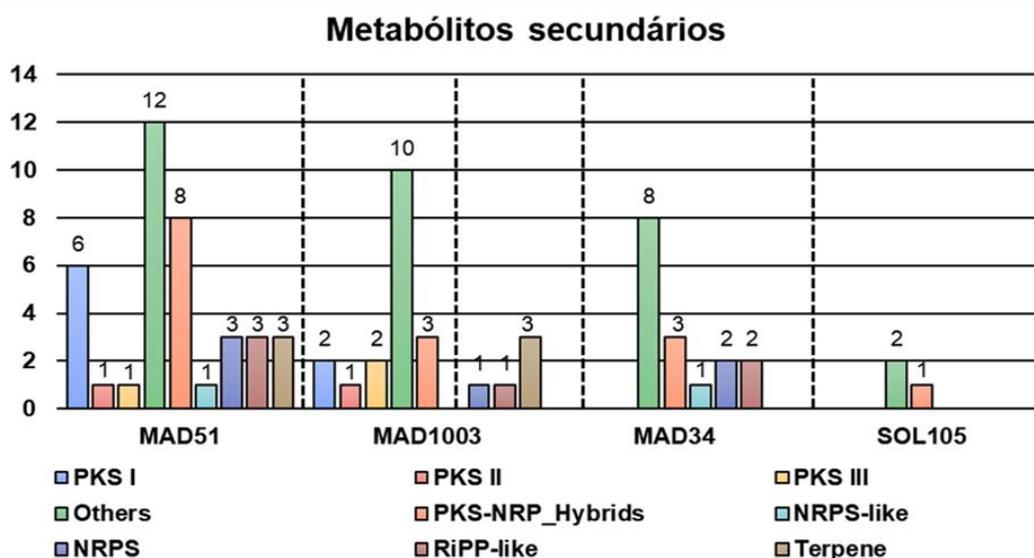


Figura 21: Representação das BGCs das quatro linhagens estudadas, mostrando que as classes mais abundantes são as categorias: *Others*, T2PKS, RiPP-like e Terpeno.

A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* MAD34 apresentou o total de 17 BGCs, sendo 3 três relacionados à biossíntese de NRPS, com 2 BGCs para NRP-metallophore, 2 para RiPPs Likes, 1 para cofator redox, 1 para *hydrogen cyanide*, *phenazina*, *thiopeptide* e *hserlactone* entre outros, (Figura 22).

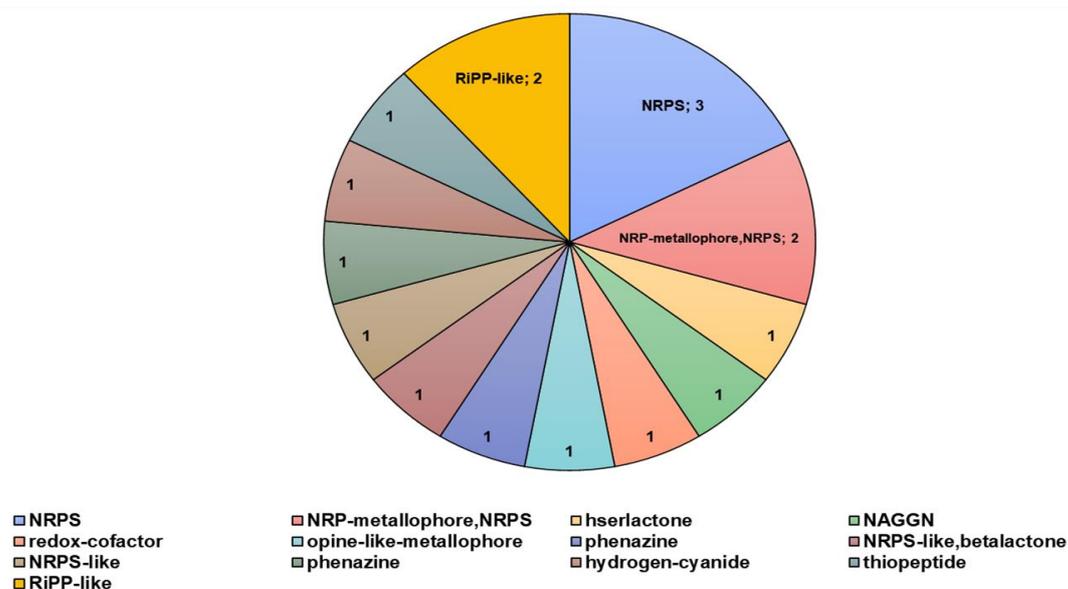


Figura 22: Número e classe de clusters de genes biossintéticos (BGC) relacionados a biossíntese de metabólitos secundários identificados na linhagem *Pseudomonas aeruginosa* MAD34.

Quanto à similaridade dos BGCs de MAD34, seis apresentaram zero similaridade e seis tem similaridade menores que 50%, indicando que estes podem estar relacionados a agrupamentos de clusters de genes “*orphan*”, representando agrupamentos de genes para novos produtos naturais ou são clusters que sintetizam moléculas com via de biossíntese conhecidas ou ainda não foi caracterizada (Gross *et al.*, 2007).

Foram identificados quatro clusters com similaridade de 100% os quais estão relacionados à biossínteses de cinco metabolitos: *L-2-amino-4-metoxi-trans-3-butenóico* (BGC0000287), *azetidomonamida A* e *azetidomonamida B* (BGC0002037) e *pseudopaline* (BGC0002489) e *hydrogen cyanide* (BGC0002345) (Tabela S1).

A análise sintênica do BGC da *região 1.1* da linhagem amazônica MAD34 e da linhagem tipo *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 relativo a síntese de *methoxyvinylglycine* or *l-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid* (AMB) (Figura 23), mostra que a composição gênica entre ambas é similar. Quanto a atividade biológica do AMB, que é um antibiótico da classe das NRP produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, sendo formado por aminoácido não proteinogênico que é tóxico para procariontes e eucariotos (Lee *et al.*, 2010; Murcia *et al.*, 2015).

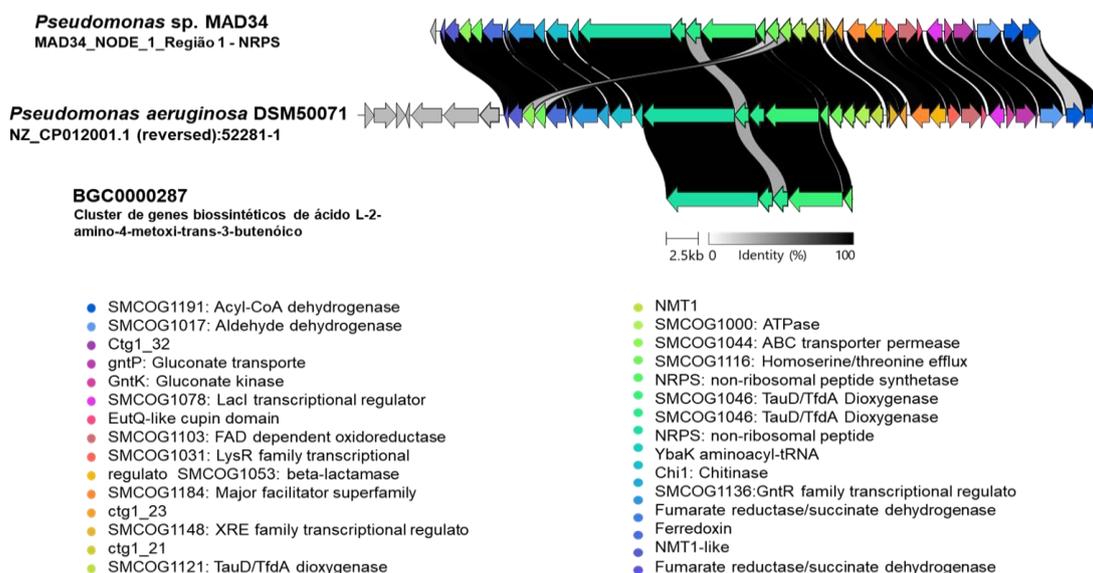


Figura 23: Alinhamento de sintenia do *BGC 1.1* da linhagem MAD34 com os BGCs da linhagem tipo *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 e o BGC já caracterizado do MIBiG (BGC 0000287), mostrando os genes semelhantes para a biossíntese de L-2-amino-4-metoxi-trans-3-butenóico.

O BGC da *região 2.3* da linhagem MAD34 relacionado a biossíntese do metabólito secundário azetidomonamida A / B, encontrado em linhagem de *P. aeruginosa* (Hong *et al.*, 2019). A sintonia revela que genes e os domínios para produção da azetidomonamida A e azetidomonamida B estão presentes em MAD34 (Figura 24). As azetidomonamidas são derivadas de uma via de NRPS conservada e regulada por quorum-sensing. A atividade biológica desta molécula foi deduzida com base em mutantes de *P. aeruginosa* incapazes de produzir azetidomonamidas, os quais tiveram vantagem no crescimento em alta densidade celular *in vitro* e apresentaram rápida virulência no modelo de *Galleria mellonella*, inferindo papéis funcionais das azetidomonamidas na adaptação do hospedeiro (Hong *et al.*, 2019; Ernst *et al.*, 2022).

Segundo Ernst e colaboradores (2022), a expressão dos genes *aze* aumentou fortemente a formação de biofilme e a produção dos fatores de virulência fenazina e alquilquinolona. Outros estudos fisiológicos revelaram que todos os efeitos foram mediados principalmente pela azetidomonamida A e pela diazetidomonapiridona, enquanto as azetidomonamidas B e C tiveram pouco ou nenhum impacto fenotípico. A monooxigenase AzeF P450 que catalisa uma hidroxilação estereosseletiva desafiadora do anel de azetidina convertendo a azetidomonamida C em azetidomonamida A é, portanto, crucial para a atividade biológica.

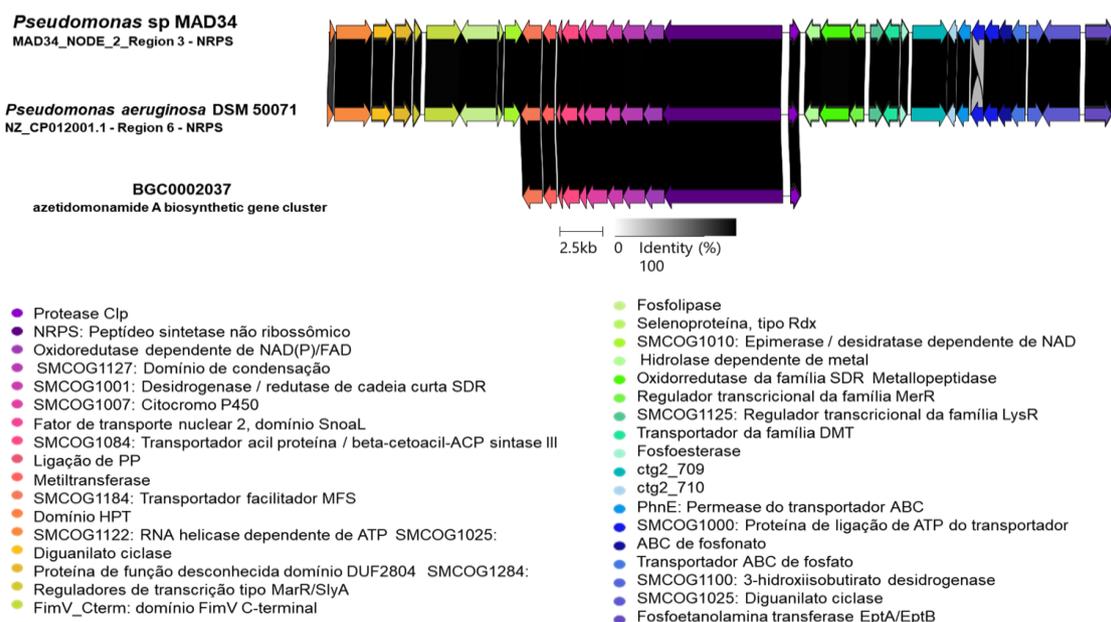


Figura 24: Alinhamento do BGC da região 2.3 da linhagem de *P. aeruginosa* MAD34 com o BGC da linhagem tipo *P. aeruginosa* DSM 50071 e o BGC de azetidomonamida A e azetidomonamida B caracterizado e depositado no MIBiG com o código de entrada BGC0002037.

Também foi identificado um cluster na *região 3.1* para produção de um metalóforo chamado pseudopalina. Sendo uma molécula envolvida no transporte de zinco essencial para sua sobrevivência em ambientes com escassez de metais como (Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn).

Este metabólito está envolvido na virulência desses microrganismos, no entanto a sua via de biossíntese não está totalmente elucidada, contudo a produção deste sideróforo ajuda no desenvolvimento de novos antibióticos (Zhang *et al.*, 2019; Ghssein; Ezzeddine, 2022). A sintenia mostra que a linhagem MAD34 possui em seu genoma todos os genes e domínios necessários para produção desse sideróforo (Figura. 25).

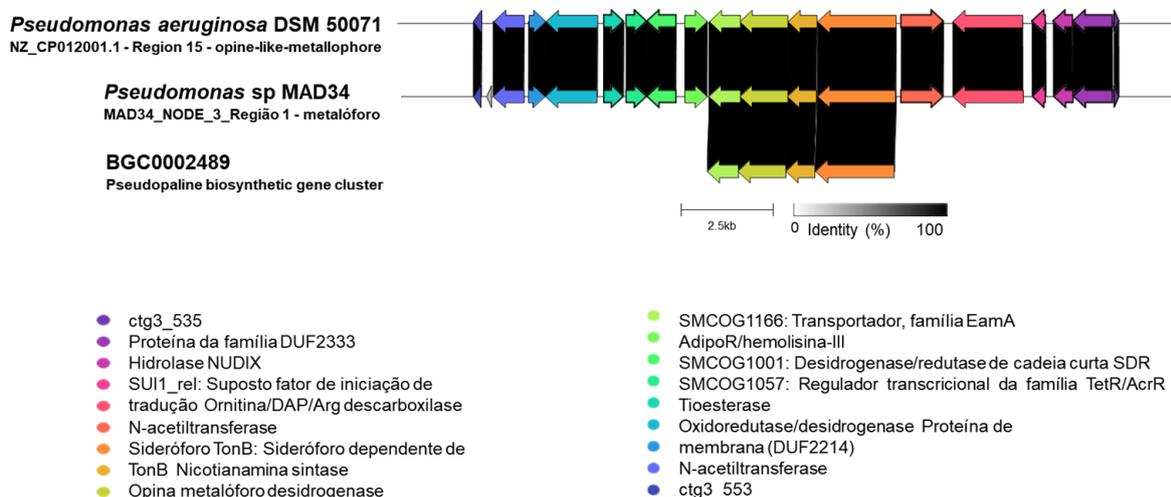


Figura 25: Análise de sintenia da linhagem de *P. aeruginosa* MAD34 na região 3.1, comparado com o BGC da linhagem tipo *P. aeruginosa* DSM 50071 e o cluster da molécula metalóforo chamado pseudopalina (BGC0002489) depositado no MIBiG. Os espaços escuros mostram genes semelhantes presentes nos clusters.

Outro BGC com 100% de similaridade foi identificado na região 11.1 relacionado à síntese do metabólito secundário cianeto de hidrogênio, um agente oxidante muito potente com um efeito antimicrobiano com capacidade de inibir o crescimento de vários fungos patogênicos, este composto sintetizado pelo BGC *hcnABC*, pode interferir na respiração celular ao inibir o citocromo carbono oxidase nas mitocôndrias e desativar diversas metaloproteínas, garantindo que o fungos não desenvolva resistência a outros metabólitos (Pacheco-Moreno *et al.*, 2021; Sehrawat *et al.*, 2022). A sintenia confirma que a linhagem MAD34, possui todos os genes e domínios necessários para biossíntese cianeto de hidrogênio (HCN) (Figura. 26).

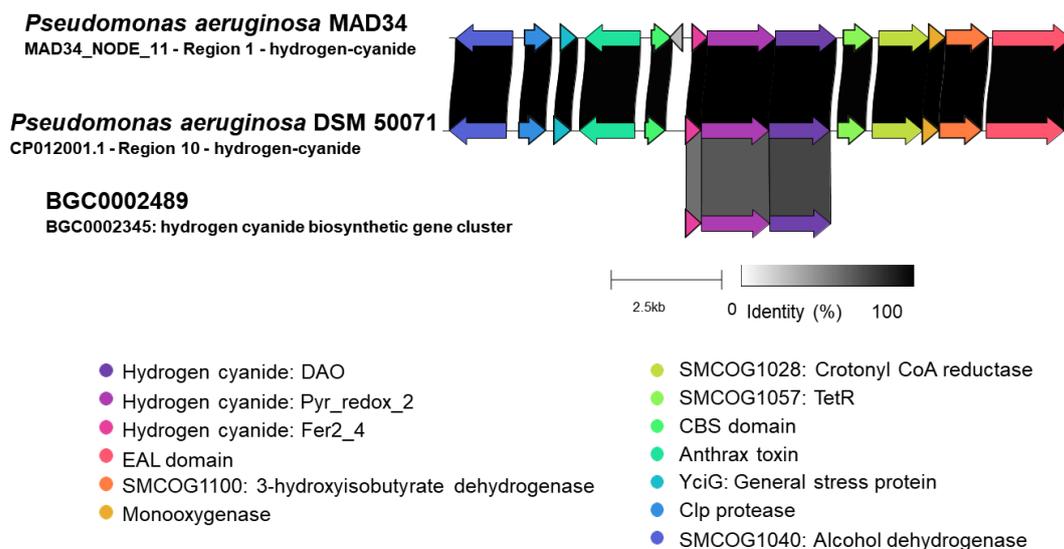


Figura 26: Sintenia do BGC 11.1 da linhagem MAD34, alinhado com o BGC de *P. aeruginosa* DSM 50071 e o BGC do metabólito secundário cianeto de hidrogênio depositado com entrada no MIBiG com código (BGC0002345). Os espaços escuros mostram genes semelhantes presentes nos clusters.

A nova espécie de *Streptomyces* MAD51 apresentou um total de 39 clusters gênicos biossintéticos, sendo 6 relacionado à T1PKS; 3 terpenos; 3 NIsideróforo; 4 peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-tradução (RiPP), 3 peptídeos sintetase não ribossomais (NRPS), 1 NRPS-like, 1 T3 PKS, 1 T2PKS e diferentes híbridos como: 1 PKS-like-T1PK, 1 NRPS-Like-transAT-PKS-like, 1 T1PKS-NRPS, 1 NRPS,phenazine, 1 T1PKS,T2PKS, além BGCs relacionados à biossintese de outros compostos totalizando 39 clusters (Figura 27).

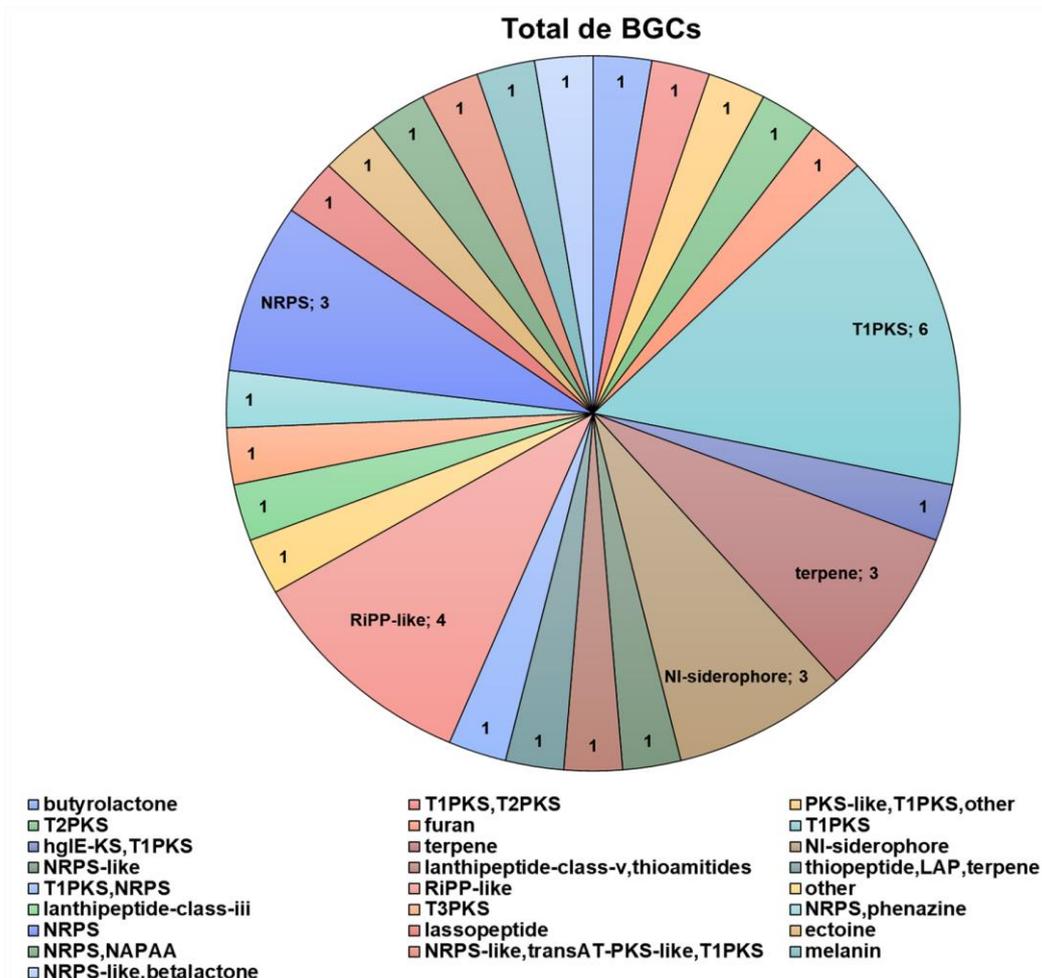


Figura 27: Gráfico dos clusters de genes biossintéticos (BGC) com os metabólitos secundários preditos na linhagem *Streptomyces* sp. MAD51.

Entre os BGCs identificados, somente 10 apresentaram similaridade entre 80% e 100%, com clusters com vias de biossíntese já relatadas na literatura (Tabela S2), como as butirolactona - BGC0000848 na região 1.1, os terpenos (geosmina - BGC0001181) identificados nas regiões 14.1 e os LAP, terpeno, tiopeptideo (hopene - BGC0000663) na região 21.1 (Figura. 28).

As butirolactonas são moléculas importantes para sinalização química, que regulam o desenvolvimento morfológico podendo induzir a produção de metabólitos secundários (Creamer *et al.*, 2021). Também conhecido como fator A (fator autorregulador, 2-isocaprilóil-3R- *hidroximetil* - γ -butirolactona), relatadas em *Streptomyces griseus*, como sendo de grande importância, pois desencadeia a esporulação e a produção do antibiótico como estreptomicina. A análise de sintenia (Figura. 28, A) mostra a presença dos genes *afsA*, responsável por codificar a enzima γ -butirolactona sintase, uma redutase responsável pela

biossíntese do fator A (Creamer *et al.*, 2021). A Sintenia dos clusters das regiões 14.1 (geosmina - BGC0001181) e 21.1 (hopene - BGC0000663) (Figura. 28, B e C), mostrou que a linhagem MAD51 tem todos os genes necessários para biossíntese dos compostos relacionados.

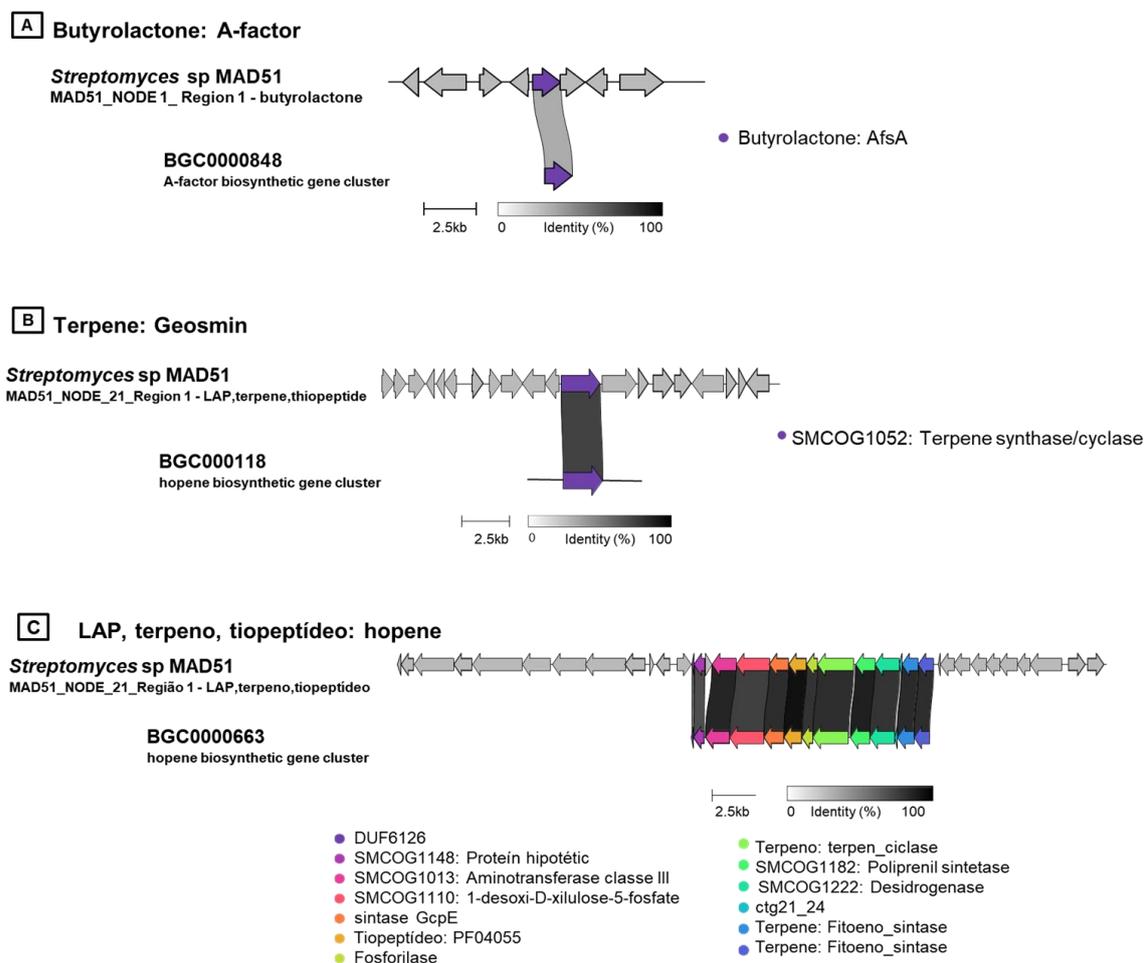


Figura 28: Alinhamento de sintenia do cluster da Linhagem de *Streptomyces* sp MAD51 onde **A**) mostra a região do BGC 1.1 da linhagem de *Streptomyces* sp MAD51 alinhado com o BGC depositado no banco de dados MIBiG (BGC0000848). **B**) mostra a análise de sintenia dos terpenos (geosmina - BGC0001181) identificados nas regiões 14.1. **C**) a Sintenia do clusters (hopene - BGC0000663) do BGC 21.1. Os espaços escuros mostram genes semelhantes.

Foram anotados nas regiões (Region 2.1; Region 6.1 e Region 35.1) três clusters gênicos (BGCs) para biossíntese do híbrido para (T1PKS e T2PKS), e dois diferentes policetídeos (T2PKS, T3PKS) conforme mostrados na (Figura. 29), com similaridade de 83% a 100% (Tabela S2).

O cluster da região 6.1 relacionados à biossíntese do antibiótico policetídeo tetracenomicina C (MIBiG BGC0000275), possui atividade

antitumoral, antibacteriana e antituberculose (Summers *et al.*, 1992; Ortseifen *et al.*, 2017).

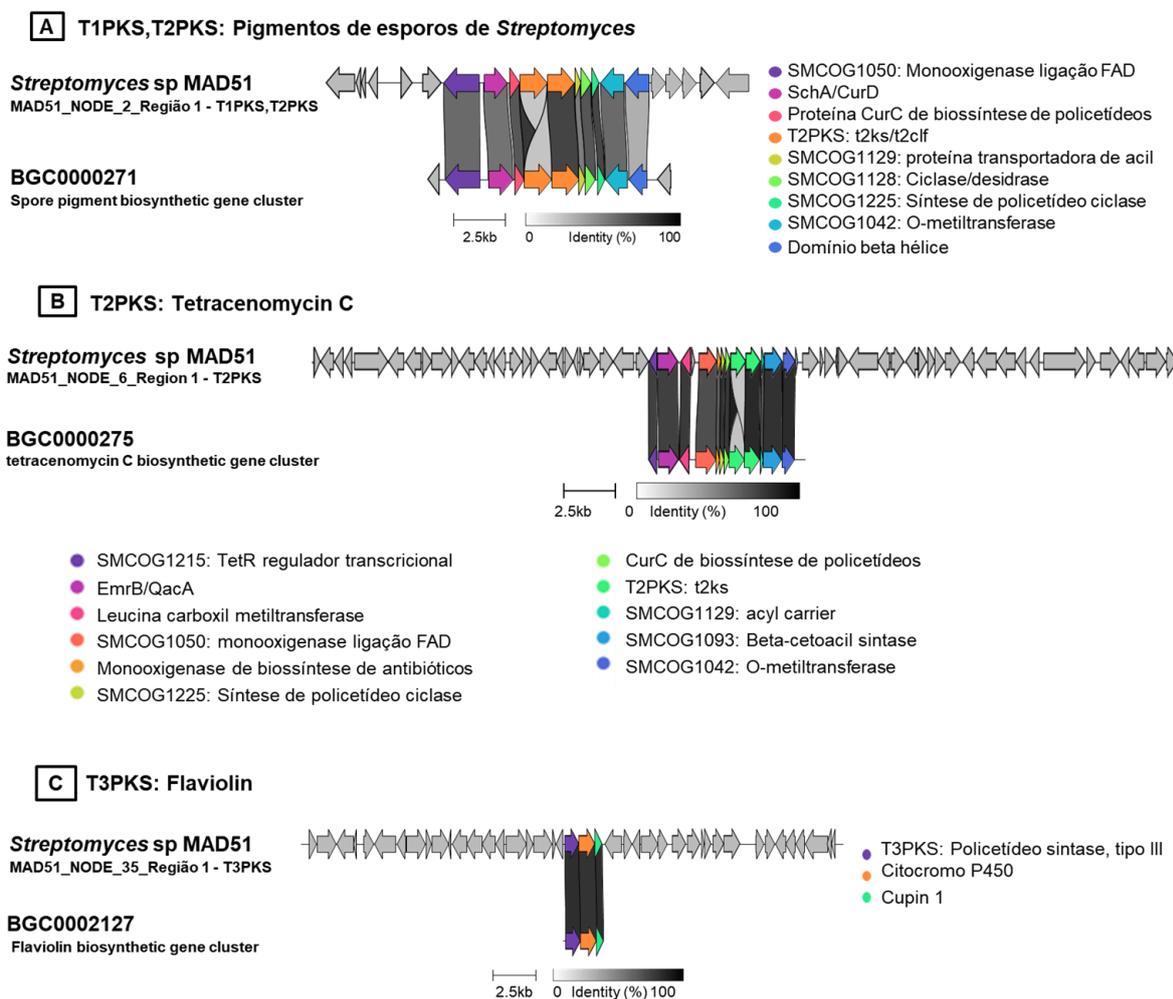


Figura 29: Análise de sintenia dos cluster dos policetídeos presente na linhagem *Streptomyces* sp MAD51. **A)** Mostra o alinhamento da região do BGC 2.1 com o BGC depositado no banco de dados MIBiG para biossíntese de pigmento de esporo (BGC0000271). **B)** Sintenia do cluster da região 6.1 para biossíntese de policetídeos T2PKS com o BGC da via de biossíntese do antibiótico tetracenomicina C com entrada MIBiG BGC0000275 **C)** A Sintenia do clusters da T3PKS flaviolina (BGC0002127) com o BGC da região 35.1. Os espaços escuros mostram genes semelhantes.

A análise de sintenia possibilitou prever que a linhagem MAD51, possui os genes envolvidos na biossíntese dos metabólitos tetracenomicin C e flaviolin (BGC0002127), além de policetídeos aromáticos como o pigmento de esporos identificado na região 2.1 (BGC0000271).

Além dos policetídeos (PKS), foram preditos ainda na linhagem de *Streptomyces* sp MAD51, clusters identificadas nas regiões 20.1; 44.1; 53.1 e 119.1 (Tabela S2). Com genes para biossíntese de outras classes de moléculas como: RiPPs como as tioholgamida A e tioholgamida B (MIBiG BGC0001802),

para N-sideróforo desferroxamine B/desferroxamina E (MIBiG BGC0000940), ectoína (MIBiG-BGC0000853) e melanina (MIBiG BGC0000910). Todas as regiões preditas contêm similaridade de 80 > 100% de homologia. A análise de sintenia dos BGCs conhecidos do banco de dados de referência MIBiG, indica que o isolado MAD51 apresenta todos os genes relacionados à biossíntese desses compostos (Figura. 30).

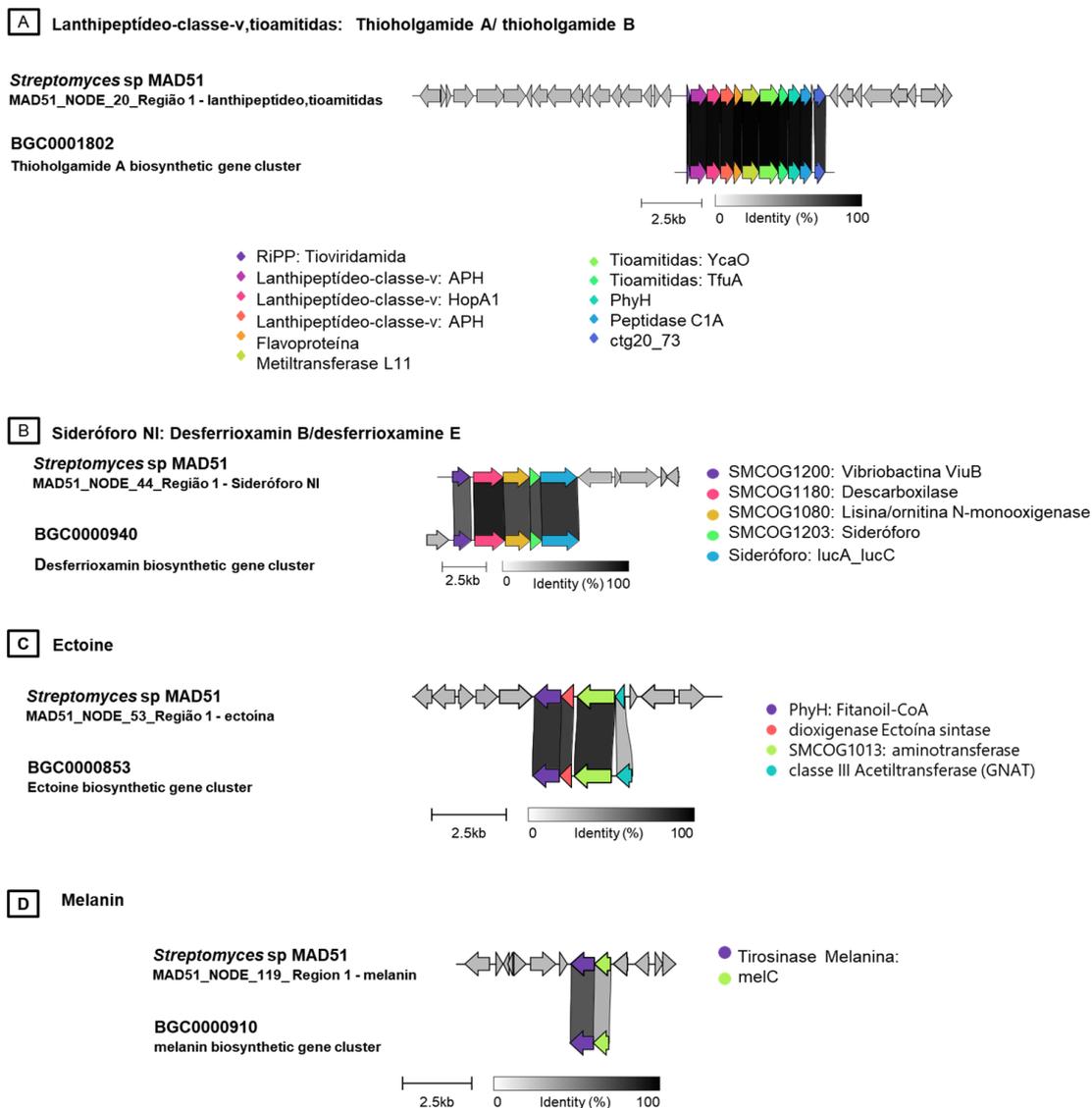


Figura 30: Análise de sintenia dos cluster da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003. **A)** Mostra a região 44.1 do BGC da via de biossíntese para molécula de sideróforo alinhada com o BGC depositado no banco de dados MIBiG para a biossíntese da molécula de desferroxamine B/desferroxamina E (BGC0000940). **B)** Análise de sintenia de ectoína (entrada MIBiG BGC0000853) identificados nas regiões 53.1. **C)** Sintenia do clusters para melanina do BGC 119.1 compara com os dados do BGC do MIBiG - (BGC0002127). Os espaços escuros mostram genes semelhantes.

A análise do genoma da *Streptomyces* sp. MAD1003, resultou na identificação de 24 regiões contendo BGCs para metabólitos secundários, sendo 2 clusters para butirolactona; 2 Policetídeo T1PKS; 3 para Terpeno; 1 Policetídeo T2PKS; 2 Policetídeo T3PKS; 3 para NI-sideróforo; 2 para RiPP-like; 1 para ectoína e 8 outros clusters outras classes de moléculas (Tabela S3 e Figura 31).

Dos BGCs preditos, um cluster apresentou similaridade de 92% para produção do terpeno (*hopene*), seis apresentaram 100% de similaridade com BCGs relacionados a síntese de: *scabichelin* (NRPS), *albaflavenone* (terpeno), *flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene* (T3PKS), *ectoine* (ectonina), *alkylresorcinol* (T3PKS) e geosmin (terpeno), dois apresentaram similaridade de 83% para *desferrioxamin B/desferrioxamine E* (NI-siderophore) e *spore pigment*.

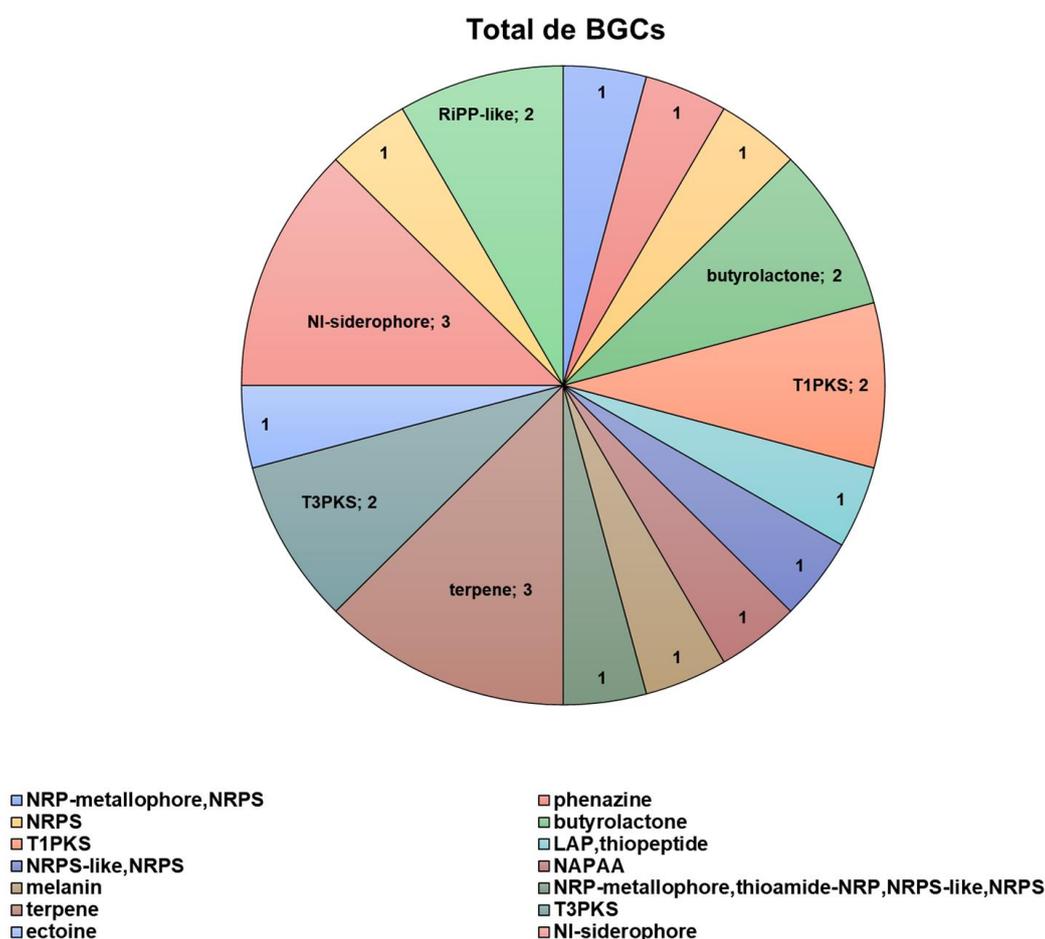


Figura 31: Gráfico com os clusters de genes biossintéticos (BGC) preditos na linhagem *Streptomyces* sp MAD1003.

A *scabichelin* (BGC0000423) e *desferrioxamin B/desferrioxamine E* (BGC0000940), são compostos quelantes de ferro de alta afinidade, que são produzidos por bactérias como as *Streptomyces*, e estão associados a entrega

e absorção de ferro para os microrganismos, podendo atuar como fator determinantes de virulência para patógenos de plantas e animais (Raines *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021).

As ectoínas presente na região 27.1, são moléculas essenciais para a sobrevivência dos diversos micro-organismos, pois possibilita proteção contra o estresse osmótico, e apresenta uma ampla aplicação na biotecnologia, cosméticos e medicina como hidratante em cosméticos e produtos para a pele (Prabhu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2021). A sintonia confirma que o isolado MAD1003 compartilha todos os genes correspondente a biossíntese desses compostos (Figura. 32).

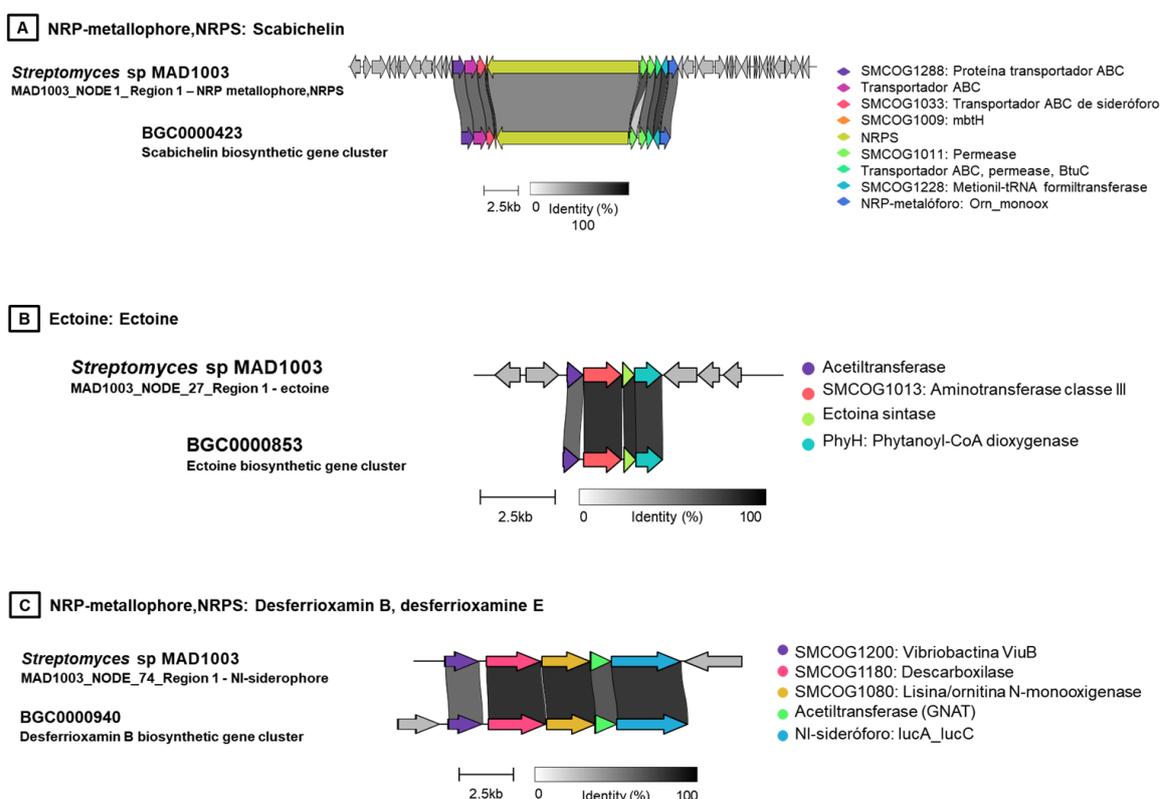


Figura 32: Sintonia dos genes pertencentes ao BGCs caracterizados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003 **A**) Região 1.1 com o BGC escabichelina (BGC0000423) **B**) ectoína (entrada MIBiG BGC0000853) identificados nas regiões 27.1 **C**) Sintonia do clusters região 74.1 desferrioxamina B/E (BGC0000940).

Também foram identificados clusters relacionados a classes de terpenos como: hopene - BGC0000663 (região 17.1), o antibiótico sesquiterpeno albaflavenona - BGC0000660 (região 24.1) e o composto volátil geosmina - BGC0001181 (região 50.1), alguns desses compostos também foram

identificados na predição de clusters gênicos da linhagem MAD51, sendo metabólito secundário produzido por diversas linhagens *Streptomyces* sp. (Figura. 33).

Dos clusters preditos pelo antiSMASH na linhagem *Streptomyces* sp. MAD1003, os terpenos albaflavenona e geosmina são moléculas com atividade antimicrobiana contra alguns micro-organismo como: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, sendo responsáveis pelo forte odor dos estreptomiceto (Jiang *et al.*, 2007; Avalos *et al.*, 2022). Com base na análise de sintenia utilizando dados do MIBiG (Figura. 33) foi possível confirmar a presença de todos os genes para as respectivas rotas biossintéticas, indicando que MAD 1003 é geneticamente capaz de produzir os compostos mencionados (Yamada *et al.*, 2015; Rehan *et al.*, 2023).

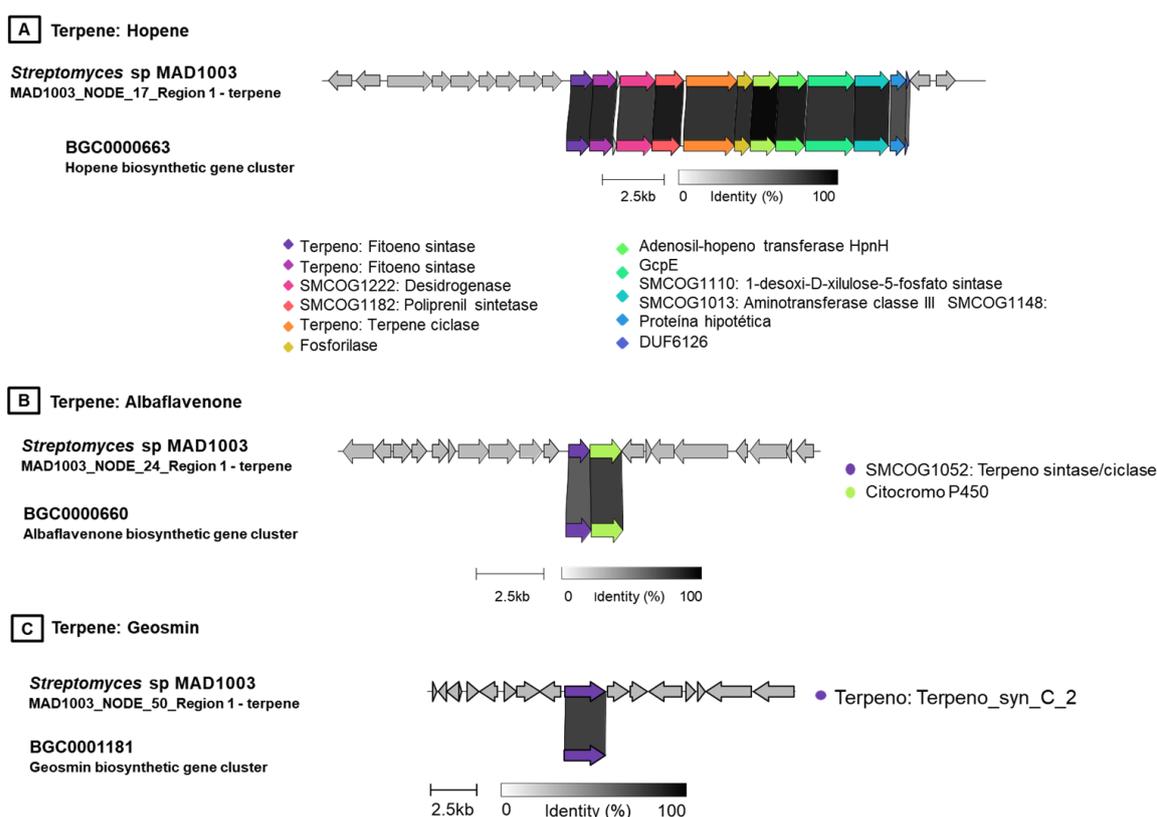


Figura 33: Sintenia dos genes pertencentes dos BGCs das classes dos terpenos caracterizados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003. **A**) hopene - BGC0000663 (região 17.1 92% de similaridade) **B**) albaflavenona - BGC0000660 região 24.1 100% de similaridade. **C**) e geosmina - BGC0001181 região 50.1, com 100% de similaridade.

Além dos clusters preditos para biossíntese dos terpenos, policetídeo (T2PKS e T3PKS) a exemplo da flaviolina (MIBiG: BGC0002127), alquilresorcinol (BGC0000282) e pigmento de esporos (BGC0000271) com 83%

de similaridade, sendo metabólitos secundários comuns no gênero *Streptomyces* (Figura. 34). Vale destacar que alguns pigmentos de origem bacteriana podem ser úteis no diagnóstico de diversos tipos de câncer, diabetes mellitus, leucemia, podendo apresentar atividade antimicrobiana e outras atividades biológicas (Kazi *et al.*, 2022).

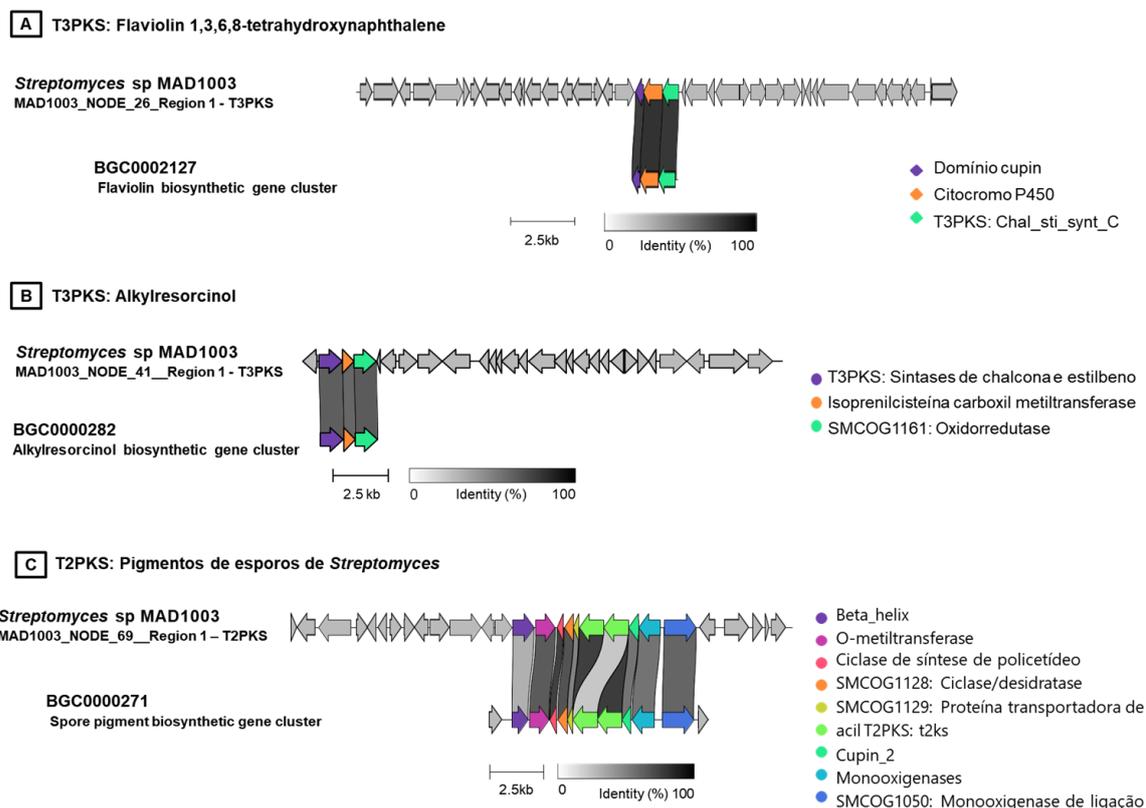


Figura 34: Sintenia dos genes pertencentes dos BGCs das classes dos policetídeos T2PKS e T3PKS caracterizados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp MAD1003. **A)** flaviolina (Número de acesso MIBiG:BGC0002127) **B)** alquilresorcinol (BGC0000282); **C)** e pigmento de esporos (BGC0000271).

Na linhagem de *Stenotrophomonas* sp. SOL105 somente 4 (quatro) BGCs foram identificados sendo 1 clusters para biossíntese de RiPP-Like; 1 para Lasso-peptídeo; 1 para NRP-metalóforo e 1 para Aripolieno (Figura 35 e Tabela S3). Dos BGCs descritos, apenas dois apresentaram similaridade de 40% e 57%.

Na região 6.1 foi identificado o BGC com 40% de similaridade com BGC da classe do *arylpolyene* (MIBiG código BGC0000837), relacionado a molécula denominada de APE Vf, que são ácidos carboxílicos poliinsaturados, presentes em diversas bactérias Gram-negativas associadas ao hospedeiro, como patógenos de humanos, animais e plantas, como as *Burkholderia cenocepacia*,

esse grupo de moléculas podem estar associada a formação de biofilmes e aumento da proteção contra o estresse oxidativo (Johnston *et al.*, 2021).

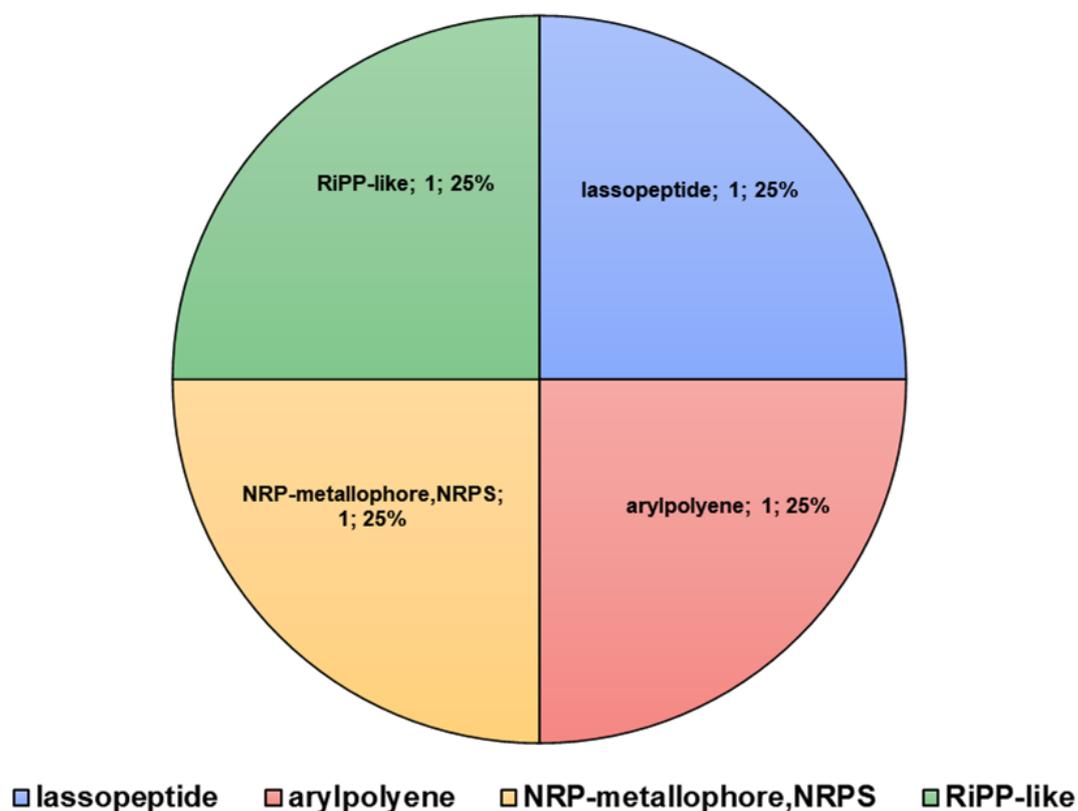


Figura 35: Gráfico dos BGCs preditos na linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105, mostrando o total das classes de moléculas preditos com base em genoma.

Johnston *et al.* (2021), relata em seu estudo que esse grupo de APE possui duas proteínas transportadoras de acil (ACPs), duas 3-hidroxiacil-ACP desidratases (Apel e P) e três 3-cetoacil-ACP sintases. Por meio de análise de sintenia, foi possível identificar essas proteínas, no cluster da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105 e comparação com BGCs depositados no MIBIG combinada com ferramentas como BLAST e InterPro foi possível identificar os mesmos genes e domínios protéicos correspondente a via APE (Figura 36).

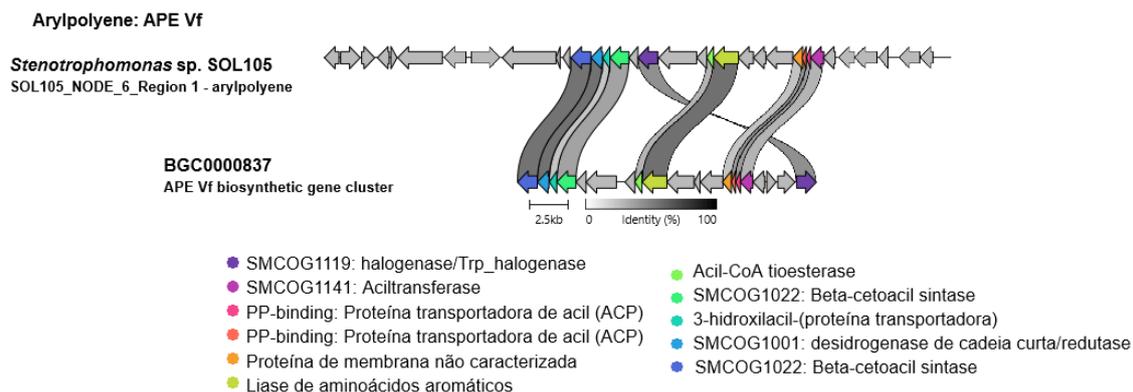


Figura 36: Sintenia do Cluster gênico biossintético para produção de ácidos carboxílicos APE Vf, as cores representam os genes presentes no genoma da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105 na parte superior, com o BGC depositado no MIBiG.

O BGC anotado da região 29.1 apresentar 57% de similaridade com o BGC descrito como responsável pela biossíntese de 2,3-dihidroxi benzoilserina, um sideróforo produzido por *Stenotrophomonas maltophilia K279a*. Alinhando o BGCs da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105, como o que está depositado no banco de dados, foi possível notar, todos os elementos presentes no genoma para produção da molécula (Figura 37).

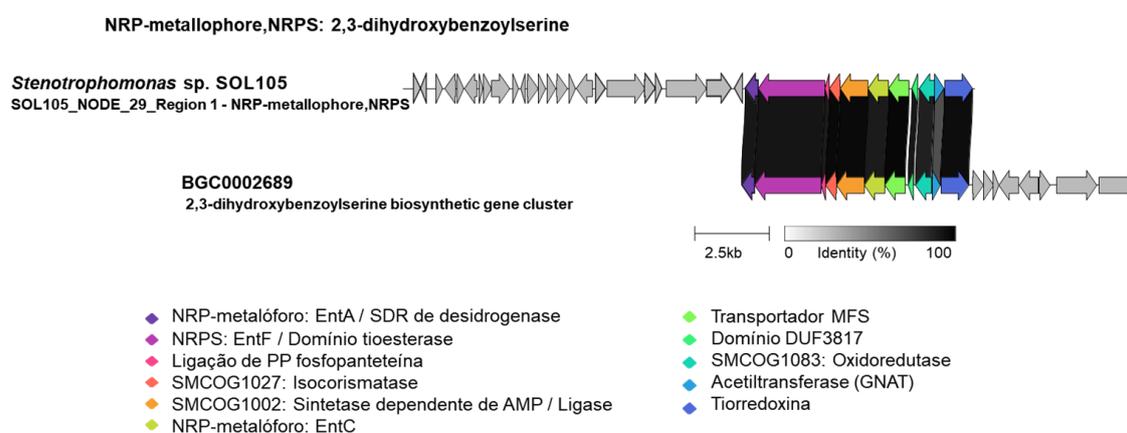


Figura 37: Sintenia do Cluster gênico biossintético para produção do siderofo 2,3-dihidroxi benzoilserina, as cores representam os genes presentes no genoma da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105 na parte superior, com o BGC depositado no MIBiG. Os espaços escuros mostram genes semelhantes.

Assim como na linhagem MAD34 a linhagem SOL105 apresentou clusters com similaridade zero, isso indica que os agrupamentos de genes que podem ser considerados “orphan” estão presentes, podendo estar relacionados com genes para novos produtos natural ou são clusters ainda não caracterizados.

6 CONCLUSÕES

Foram obtidos os genomas completos de 4 dos 6 dos isolados avaliados neste estudo. A análise filogenômica permitiu identificar a linhagem MAD34 como *Pseudomonas aeruginosa* (dDDH de 95.1%), além de três possíveis novas espécies: *Streptomyces* MAD51 (dDDH de 54.9%), *Streptomyces* MAD1003 (dDDH de 68.1%) e *Stenotrophomonas* SOL105 (dDDH de 46.4%).

Por meio da anotação do genoma, foi possível detectar genes envolvidos na via de biossíntese para produção do fitormônio auxina, com 4 genes presente nas linhagens *Pseudomonas aeruginosa* MAD34 e *Stenotrophomonas* SOL105, e não foram identificados genes para giberelina e citocina.

As linhagens mostraram capacidade para produção de diferentes enzimas (Lipase, amilase e celulase e protease) além da capacidade para solubilizar fosfato de $AlPO_4$.

A avaliação antagonista contra 13 fitopatógenos revelou que as linhagens *Streptomyces* MAD51, *Streptomyces* MAD1003 apresentam potencial antagonista, com índice de inibição acima de 50% para todos os patógenos avaliados.

A mineração genômica indicou potencial para produção de diversos metabólitos já descritos, como assim como BGCs com potencial para biossíntese de novas moléculas.

Foi possível notar a presença de BGCs já caracterizados para biossíntese de diversos metabólitos da classe dos policetídeos como: tetracenomicina C, pigmento de esporo, flaviolina, sideróforos como desferrioxamin B e Peptídeos não ribossomais (NRPs) com potencial para uso na agricultura e biotecnologia.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, Shadia M.; ELSOUD, Mostafa M. Abo; ANISE, Amany A.H.. Microbial Biosynthesis: a repertory of vital natural products. **Food Biosynthesis**, [S.L.], p. 25-54, 2017. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811372-1.00003-8>.

ALBARANO, Luisa; ESPOSITO, Roberta; RUOCCO, Nadia; COSTANTINI, Maria. Genome Mining as New Challenge in Natural Products Discovery. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 199, 9 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md18040199>.

ALAM, Khorshed; MAZUMDER, Arpita; SIKDAR, Suranjana; ZHAO, Yi-Ming; HAO, Jinfang; SONG, Chaoyi; WANG, Yanyan; SARKAR, Rajib; ISLAM, Saiful; ZHANG, Youming. Streptomyces: the biofactory of secondary metabolites. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, p. 1-21, 29 set. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>.

A KAUTSAR, Satria; BLIN, Kai; SHAW, Simon; NAVARRO-MUÑOZ, Jorge C; TERLOUW, Barbara R; VANDER HOOFT, Justin J J; A VAN SANTEN, Jeffrey; TRACANNA, Vittorio; SUAREZ DURAN, Hernando G; PASCAL ANDREU, Victòria. MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 48, p. 454-458, 15 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz882>.

ANDRIĆ, Sofija; MEYER, Thibault; ONGENA, Marc. *Bacillus* Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-9, 23 jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>.

ANITH, K.N.; NYSANTH, N.s.; NATARAJAN, C. Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 229-236, 14 maio 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13495>.

AVALOS, Mariana; GARBEVA, Paolina; VADER, Lisa; VAN WEZEL, Gilles P; DICKSCHAT, Jeroen S; ULANOVA, Dana. Biosynthesis, evolution and ecology of microbial terpenoids. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 249-272, 2022. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1np00047k>.

AZIZ, Ramy K; BARTELS, Daniela; A BEST, Aaron; DEJONGH, Matthew; DISZ, Terrence; A EDWARDS, Robert; FORMSMA, Kevin; GERDES, Svetlana; GLASS, Elizabeth M; KUBAL, Michael. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 9, p. 1-75, 8 fev. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.

AZUMI, Miwa; OGAWA, Ken-Ichi; FUJITA, Tsuyoshi; TAKESHITA, Michinori; YOSHIDA, Ryuji; FURUMAI, Tamotsu; IGARASHI, Yasuhiro. Bacilosarcins A and B, novel bioactive isocoumarins with unusual heterocyclic cores from the

marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 64, n. 27, p. 6420-6425, jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2008.04.076>.

BACHMANN, Brian O; VAN LANEN, Steven G; BALTZ, Richard H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 175-184, 1 fev. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-013-1389-9>.

BATISTA, Bruna Durante; LACAVA, Paulo Teixeira; FERRARI, Andrea; TEIXEIRA-SILVA, Natalia Sousa; BONATELLI, Maria Letícia; TSUI, Sarina; MONDIN, Mateus; KITAJIMA, Elliot Watanabe; PEREIRA, José Odair; AZEVEDO, João Lúcio. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 206, p. 33-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.

BAUMAN, Katherine D.; BUTLER, Keelie S.; MOORE, Bradley S.; CHEKAN, Jonathan R. Genome mining methods to discover bioactive natural products. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 2100-2129, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1np00032b>.

BOLÍVAR-ANILLO, Hernando José; GARRIDO, Carlos; COLLADO, Isidro G.. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 721-740, 15 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-019-09603-5>.

BERINI, Francesca; KATZ, Chen; GRUZDEV, Nady; CASARTELLI, Morena; TETTAMANTI, Gianluca; MARINELLI, Flavia. Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 818-838, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.002>.

BLIN, Kai; SHAW, Simon; KLOOSTERMAN, Alexander M; CHARLOP-POWERS, Zach; VANWEZEL, Gilles P; MEDEMA, Marnix H; WEBER, Tilmann. AntiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 29-35, 12 maio 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab335>.

BORUTA, Tomasz. A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 1-15, 7 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-021-03141-z>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CHANDRA, Prem; ENESPA, SINGH, Ranjan; ARORA, Pankaj Kumar. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 169, 26 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.

CHAMBERS, Matthew C; MACLEAN, Brendan; BURKE, Robert; AMODEI, Dario; RUDERMAN, Daniel L; NEUMANN, Steffen; GATTO, Laurent; FISCHER, Bernd; PRATT, Brian; EGERTSON, Jarrett. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 918-920, out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2377>.

CAO, Yu; PI, Hualiang; CHANDRANGSU, Pete; LI, Yongtao; WANG, Yuqi; ZHOU, Han; XIONG, Hanqin; HELMANN, John D.; CAI, Yanfei. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-14, 12 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>.

CAVALCANTI, Fábio Rossi; RESENDE, Mário Lúcio Vilela de; PEREIRA, Ricardo Borges; COSTA, João de Cássia do Bonfim; CARVALHO, Cristina Paiva da Silveira. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 41, n. 12, p. 1721-1730, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2006001200006>.

COLOMBO, Elena Maria; KUNOVA, Andrea; CORTESI, Paolo; SARACCHI, Marco; PASQUALI, Matias. Critical Assessment of *Streptomyces* spp. Able to Control Toxigenic *Fusaria* in Cereals: a literature and patent review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 24, p. 6119, 4 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246119>.

CREAMER, Kaitlin E.; KUDO, Yuta; MOORE, Bradley S.; JENSEN, Paul R.. Phylogenetic analysis of the salinipostin γ -butyrolactone gene cluster uncovers new potential for bacterial signalling-molecule diversity. **Microbial Genomics**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 1-14, 12 maio 2021. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000568>.

DIMKIĆ, Ivica; JANAKIEV, Tamara; PETROVIĆ, Marija; DEGRASSI, Giuliano; FIRA, Djordje. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 117, p. 101754, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>.

DONALD, Lavinia; PIPITE, Atanas; SUBRAMANI, Ramesh; OWEN, Jeremy; KEYZERS, Robert A.; TAUFU, Taitusi. *Streptomyces*: still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. **Microbiology Research**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 418-465, 1 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microbiolres13030031>.

DUNLAP, Christopher. Phylogeny and Taxonomy of Agriculturally Important *Bacillus* Species. **Bacilli In Climate Resilient Agriculture And**

Bioprospecting, [S.L.], p. 143-150, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_8.

ERNST, Simon; VOLKOV, Alexander N.; STARK, Melina; HÖLSCHER, Lea; STEINERT, Katharina; FETZNER, Susanne; HENNECKE, Ulrich; DREES, Steffen Lorenz. Azetidomonamide and Diazetidomonapyridone Metabolites Control Biofilm Formation and Pigment Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 144, n. 17, p. 7676-7685, 22 abr. 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.1c13653>.

FENG, Shun; TANG, Shicai; JIAN, Yongfei; HUANG, Xiaoqing; JIN, Liang; ZHU, Zhenglin; DONG, Pan; LI, Zhengguo. Complete Genome Sequence Data of a Novel *Streptomyces* sp. Strain A2-16, a Potential Biological Control Agent for Potato Late Blight. **Plant Disease**, [S.L.], v. 106, n. 2, p. 723-726, 1 fev. 2022. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-04-21-0858-a>.

FLÄRDH, Klas; BUTTNER, Mark J.. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 36-49, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1968>.

FIRA, Djordje; DIMKIĆ, Ivica; BERIĆ, Tanja; LOZO, Jelena; STANKOVIĆ, Slaviša. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 285, p. 44-55, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>.

GHANEM, Gamal A. M.; GEBILY, Doha A. S.; RAGAB, Mona M.; ALI, Ayat M.; SOLIMAN, Nour El-Deen K.; EL-MOITY, Tawfik H. Abd. Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against different plant pathogenic fungi. **Egyptian Journal Of Biological Pest Control**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 1-13, 28 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41938-022-00612-9>.

GHAZY, Nasr; EL-NAHRAWY, Sahar. Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 203, n. 3, p. 1195-1209, 24 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-02113-5>.

GHSSEIN, Ghassan; EZZEDDINE, Zeinab. A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. **Biology**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1711, 25 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology11121711>.

GILCHRIST, Cameron L M; CHOOI, Yit-Heng. Clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 37, n. 16, p. 2473-2475, 18 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>.

GORDON, Solon A.; WEBER, Robert P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.

GOPINATH, Subash C. B.; ANBU, Periasamy; ARSHAD, M. K. Md; LAKSHMIPRIYA, Thangavel; VOON, Chun Hong; HASHIM, Uda; CHINNI, Suresh V.. Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2017, p. 1-9, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1272193>.

GONZÁLEZ, Valentina; VARGAS-STRAUBE, María José; BEYS-DA-SILVA, Walter O.; SANTI, Lucélia; VALENCIA, Pedro; BELTRAMETTI, Fabrizio; CÁMARA, Beatriz. Enzyme Bioprospection of Marine-Derived Actinobacteria from the Chilean Coast and New Insight in the Mechanism of Keratin Degradation in *Streptomyces* sp. G11C. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 537, 28 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md18110537>.

GOULART, A., 2019. Severidade quantificada: escala de notas *Rhizoctonia solani* em algodão, feijão e soja. **Revista cultivar**, jan 2019, no 236, p.26-30.

GROSS, Harald. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 75, n. 2, p. 267-277, 6 mar. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0900-5>.

GUPTA, Rani; GIGRAS, Paresh; MOHAPATRA, Harapriya; GOSWAMI, Vineet Kumar; CHAUHAN, Bhavna. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 38, n. 11, p. 1599-1616, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00053-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00053-0).

GUPTA, Radhey S.; PATEL, Sudip; SAINI, Navneet; CHEN, Shu. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the subtilis and cereus clades of species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 1 nov. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.

HONG, Zhilai; BOLARD, Arnaud; GIRAUD, Caroline; PRÉVOST, Sébastien; GENTA-JOUE, Grégory; DEREGNAUCOURT, Christiane; HÄUSSLER, Susanne; JEANNOT, Katy; LI, Yanyan. Azetidine-Containing Alkaloids Produced by a Quorum-Sensing Regulated Nonribosomal Peptide Synthetase Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 58, n. 10, p. 3178-3182, 14 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201809981>.

HORAK, I.; ENGELBRECHT, G.; RENSBURG, P.J. Jansen; CLAASSENS, S.. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing bacillus species as bionematicides. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 127, n. 2, p. 326-343, 23 maio 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14218>.

HU, Siren; LI, Kaiqin; ZHANG, Yifei; WANG, Yinfeng; FU, Li; XIAO, Yan; TANG, Xinke; GAO, Jian. New Insights Into the Threshold Values of Multi-Locus Sequence Analysis, Average Nucleotide Identity and Digital DNA–DNA

Hybridization in Delineating *Streptomyces* Species. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, p. 1-10, 31 maio de 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.910277>.

LALUCAT, Jorge; MULET, Magdalena; GOMILA, Margarita; GARCÍA-VALDÉS, Elena. Genomics in Bacterial Taxonomy: impact on the genus pseudomonas. **Genes**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 139, 29 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11020139>.

LE, Khanh Duy; YU, Nan Hee; PARK, Ae Ran; PARK, Ding-Jin; KIM, Chang-Jin; KIM, Jin-Cheol. *Streptomyces* sp. AN090126 as a Biocontrol Agent Against Bacterial and Fungal Plant Diseases. **Microorganisms**, [S.L.], v.10,n. 4, p. 791, 8 abri. 2022.MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10040791>.

LEE, Xiaoyun; FOX, Áine; SUFRIN, Janice; HENRY, Hugues; MAJCHERCZYK, Paul; HAAS, Dieter; REIMMANN, Cornelia. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster for the *Pseudomonas aeruginosa* Antimetabolite I -2-Amino-4-Methoxy- trans -3-Butenoic Acid. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 192, n. 16, p. 4251-4255, 15 ago. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00492-10>.

LEE, Imchang; KIM, Yeong Ouk; PARK, Sang-Cheol; CHUN, Jongsik. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 1100-1103, 1 fev. 2016. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>.

LEE, Namil; HWANG, Soonkyu; KIM, Jihun; CHO, Suhjung; PALSSON, Bernhard; CHO, Byung-Kwan. Mini review: genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in streptomyces. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], V.v. 18, p. 1548-1556, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.024>.

LI, Yan; HÉLOIR, Marie-Claire; ZHANG, Xun; GEISSLER, Mareen; TROUVELOT, Sophie; JACQUENS, Lucile; HENKEL, Marius; SU, Xin; FANG, Xuewen; WANG, Qi. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 1037-1050, 18 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12809>.

LIU, Guo-Hong; LIU, Bo; LIU, Qin-Ying; WANG, Jie-Ping; CHE, Jian-Mei; ZHANG, Hai-Feng; LAN, Jiang-Lin; SENGONCA, Cetin. *Bacillus xiapuensis* sp. nov., isolated from marine sediment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 69, n. 6, p. 1714-1719, 1 jun. 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003381>.

LIU, Jingyu; NOTHIAS, Louis-Félix; DORRESTEIN, Pieter C.; TAHLAN, Kapil; BIGNELL, Dawn R. D.. Genomic and Metabolomic Analysis of the Potato Common Scab Pathogen *Streptomyces scabiei*. **Acs Omega**, [S.L.], v. 6, n. 17, p. 11474-11487, 20 abr. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.1c00526>.

LIU, Mengshuang; LIU, Hui; SHI, Meng; JIANG, Mingyue; LI, Lingling; ZHENG, Yanning. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-11, 26 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, Sérgio Florentino. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa phytopathologica**, v. 25, n. 3, p. 244-249, 1999.

JIANG, Jiaoyang *et al.* Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 3, n. 11, p. 711-715, 16 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.29>.

JOHNSTON, Isabel; OSBORN, Lucas J.; MARKLEY, Rachel L.; MCMANUS, Elizabeth A.; KADAM, Anagha; SCHULTZ, Karlee B.; NAGAJOTHI, Nagashreyaa; AHERN, Philip P.; BROWN, J. Mark; CLAESEN, Jan. Identification of essential genes for *Escherichia coli* aryl polyene biosynthesis and function in biofilm formation. **Npj Biofilms And Microbiomes**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-10, 2 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41522-021-00226-3>.

KANEKO, Miyuki; ITOH, Hironori; UEGUCHI-TANAKA, Miyako; ASHIKARI, Motoyuki; MATSUOKA, Makoto. The α -Amylase Induction in Endosperm during Rice Seed Germination Is Caused by Gibberellin Synthesized in Epithelium. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 128, n. 4, p. 1264-1270, 1 abr. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010785>.

KASPAR, Felix; NEUBAUER, Peter; GIMPEL, Matthias. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 82, n. 7, p. 2038-2053, 9 jul. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>.

KAZI, Zareenkousar; HUNGUND, Basavaraj S.; YARADODDI, Jayachandra S.; BANAPURMATH, N. R.; YUSUF, Abdulfatah Abdu; KISHORE, Karedla Lakshmi; SOUDAGAR, Manzoore Elahi M.; KHAN, T. M. Yunus; ELFASAKHANY, Ashraf; BUYONDO, Kasumba Andrew. Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Pigment from *Streptomyces* Species. **Journal Of Nanomaterials**, [S.L.], v. 2022, p. 1-8, 25 maio 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/3962301>.

KENASA, Girmaye; NANDESHWAR, B.C.; ASSEFA, Fasil. In vitro Inorganic Phosphate Solubilization Tests of Cowpea Root Nodule Bacteria from Ethiopia. **Agricultural Science Digest - A Research Journal**, [S.L.], v. 41, p. 195-198, 27 out. 2020. Agricultural Research Communication Center. <http://dx.doi.org/10.18805/ag.d-260>.

KENSHOLE, Emma; HERISSE, Marion; MICHAEL, Michael; PIDOT, Sacha J.. Natural product discovery through microbial genome mining. **Current Opinion In Chemical Biology**, [S.L.], v. 60, p. 47-54, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.07.010>.

KHAN, Noor; MAYMON, Maskit; HIRSCH, Ann. Combating Fusarium Infection Using Bacillus-Based Antimicrobials. **Microorganisms**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 75, 22 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms5040075>.

KIM, Pyoung Il; RYU, Jaewon; KIM, Young Hwan; CHI, Youn-Tae. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 138-145, 28 jan. 2010. Journal of Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>.

KONG, Wei-Liang; LI, Pu-Sheng; WU, Xiao-Qin; WU, Tian-Yu; SUN, Xiao-Rui. Forest Tree Associated Bacterial Diffusible and Volatile Organic Compounds against Various Phytopathogenic Fungi. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 590, 18 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8040590>.

KOMAKI, Hisayuki. Reclassification of *Streptomyces costaricanus* and *Streptomyces phaeogriseichromatogenes* as later heterotypic synonyms of *Streptomyces murinus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 004638, 2021.

KORANY, Shereen M.; MANSOUR, Amany N.; EL-HENDAWY, Hoda H.; KOBISI, Abdel Naser A.; ALY, Hamdy H.. Entomopathogenic efficacy of the chitinolytic bacteria: *aeromonas hydrophila* isolated from siwa oasis, egypt. **Egyptian Journal Of Biological Pest Control**, [S.L.], v. 29, p. 1-10, 22 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s41938-019-0116-x>.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P; AUCH, Alexander F; KLENK, Hans-Peter; GÖKER, Markus. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 14, p. 1-14, 21 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; KLENK, Hans-Peter; GÖKER, Markus. Taxonomic use of DNA G+ C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_2, p. 352-356, 2014.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; GÖKER, Markus. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 12182-2019, 16 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P; CARBASSE, Joaquim Sardà; PEINADO-OLARTE, Rosa L; GÖKER, Markus. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 50, n. D1, p. D801-D807, 11 out. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab902>.

MEDINI, Duccio; DONATI, Claudio; TETTELIN, Hervé; MASIGNANI, Vega; RAPPUOLI, Rino. The microbial pan-genome. **Current Opinion In Genetics & Development**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 589-594, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>.

MILJAKOVIĆ, Dragana; MARINKOVIĆ, Jelena; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, Svetlana. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 1037, 13 jul. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8071037>.

MISTRY, Jaina; CHUGURANSKY, Sara; WILLIAMS, Lowri; QURESHI, Matloob; SALAZAR, Gustavo A; SONNHAMMER, Erik L L; TOSATTO, Silvio C e; PALADIN, Lisanna; RAJ, Shriya; RICHARDSON, Lorna J. Pfam: the protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. D412-D419, 30 out. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.

MO, Kunlian; HUANG, Huiqin; BAO, Shixiang; HU, Yonghua. *Bacillus caeni* sp. nov., isolated from mangrove sediment. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 1503-1507, 1 mar. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003853>.

MONDOL, Muhammad; SHIN, Hee; ISLAM, Mohammad. Diversity of Secondary Metabolites from Marine Bacillus Species: chemistry and biological activity. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 2846-2872, 12 ago. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md11082846>.

MOSQUERA-RENDÓN, Jeanneth; RADA-BRAVO, Ana M.; CÁRDENAS-BRITO, Sonia; CORREDOR, Mauricio; RESTREPO-PINEDA, Eliana; BENÍTEZ-PÁEZ, Alfonso. Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* species. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-14, 12 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2364-4>.

MURCIA, Nelson Rojas; LEE, Xiaoyun; WARIDEL, Patrice; MASPOLI, Alessandro; IMKER, Heidi J.; CHAI, Tiancong; WALSH, Christopher T.; REIMMANN, Cornelia. The *Pseudomonas aeruginosa* antimetabolite L -2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid (AMB) is made from glutamate and two alanine residues via a thiotemplate-linked tripeptide precursor. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 6, p. 1-13, 12 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00170>.

NAUTIYAL, C.Shekhar. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 170, n. 1, p. 265-270, jan. 1999. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.

NARAYANAN, Zareen; GLICK, Bernard R.. Secondary Metabolites Produced by Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 2008, 11 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10102008>.

NGALIMAT, Mohamad Syazwan; YAHAYA, Radin Shafierul Radin; BAHARUDIN, Mohamad Malik Al-Adil; YAMINUDIN, Syafiqah Mohd.; KARIM, Murni; AHMAD, Siti Aqlima; SABRI, Suriana. A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 614, 17 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9030614>.

ONGENA, Marc; JOURDAN, Emmanuel; ADAM, Akram; PAQUOT, Michel; BRANS, Alain; JORIS, Bernard; ARPIGNY, Jean-Louis; THONART, Philippe. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 1084-1090, abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>.

ORTSEIFEN, Vera; KALINOWSKI, Jörn; PÜHLER, Alfred; RÜCKERT, Christian. The complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) carrying gene clusters for the biosynthesis of tetracenomycin C, 5'-hydroxy streptomycin, and acarbose. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 262, p. 84-88, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.008>.

PACHECO-MORENO, Alba; STEFANATO, Francesca L; FORD, Jonathan J; TRIPPEL, Christine; USZKOREIT, Simon; FERRAFIAT, Laura; GRENGA, Lucia; DICKENS, Ruth; KELLY, Nathan; KINGDON, Alexander Dh. Pan-genome analysis identifies intersecting roles for *Pseudomonas* specialized metabolites in potato pathogen inhibition. **Elife**, [S.L.], v. 10, p. 1-46, 18 nov. 2021. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.71900>.

PANDEY, Anand; TRIPATHI, Arpita; SRIVASTAVA, Piush; CHOUDHARY, Krishna Kumar; DIKSHIT, Anupam. Plant growth-promoting microorganisms in sustainable agriculture. **Role Of Plant Growth Promoting Microorganisms In Sustainable Agriculture And Nanotechnology**, [S.L.], p. 1-19, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817004-5.00001-4>.

PAYSAN-LAFOSSÉ, Typhaine; BLUM, Matthias; CHUGURANSKY, Sara; GREGO, Tiago; PINTO, Beatriz Lázaro; SALAZAR, Gustavo A; BILESCHI, Maxwell L; BORK, Peer; BRIDGE, Alan; COLWELL, Lucy. InterPro in 2022. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 418-427, 9 nov. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkac993>.

PEREIRA, Jose Odair; SOUZA, Antonia Queiroz Lima de; SOUZA, Afonso Duarte Leão de; FRANÇA, Suzelei de Castro; OLIVEIRA, Luiz Antonio de. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. **Diversity And Benefits Of Microorganisms From The Tropics**, [S.L.], p. 71-103, 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_5.

POVEDA, Jorge; GONZÁLEZ-ANDRÉS, Fernando. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 105, n. 23, p. 8629-8645, 26 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>.

PRABHU, Julia; SCHAUWECKER, Florian; GRAMMEL, Nicolas; KELLER, Ullrich; BERNHARD, Michael. Functional Expression of the Ectoine Hydroxylase Gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 5, p. 3130-3132, maio 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.5.3130-3132.2004>.

PRJIBELSKI, Andrey; ANTIPOV, Dmitry; MELESHKO, Dmitry; LAPIDUS, Alla; KOROBENNIKOV, Anton. Using SPAdes De Novo Assembler. **Current Protocols In Bioinformatics**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 1-29, jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpbi.102>.

QUINN, Gerry A.; BANAT, Aiyaa M.; ABDELHAMEED, Alyaa M.; BANAT, Ibrahim M.. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 69, n. 8, p. 1040-1048, 1 ago. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001232>.

RAHMAN, Sharifah Farhana Syed Ab; SINGH, Eugenie; PIETERSE, Corné M.J.; SCHENK, Peer M.. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**, [S.L.], v. 267, p. 102-111, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>.

RAINES, D.J.; SANDERSON, T.J.; WILDE, E.J.; DUHME-KLAIR, A.-K.. Siderophores. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, [S.L.], p. 1-33, 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11040-6>.

RAYMAEKERS, Katrijn; PONET, Lisa; HOLTAPPELS, Dominique; BERCKMANS, Barbara; CAMMUE, Bruno P.A.. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, [S.L.], v. 144, p. 104240, maio de 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>.

REHAN, Medhat; BARAKAT, Hassan; ALMAMI, Ibtesam S.; QURESHI, Kamal A.; ALSOHIM, Abdullah S.. Production and Potential Genetic Pathways of Three Different Siderophore Types in *Streptomyces tricolor* Strain HM10. **Fermentation**, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 346, 22 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation8080346>.

REHAN, Medhat; GUEDDOU, Abdellatif; ALHARBI, Abdulaziz; ABDELMALEK, Imen Ben. In Silico Prediction of Secondary Metabolites and Biosynthetic Gene Clusters Analysis of *Streptomyces thinghirensis* HM3 Isolated from Arid Soil. **Fermentation**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 65, 12 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation9010065>.

RICHTER, Michael; ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon; GLÖCKNER, Frank Oliver; PEPLIES, Jörg. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 929-931, 16 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>.

RICHTER, Michael; ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 106, n. 45, p. 19126-19131, 10 nov. 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906412106>.

RODRIGUEZ-R, Luis M.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. Bypassing cultivation to identify bacterial species. **Microbe**, v. 9, n. 3, p. 111-118, 2014.

ROGERS, Nicola J.; CARSON, Kerry C.; GLENN, Andrew R.; DILWORTH, Michael J.; HUGHES, Martin N.; POOLE, Robert K.. Alleviation of aluminum toxicity to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* by the hydroxamate siderophore vicibactin. **Biometals**, [S.L.], v. 14, p. 59-66, 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1016691301330>.

RUGINESCU, Robert; LAVIN, Paris; IANCU, Lavinia; MENABIT, Selma; PURCAREA, Cristina. Bioprospecting for Novel Bacterial Sources of Hydrolytic Enzymes and Antimicrobials in the Romanian Littoral Zone of the Black Sea. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 2468, 14 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10122468>.

SADDIQA, Aisha; USMAN, Muhammad; ÇAKMAK, Osman. Isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins, amazing natural products: a review. **Turkish Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 41, p. 153-178, 2017. The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK-ULAKBIM) - DIGITAL COMMONS JOURNALS. <http://dx.doi.org/10.3906/kim-1604-66>.

SANDOVAL-POWERS, Megan; KRÁLOVÁ, Stanislava; NGUYEN, Giang-Son; FAWWAL, Dorelle V.; DEGNES, Kristin; LEWIN, Anna Sofia; KLINKENBERG, Geir; WENTZEL, Alexander; LILES, Mark R.. *Streptomyces poriferorum* sp. nov., a novel marine sponge-derived Actinobacteria species expressing anti-MRSA activity. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 126244, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126244>.

SHANNON, Paul; MARKIEL, Andrew; OZIER, Owen; BALIGA, Nitin S.; WANG, Jonathan T.; RAMAGE, Daniel; AMIN, Nada; SCHWIKOWSKI, Benno; IDEKER, Trey. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 2498-2504, nov. 2003. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1239303>.

SALWAN, Richa; SHARMA, Vivek. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 231, p. 126374, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>.

SARMIENTO-LÓPEZ, Luis Gerardo; LÓPEZ-MEYER, Melina; MALDONADO-MENDOZA, Ignacio Eduardo; QUIROZ-FIGUEROA, Francisco Roberto; SEPŐLVEDA-JIMÉNEZ, Gabriela; RODRÍGUEZ-MONROY, Mario. Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 134, n. 1, p. 21-28, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.007>.

SAXENA, A.K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D.J.. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 128, n. 6, p. 1583-1594, 21 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14506>.

SCHERLACH, Kirstin; HERTWECK, Christian. Chemical Mediators at the Bacterial-Fungal Interface. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 267-290, 8 set. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-012420-081224>.

SCHERLACH, Kirstin; HERTWECK, Christian. Mining and unearthing hidden biosynthetic potential. **Nature Communications**, [S.L.], p. 1-12, 23 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-24133-5>.

SCHORN, Michelle A.; VERHOEVEN, Stefan; RIDDER, Lars; HUBER, Florian; ACHARYA, Deepa D.; AKSENOV, Alexander A.; ALETI, Gajender; MOGHADDAM, Jamshid Amiri; ARON, Allegra T.; AZIZ, Saefuddin. A community resource for paired genomic and metabolomic data mining. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 363-368, 15 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41589-020-00724-z>.

SEHRAWAT, Anju; SINDHU, Satyavir S.; GLICK, Bernard R.. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. **Pedosphere**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 15-38, fev. 2022. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1002-0160\(21\)60058-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1002-0160(21)60058-9).

SHUIKAN, Ahmed M.; HOZZEIN, Wael N.; ALZHARANI, Mohammed M.; SANDOUKA, Maram N.; YOUSEF, Sulaiman A. Al; ALHARBI, Sulaiman A.; DAMRA, Eman. Enhancement and Identification of Microbial Secondary Metabolites. In: **Extremophilic Microbes and Metabolites-Diversity, Bioprospecting and Biotechnological Applications**. IntechOpen, 2020. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.93489>.

SON, Jin-Soo; HWANG, Ye-Ji; LEE, Soo-Yeong; GHIM, Sa-Youl. *Bacillus salidurans* sp. nov., isolated from salt-accumulated pepper rhizospheric soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 116-122, 1 jan. 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003110>.

SOUZA, W, et al. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia**, Rio de Janeiro, 2007.

SOUZA, Rocheli de; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciane M.P.. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 401-419, 3 nov. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-475738420150053>.

SUMMERS, R G; WENDT-PIENKOWSKI, E; MOTAMEDI, H; HUTCHINSON, C R. Nucleotide sequence of the tcmII-tcmIV region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* and evidence that the tcmN gene encodes a multifunctional cyclase-dehydratase-O-methyl transferase.

Journal Of Bacteriology, [S.L.], v. 174, n. 6, p. 1810-1820, mar. 1992. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.174.6.1810-1820.1992>.

SU, Yuan; LIU, Chuan; FANG, Huan; ZHANG, Dawei. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-12, 3 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>.

TANG, Rong; YANG, Shang; HAN, Shuang; XIE, Cheng-Jie; HUANG, Guan-Min; RAO, Manik Prabhu Narsing; LIU, Guo-Hong; ZHOU, Shun-Gui. *Bacillus litorisediminis* sp. nov., a Thermophilic Bacterium Isolated from Mangrove Sediment. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 80, n. 2, p. 1-6, 19 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-023-03180-9>.

TAREQ, Fakir; LEE, Min; LEE, Hyi-Seung; LEE, Jong-Seok; LEE, Yeon-Ju; SHIN, Hee. Gageostatins A–C, Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine *Bacillus subtilis*. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 871-885, 31 jan. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md12020871>.

TETTELIN, Hervé; MASIGNANI, Vega; CIESLEWICZ, Michael J.; DONATI, Claudio; MEDINI, Duccio; WARD, Naomi L.; ANGIUOLI, Samuel V.; CRABTREE, Jonathan; JONES, Amanda L.; DURKIN, A. Scott. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial .:pan-genome::. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 102, n. 39, p. 13950-13955, 19 set. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506758102>.

TEIXEIRA, M. F. S. SILVA, T. A. PALHETA, R. A. CARNEIRO, A. L. B. ATAYDE, H. M. Fungos da Amazônia: Uma Riqueza Inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). Universidade Federal do Amazonas, Manaus: Edua, 2011.

TYC, Olaf; SONG, Chunxu; DICKSCHAT, Jeroen S.; VOS, Michiel; GARBEVA, Paolina. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 4, p. 280-292, 2017.

VERNIKOS, George; MEDINI, Duccio; RILEY, David R; TETTELIN, Hervé. Ten years of pan-genome analyses. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 23, p. 148-154, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.016>.

WAKSMAN, Selman A.; HENRICI, Arthur T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 337-341, 1943.

WANG, Mingxun; CARVER, Jeremy J; PHELAN, Vanessa V; SANCHEZ, Laura M; GARG, Neha; PENG, Yao; NGUYEN, Don Duy; WATROUS, Jeramie; A KAPONO, Clifford; LUZZATTO-KNAAN, Tal. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 34, n. 8, p. 828-837, ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3597>.

WORSLEY, Sarah F.; NEWITT, Jake; RASSBACH, Johannes; BATEY, Sibyl F. D.; HOLMES, Neil A.; MURRELL, J. Colin; WILKINSON, Barrie; HUTCHINGS, Matthew I.. *Streptomyces* Endophytes Promote Host Health and Enhance Growth across Plant Species. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 86, n. 16, p. 1-17, 3 ago. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01053-20>.

WIRTH, Stephan J.; WOLF, Gerhard A.. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 12, n. 3-4, p. 197-205, dez. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(90\)90031-z](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(90)90031-z).

WRIGHT, Frank; BIBB, Mervyn J.. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. **Gene**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 55-65, abr. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90669-g](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(92)90669-g).

XIA, Liming; MIAO, Youzhi; CAO, A'li; LIU, Yan; LIU, Zihao; SUN, Xinli; XUE, Yansheng; XU, Zhihui; XUN, Weibing; SHEN, Qirong. Biosynthetic gene cluster profiling predicts the positive association between antagonism and phylogeny in *Bacillus*. **Nature Communications**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 23 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-28668-z>.

XU, Bo; CHEN, Wei; WU, Zhi-Ming; LONG, Yue; LI, Kun-Tai. A Novel and Effective *Streptomyces* sp. N2 Against Various Phytopathogenic Fungi. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, [S.L.], v. 177, n. 6, p. 1338-1347, 26 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1818-5>.

XU, Ling; DONG, Zhaobin; FANG, Lu; LUO, Yongjiang; WEI, Zhaoyuan; GUO, Hailong; ZHANG, Guoqing; GU, Yong Q; COLEMAN-DERR, Devin; XIA, Qingyou. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. W52-W58, 4 maio 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz333>.

YAMADA, Yuuki; KUZUYAMA, Tomohisa; KOMATSU, Mamoru; SHIN-YA, Kazuo; OMURA, Satoshi; CANE, David E.; IKEDA, Haruo. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 3, p. 857-862, 22 dez. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1422108112>.

YANG, Yong; ZHANG, Shuai-Wen; LI, Kun-Tai. Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 1-9, set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-019-2720-z>.

YOON, Seok-Hwan; HA, Sung-Min; KWON, Soonjae; LIM, Jeongmin; KIM, Yeseul; SEO, Hyungseok; CHUN, Jongsik. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16s rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal Of Systematic And Evolutionary**

Microbiology, [S.L.], v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 1 maio 2017. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.

YOON, Seok-Hwan; HA, Sung-Min; LIM, Jeongmin; KWON, Soonjae; CHUN, Jongsik. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 110, n. 10, p. 1281-1286, 15 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>.

YU, Xianmei; AI, Chengxiang; XIN, Li; ZHOU, Guangfang. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal Of Soil Biology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 138-145, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>.

YUAN, Jun; LI, Bing; ZHANG, Nan; WASEEM, Raza; SHEN, Qirong; HUANG, Qiwei. Production of Bacillomycin- and Macrolactin-Type Antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for Suppressing Soilborne Plant Pathogens. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 60, n. 12, p. 2976-2981, 13 mar. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf204868z>.

ZHANG, Jian; ZHAO, Tianhu; YANG, Rongwen; SIRIDECHAKORN, Ittipon; WANG, Sanshan; GUO, Qianqian; BAI, Yingjie; SHEN, Hong C.; LEI, Xiaoguang. De novo synthesis, structural assignment and biological evaluation of pseudopaline, a metallophore produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemical Science**, [S.L.], v. 10, n. 27, p. 6635-6641, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9sc01405e>.

ZHOU, Zhan; GU, Jianying; LI, Yong-Quan; WANG, Yufeng. Genome plasticity and systems evolution in *Streptomyces*. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1-17, jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-s10-s8>.

Suplemento

Título: Mineração Gênica e Prospecção De Compostos do Metabolismo Secundário de Microrganismos Isolados de Sedimentos dos Rios Madeira e Solimões.

Costa, Gerodes Vasconcelos¹, Queiroz, Claudia Afras², koolen, Hector Henrique ferreira³, Silva, Gilvan Ferreira^{4}

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - PPG Agricultura dos Trópicos Úmidos,

² Embrapa Amazônia Ocidental

³ Universidade do Estado do Amazonas,

⁴ Embrapa Amazônia Ocidental

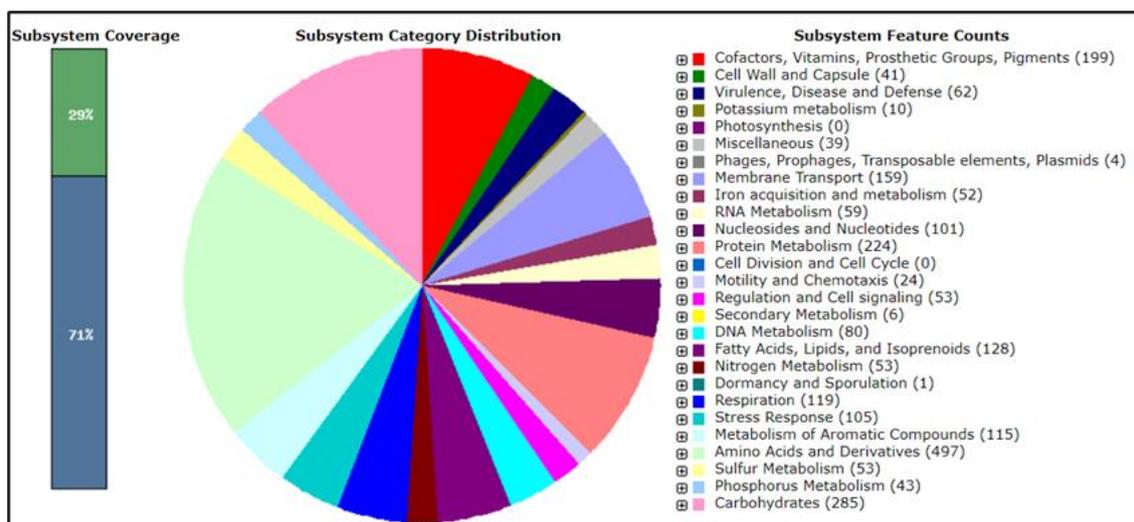


Figura S1- Classificação de subsistemas MAD34 (baseado no servidor de anotação RAST).

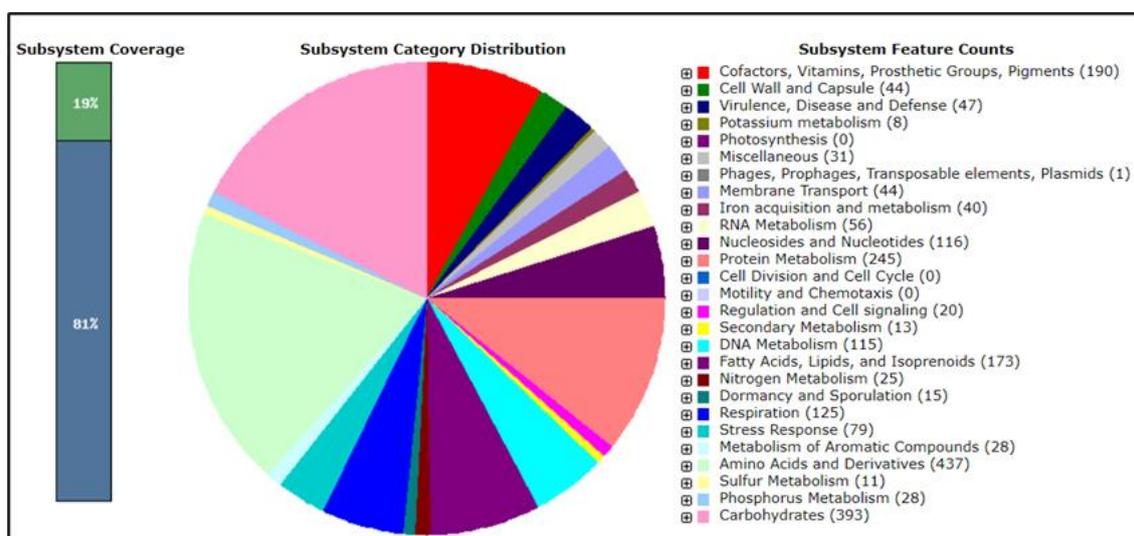


Figura S2- Classificação de subsistemas MAD51 (baseado no servidor de anotação RAST).

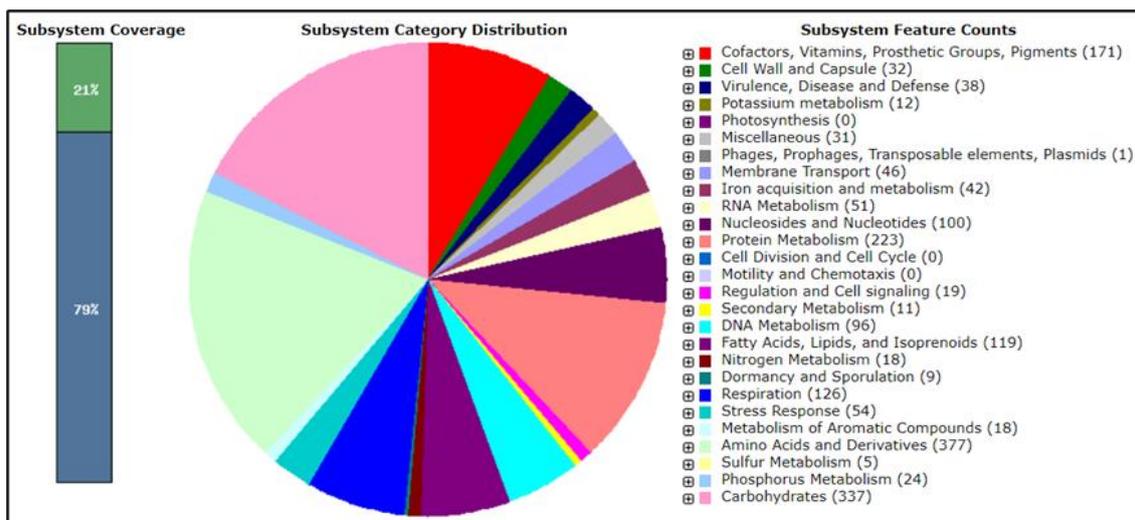


Figura S3- Distribuição de categoria de subsistema da linhagem MAD1003 (baseado no servidor de anotação RAST).

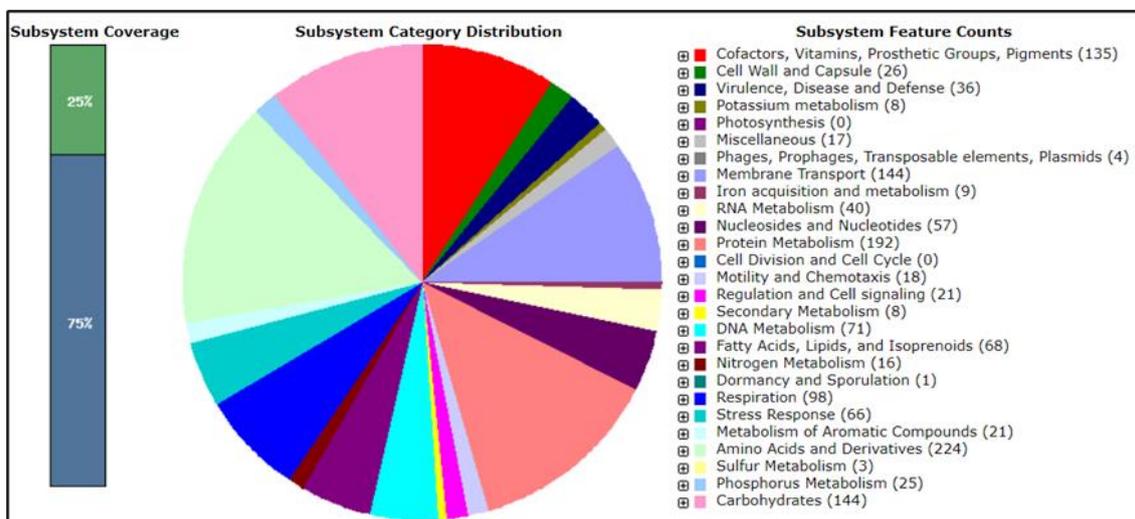


Figura S4- Distribuição de categoria de subsistema da linhagem SOL105 (baseado no servidor de anotação RAST).

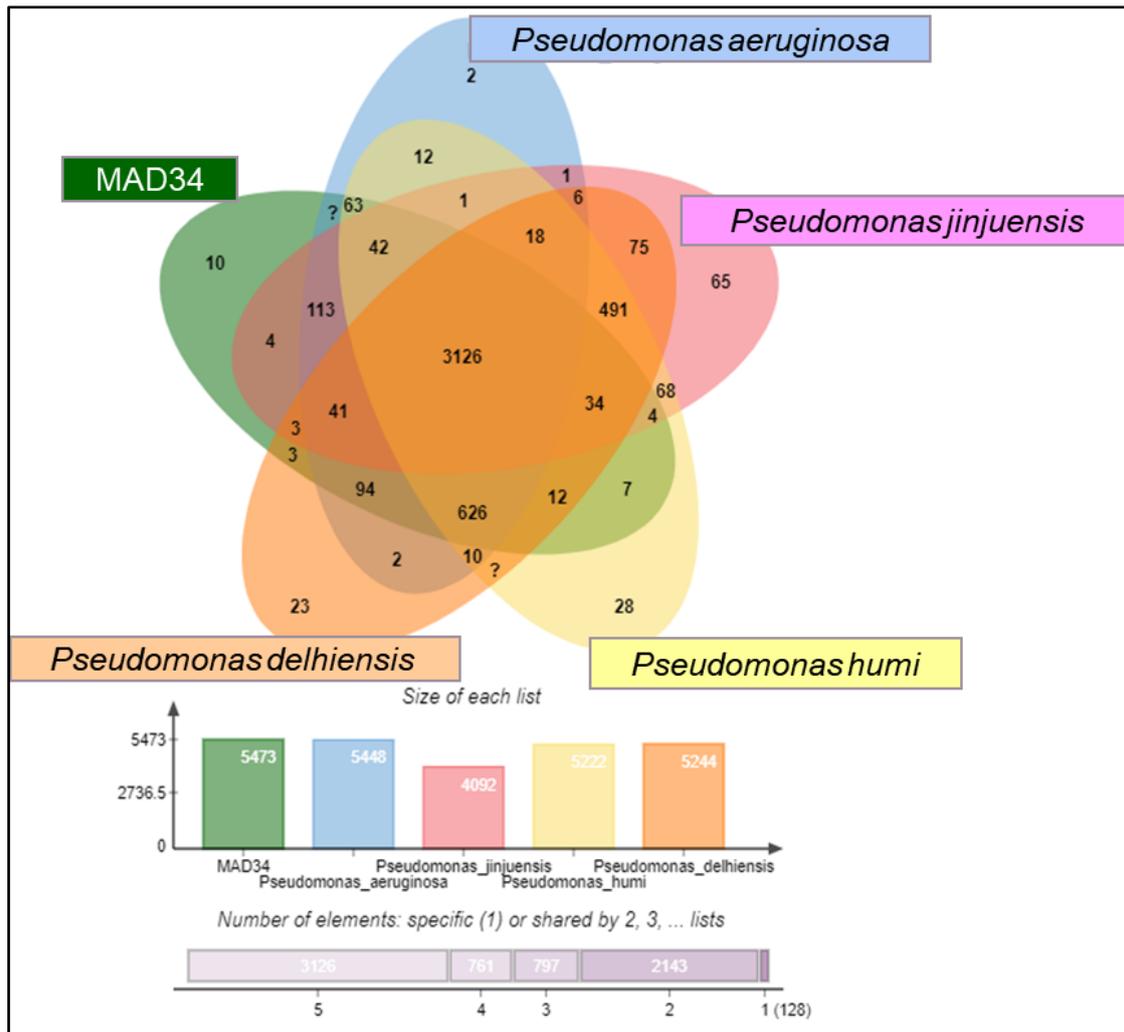


Figura S5- Diagrama de Venn representando os grupos ortólogos e os principais genes ortólogos e únicos das linhagens MAD34 com quatro espécies tipo intimamente relacionadas.

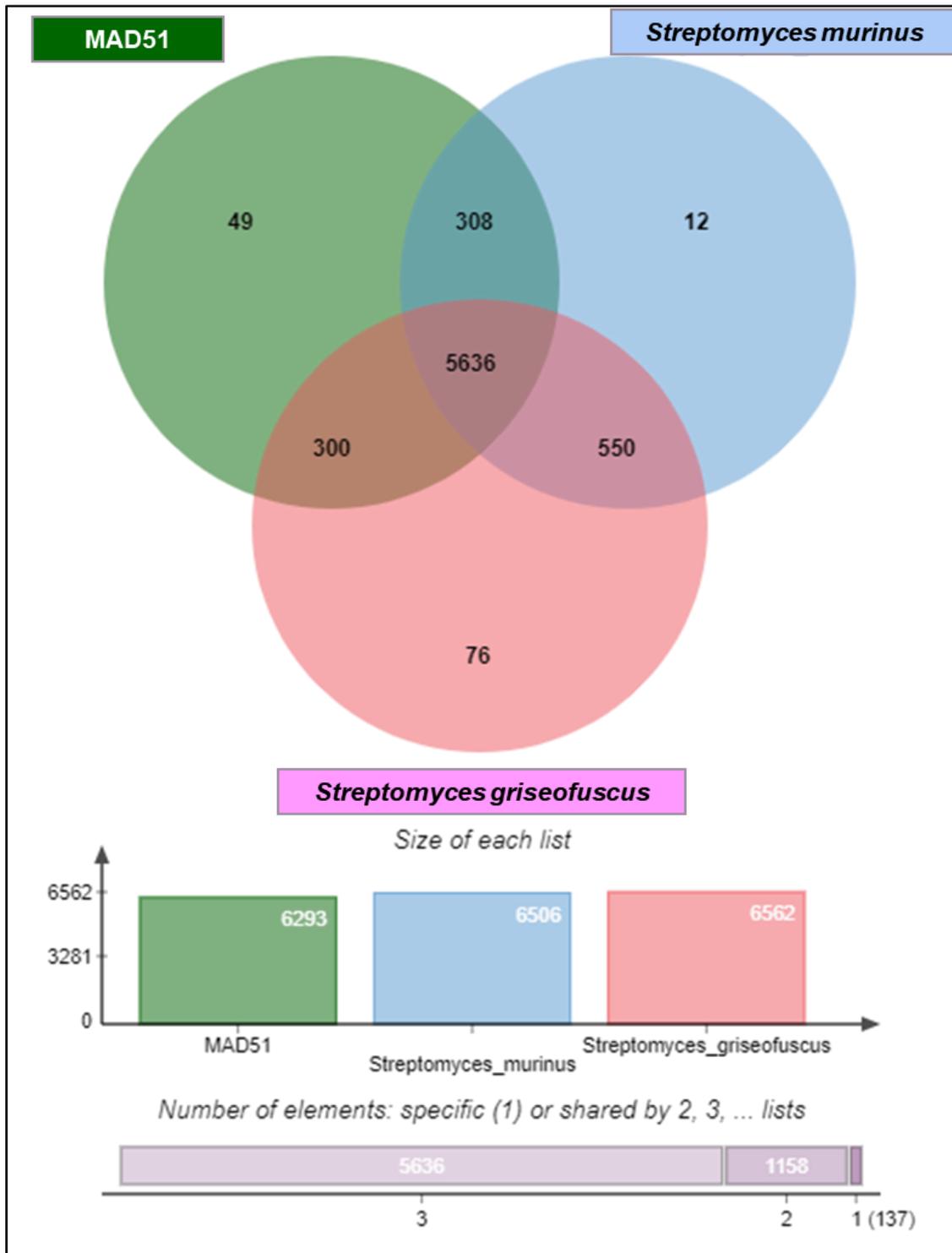


Figura S6- Diagrama de Venn com os grupos ortólogos da linhagem MAD51, com três espécies de *streptomyces* intimamente relacionadas.

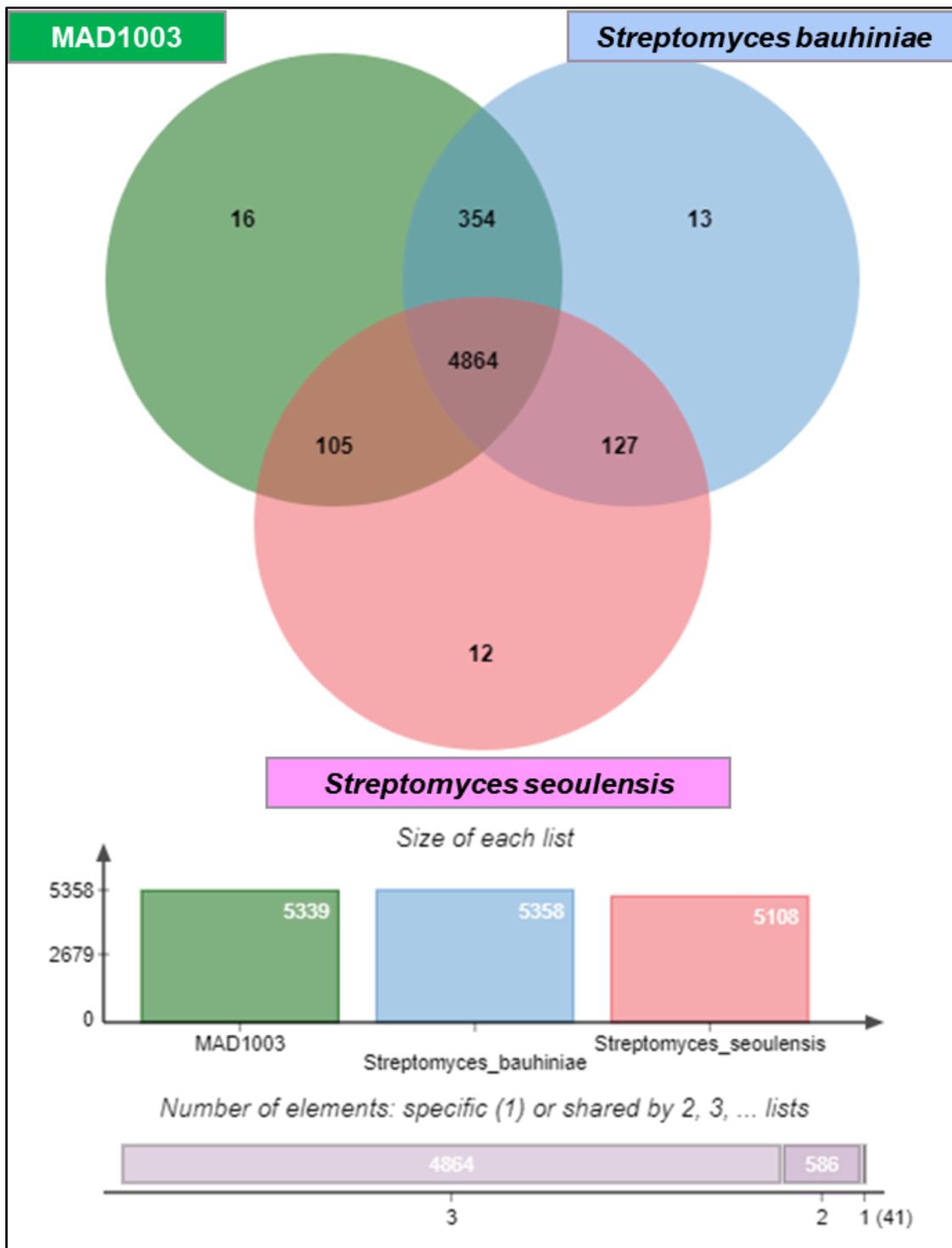


Figura S7- Diagrama de Venn representando os principais grupos ortólogos da linhagem MAD1003, tendo três linhagens de espécies de *streptomyces* intimamente relacionadas.

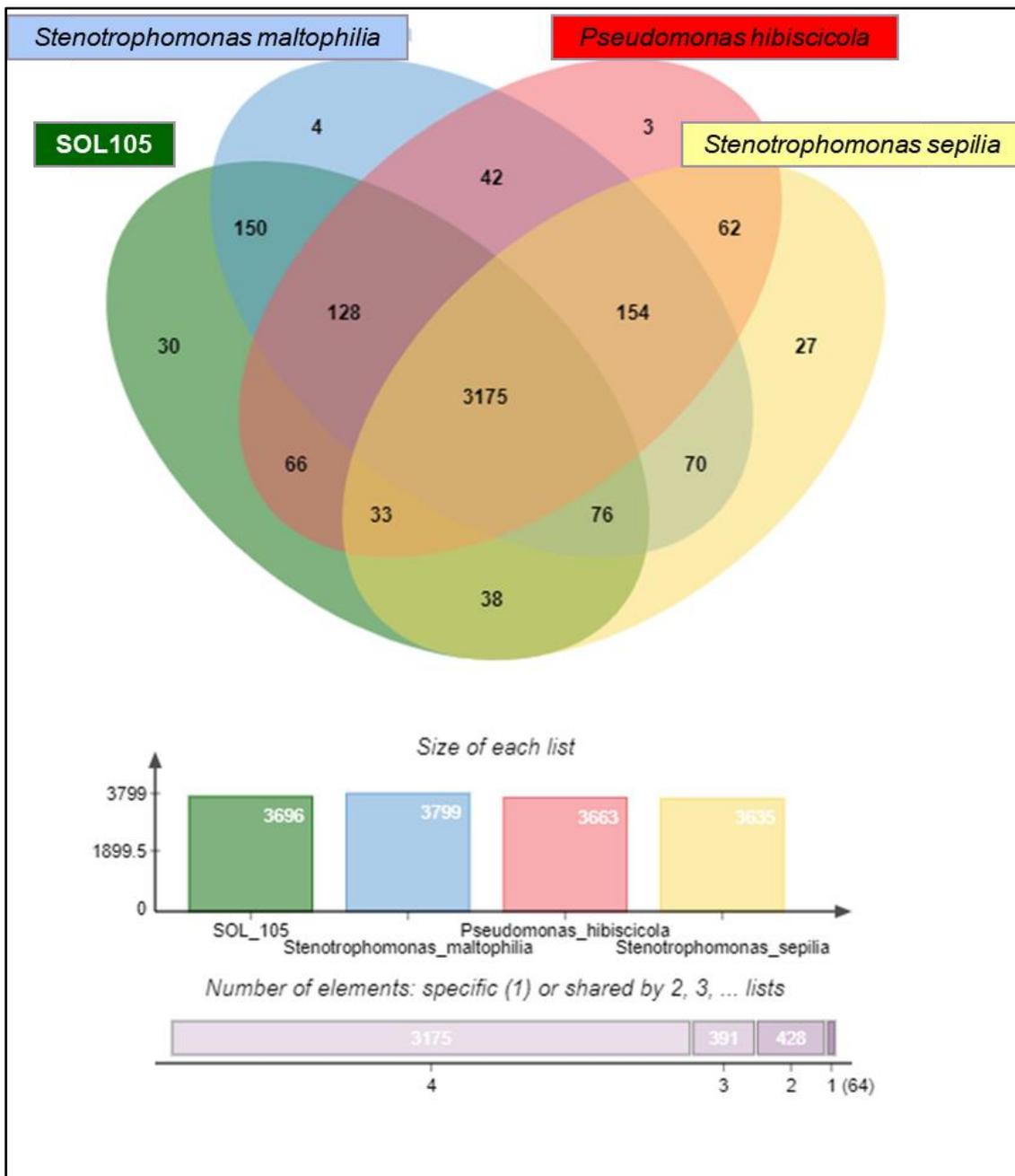


Figura S8- Diagrama de Venn representando os principais genes ortólogos únicos das linhagens SOL105 com três linhagens *Stenotrophomonas*.

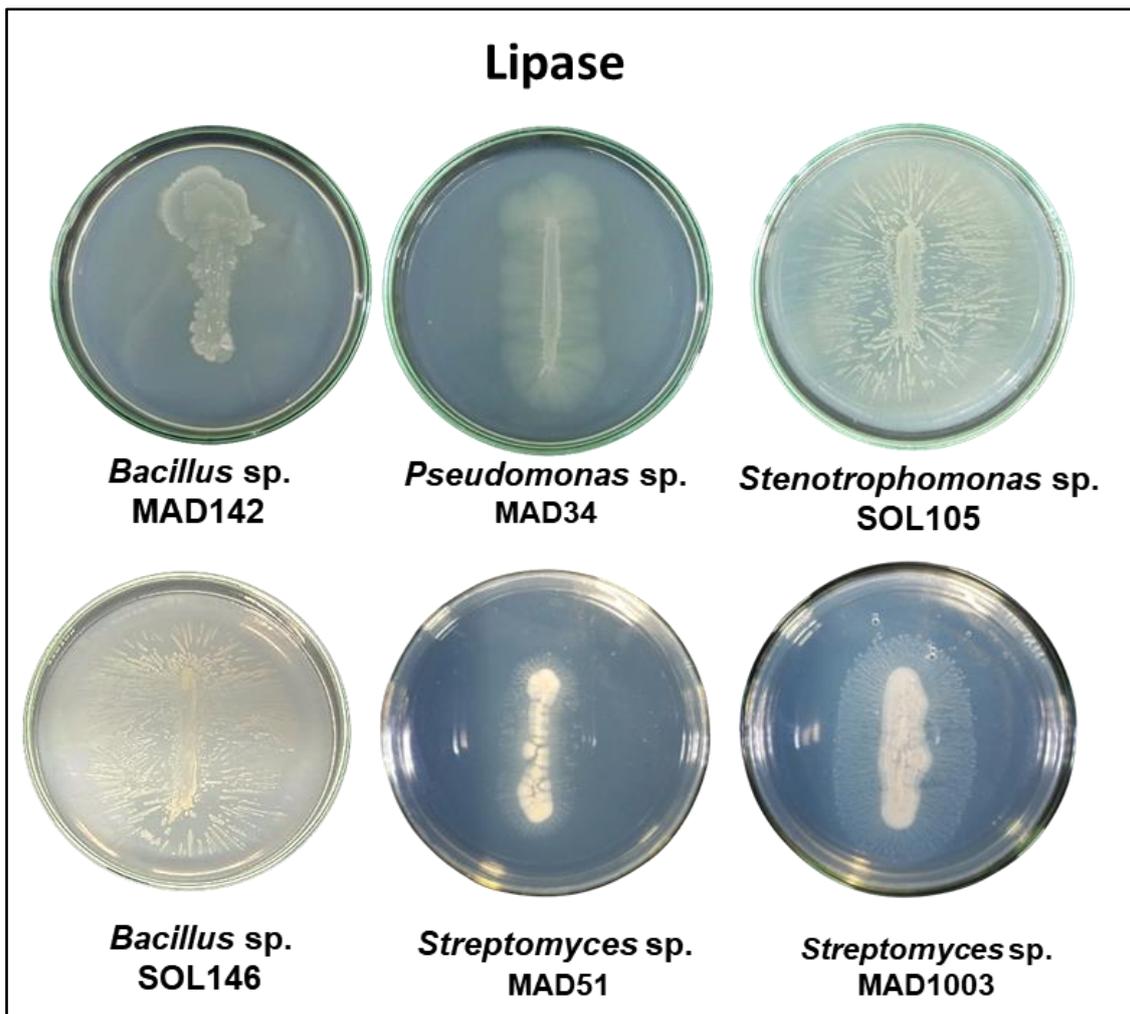


Figura S9- Atividade lipolítica de bactérias isoladas dos rios Madeira e Solimões. A presença de cristais em volta das linhagens SOL105 e SOL146, MAD51, MAD1003 apresentam atividades positivas.

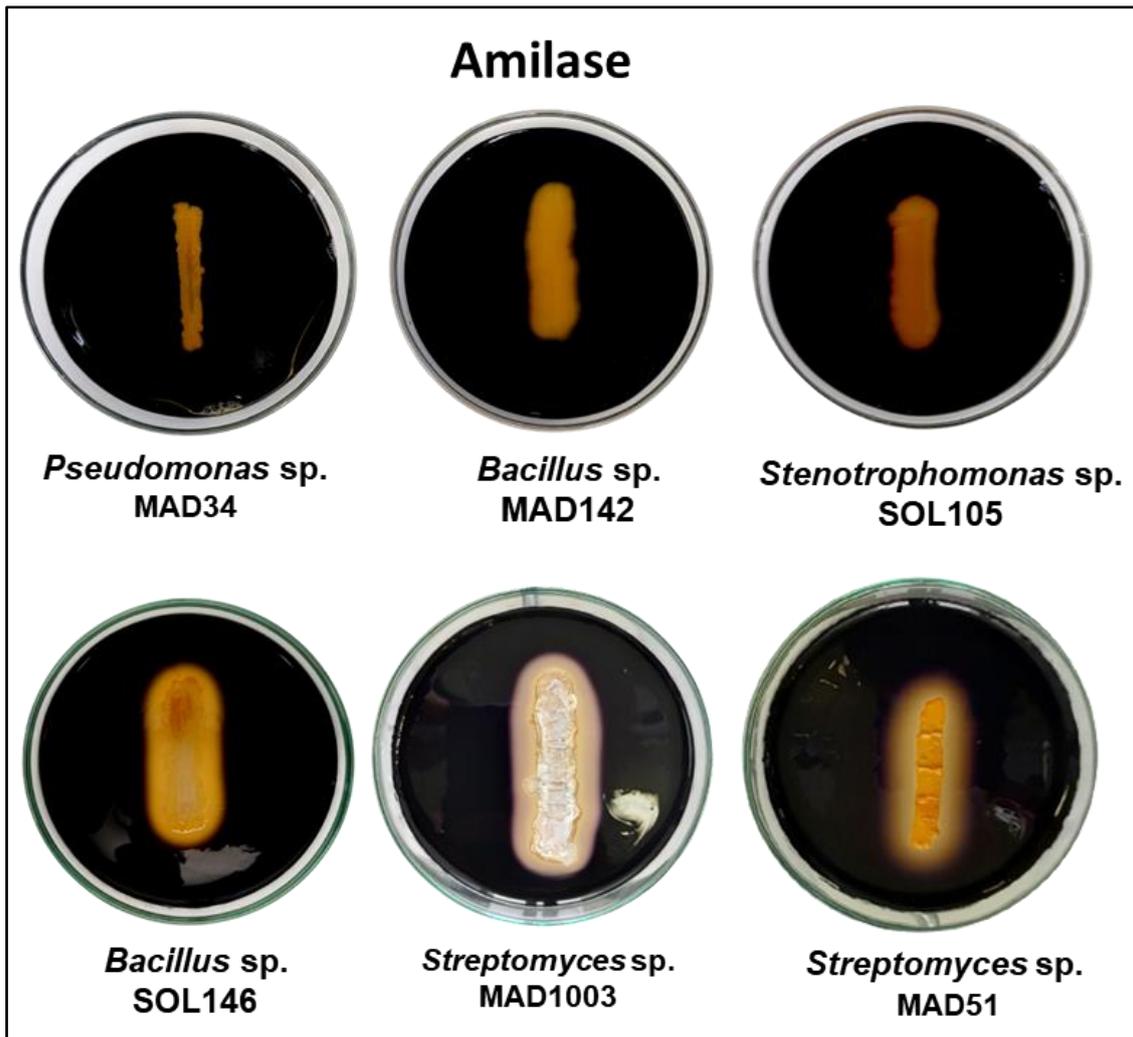


Figura S10: Atividade enzimática evidente para a produção de amilase por bactérias isoladas de sedimentos dos rios Solimões, SOL146 e SOL146, e rio Madeira MAD34, MAD142, MAD1003 e MAD51. A presença de halo mostra atividade positiva para a amilase.

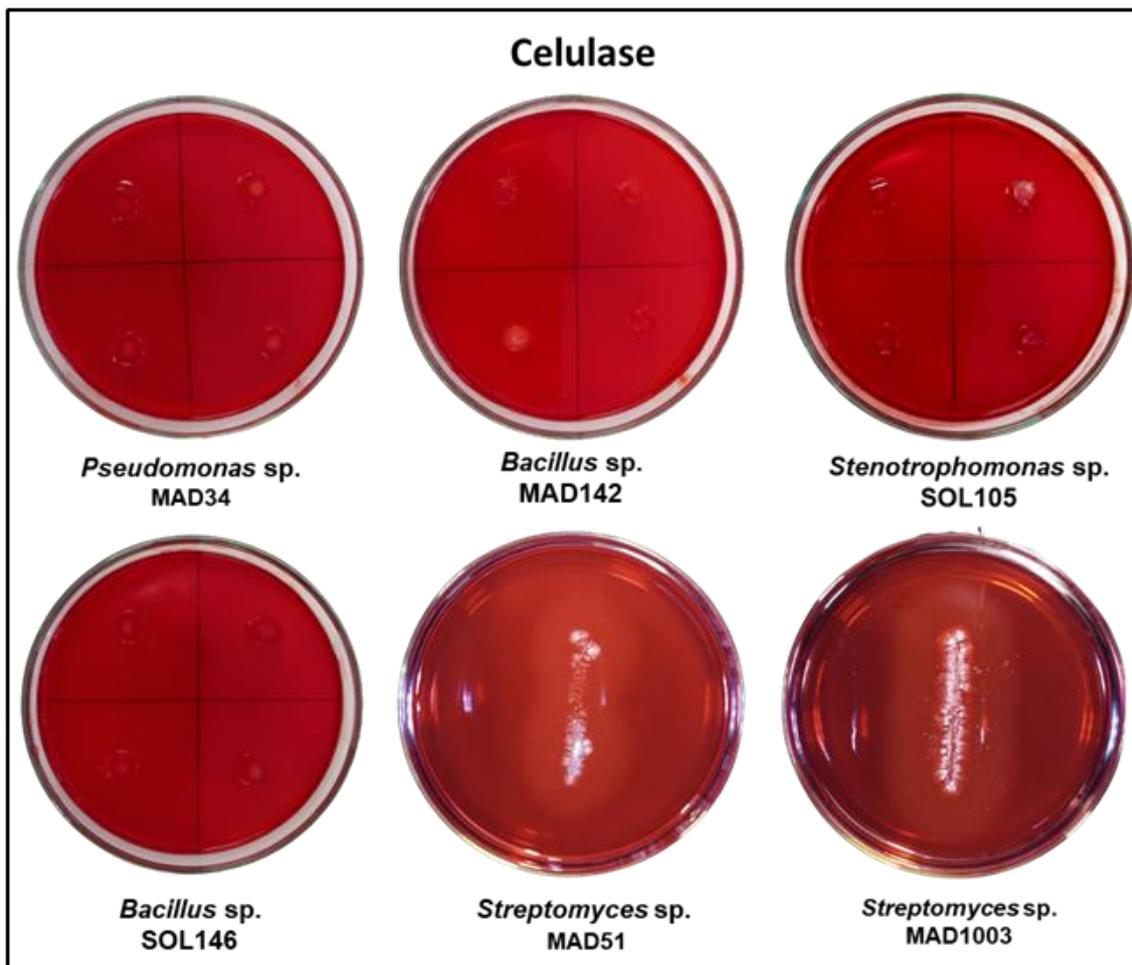


Figura S11: Atividade para produção de celulase dos isolados de sedimento dos rios Madeira e Solimões, a presença de halo claro ao redor de dois isolados do rio Madeira MAD51 e MAD1003 mostra atividade positiva para celulase.

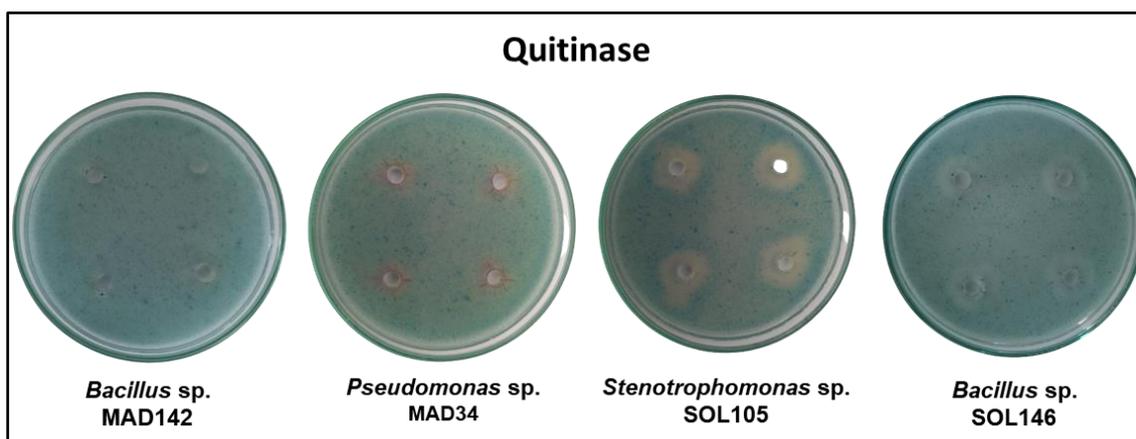


Figura S12: Ensaio em placa mostrando as atividades positivas de 3 (três) isolados de bactérias (MAD34, SOL105, SOL146). A zona clara mostra a formação de halos claramente visíveis, em volta dos poços, mostrando que os extratos de 3 (três) dos isolados possuem atividade quitinolítica.

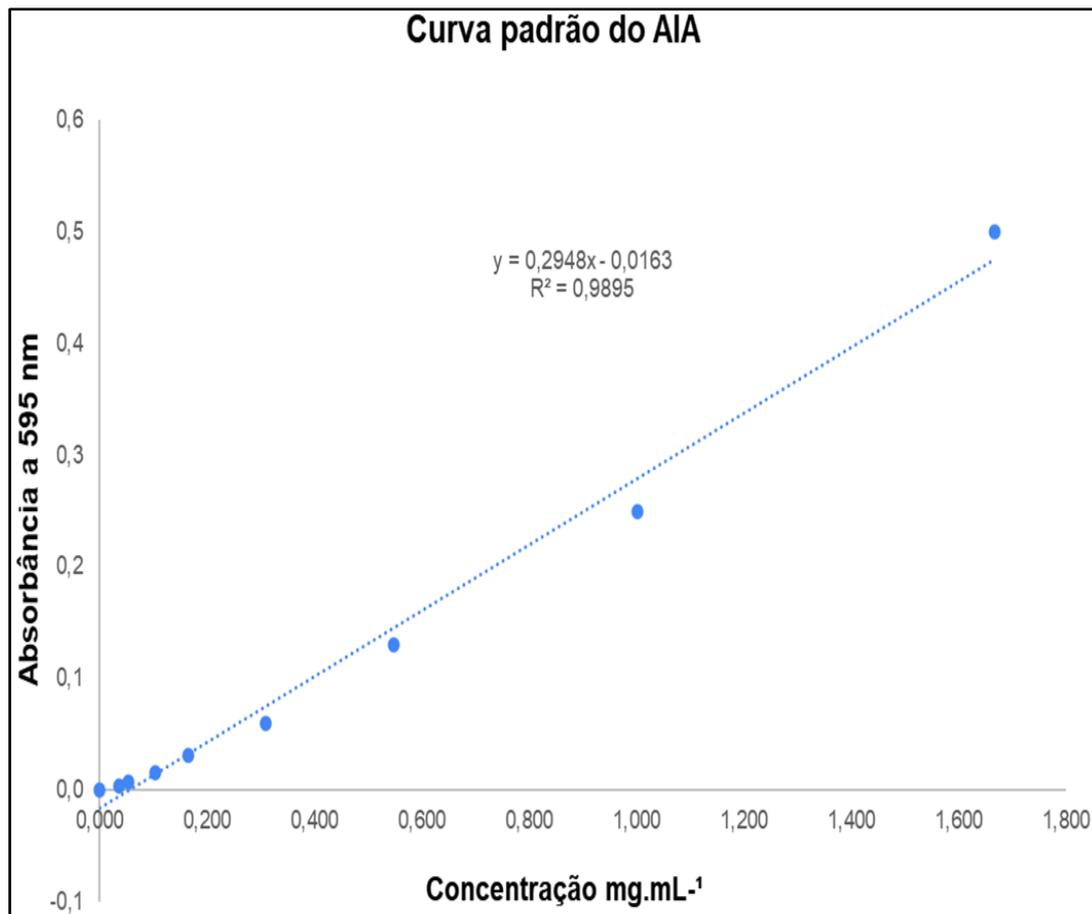


Figura S13: Curva padrão da concentração de auxina, para determinar a concentração de produção de cada linhagem estudada.

Tabela S1: Predição de clusters gênicos biossintéticos no genoma da linhagem de *Pseudomonas* sp. MAD34 usando a plataforma antiSMASH versão 7.1.0.

Região	Tipo	Cluster semelhante	Similaridade (%)
Region 1.1	NRPS	L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid	100
Region 1.2	NRP-metallophore,NRPS	Pf-5 pyoverdine	24
Region 2.1	hserlactone	-	-
Region 2.2	NAGGN	-	-
Region 2.3	NRPS	azetidomonamide A azetidomonamide B	100
Region 3.4	RiPP-like	-	-
Region 3.1	opine-like-metallophore	pseudopaline	100
Region 4.1	phenazine	pyocyanine	42
Region 9.1	NRPS-like,betalactone	pyoverdine SMX-1	12
Region 10.1	NRPS-like	MA026	5
Region 10.2	RiPP-like	-	-
Region 10.3	phenazine	pyocyanine	42
Region 11.1	hydrogen-cyanide	hydrogen-cyanide	100
Region 12.1	hserlactone	-	-
Region 15.1	thiopeptide	-	-
Region 19.1	redox-cofactor	lankacidin C	13
Region 21.1	NRP-metallophore,NRPS	pyochelin	50
Total	17		

Tabela S2: Predição de clusters gênicos biossintéticos no genoma da linhagem *Streptomyce* sp. MAD51.

Região	Tipo	Cluster semelhante	Similaridade (%)
Region 1.1	butyrolactone	Other	100
Region 2.1	T1PKS, T2PKS	Polyketide	83
Region 5.1	RiPP-like	-	-
Region 5.2	PKS-like, T1PKS, other	Polyketide	5
Region 6.1	T2PKS	Polyketide:Type II polyketide	100
Region 7.1	furan	Polyketide:Type II polyketide	25
Region 8.1	T1PKS	Polyketide	5
Region 10.1	T1PKS	Polyketide	4
Region 11.1	hgIE-KS, T1PKS	Other	13
Region 14.1	terpene	Terpene	100
Region 16.1	NI-siderophore	-	-

Region 17.1	terpene	Polyketide	25
Region 19.1	NRPS-like	Polyketide	6
Region 20.1	lanthipeptide-class-v,thioamitides	RiPP	100
Region 21.1	thiopeptide,LAP,terpene	Terpene	92
Region 28.1	T1PKS, NRPS	Polyketide	12
Region 29.1	RiPP-like	-	-
Region 32.1	other	NRP	7
Region 32.2	lanthipeptide-class-iii	Polyketide	12
Region 35.1	T3PKS	Polyketide	100
Region 36.1	NRPS,phenazine	NRP+Polyketide	15
Region 38.1	T1PKS	-	-
Region 39.1	NRPS	NRP	18
Region 44.1	NI-siderophore	Other	83
Region 47.1	lassopeptide	-	-
Region 53.1	ectoine	Other	100
Region 60.1	NRPS	NRP	18
Region 79.1	T1PKS	NRP+Polyketide	3
Region 82.1	NRPS, NAPAA	NRP:Cyclic depsipeptide	13
Region 85.1	T1PKS	Polyketide	60
Region 88.1	NRPS-like,transAT PKS-like, T1PKS	NRP+Polyketide:Modular type I polyketide	18
Region 119.1	melanin	Other	100
Region 140.1	NRPS	-	-
Region 145.1	NI-siderophore	-	-
Region 164.1	betalactone,NRPS-like	Other	3
Region 165.1	RiPP-like	RiPP:Lanthipeptide	28
Region 168.1	RiPP-like	-	-
Region 220.1	T1PKS	Polyketide	18
Region 261.1	terpene	Polyketide	5
Total	39		

Tabela S3: Predição de clusters gênicos biossintéticos no genoma da linhagem de *Streptomyces* sp. MAD1003 usando a plataforma antiSMASH versão 7.1.0.

Região	Tipo	Cluster semelhante	Similaridade (%)
Region 1.1	NRP-metallophore,NRPS	scabichelin	100
Region 1.2	phenazine	lomofungin	39
Region 2.1	T1PKS	ansamitocin P-3	7
Region 2.2	NRPS	skyllamycin A/skylamycin B	8
Region 3.1	butyrolactone	kinamycin	11
Region 3.2	RiPP-like	-	-
Region 4.1	T1PKS	jomthonic acid A/jomthonic acid B/jomthonic acid C	5
Region 5.1	LAP,thiopeptide	dutoxymycin	4
Region 7.1	NRPS-like,NRPS	atratumycin	13
Region 9.1	NAPAA	stenothricin	13
Region 12.1	butyrolactone	prejadomycin/rabelomycin/gaudimycin C/gaudimycin D/UWM6/gaudimycin A	6
Region 13.1	melanin	istamycin	4
Region 15.1	NRP-metallophore,thioamide-NRP,NRPS-like,NRPS	BD-12	17
Region 17.1	terpene	hopene	92
Region 24.1	terpene	albaflavenone	100
Region 26.1	T3PKS	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene	100
Region 27.1	ectoine	ectoine	100
Region 28.1	NI-siderophore	-	-
Region 41.1	T3PKS	alkylresorcinol	100
Region 42.1	NI-siderophore	grincamycin	8
Region 50.1	terpene	geosmin	100
Region 69.1	T2PKS	spore pigment	83
Region 74.1	NI-siderophore	desferrioxamin B/desferrioxamine E	83
Region 78.1	RiPP-like	informatipeptin	28
Total	24		

Tabela S4: Predição de clusters gênicos biossintéticos no genoma da linhagem *Stenotrophomonas* sp. SOL105.

Região	Tipo	Cluster semelhante	Similaridade (%)
Region 2.1	RiPP-like	-	-
Region 4.1	lassopeptide	-	-
Region 6.1	arylpolyene	APE Vf	40
Region 29.1	NRP-metallophore,NRPS	2,3-Dihydroxybenzoylserine	57
Total	4		